

## TAVŞAN AORTUNDA ENDOTELE BAĞLI GEVŞEMEDE KALSİYUM (Ca<sup>++</sup>) ve MAGNEZYUM (Mg<sup>++</sup>) İYONLARININ ROLÜ☆

Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU, Dr. Ekrem ÇİÇEK, Dr. Necdet DOĞAN  
S.Ü.T.F. Farmakoloji A.B.D.

### ÖZET

Tavşan aortunda yapılan bu *in vitro* çalışmada, endotelli ve endotelsiz dokuda, noradrenalin (NA)'e bağlı kasılmalar üzerine kümülatif konsantrasyonda uygulanan asetilkolin (ACh) cevaplarının ortamdaki Ca<sup>++</sup> ve Mg<sup>++</sup> iyonlarına ne ölçüde bağımlı olduğu araştırıldı.

Endoteli sağlam dokuda Ca<sup>++</sup>'lu ve Mg<sup>++</sup>'lu ortamda uygulanan ACh, 10<sup>-9</sup>M NA'e bağlı kasılmaları büyük ölçüde inhibe etti. Besleyici sıvıdaki bu iyonların, yarıya indirilmesi ile söz konusu inhibisyon anlamlı ölçüde azaldı. Her iki iyonun ortamdaki uzaklaştırılması ile inhibisyon görülmedi. Endotelsiz dokuda ise, ACh ilavesi NA'e bağlı kasılmaları her üç ortamda da anlamlı ölçüde artırdı.

Bulgular, tavşan aortunda NA'e bağlı kasılmaların ACh tarafından inhibe edilebilmesi için endotelin sağlam olmasının gerektiğini göstermiştir. Ayrıca endoteli sağlam dokuda da ACh'in gevşeme yapabilmesi için ortamda Ca<sup>++</sup> ve Mg<sup>++</sup> iyonlarının gerektiği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kalsiyum iyonu-Magnezyum iyonu-Endotele Bağlı Gevşeme

### SUMMARY

**The Role Of Calcium (Ca<sup>++</sup>) and Magnesium (Mg<sup>++</sup>) Ions on The Endothelium-Dependent Relaxation of Rabbit Aorta.**

In this *in vitro* study it was investigated how much the ACh responses, which obtained after NA contractions in rabbit thoracic aorta preparations with endothelium or without endothelium, depends on the concentrations of Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> ions in the medium.

In perparation with intact endothelium, Ach inhibited the contractile effect of 10<sup>-9</sup>M NA on a large scala. When these ions' concentrations were reduced to half, this inhibition decreased significantly. In Ca<sup>++</sup>-free or Mg<sup>++</sup>-free solution there was no inhibition. However, in preparations without endothelium and in also three medium, addition of ACh increased the contractile response to NA, significantly.

The results suggest that there must be an intact endothelium in rabbit aorta for inhibition of NA-mediated contractions, by ACh. Furthermore, it's demonstrated that, also in preparations with intact endothelium Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> ions are necessary for relaxation by ACh.

Key Words: Calcium ion-Magnesium ion-Endothelium-Dependent Relaxation.

### GİRİŞ

Endotel kaynaklı gevşetici faktör (Endothelium Derived Relaxing Factor: EDRF), ilk defa Furchgott ve Zawadzki tarafından tavşan aortu striplerinde ACh'e bağlı gevşeme ile gösterildi (1). Damar endotelinin tahribi sonucu bu gevşemenin ileri derecede azalması veya kaybolması, EDRF'nin endotelden salıverilip damar düz kasına geçerek vazodilatasyon yaptığını göstermektedir (2,3).

☆ Bu yazı daha önce 10.9.1990 tarihinde Bursa'da yapılan X. Farmakoloji Kongresinde tebliğ edilmiştir.

Haberleşme Adresi: Kısmet, Esra Nurullahoğlu S.Ü.T.F. Farmakoloji A.B.D. Uzmanı

KONYA



EDRF'nin salıverilmesinde  $Ca^{++}$ (4) ve  $Mg^{++}$ (5) iyonlarının rolünün önemli olduğu ileri sürülmüştür. Nitekim, endoteli sağlam tavşan aortu ile yapılan bir perfüzyon çalışmasında, perfüzyon sıvısından  $Ca^{++}$ 'un çıkarılması ACh'e bağlı gevşeme cevaplarının oluşmasını engellemiştir (6). Ayrıca tavşan aortunda yapılan bir çalışmada (4) dokunun  $Ca^{++}$ 'suz ortamda inkübasyonu ile  $Ca^{++}$  ionoforu A23187'ye bağlı gevşeme cevaplarının inhibe olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle ekstraselüler  $Ca^{++}$ , EDRF'nin üretim ve/veya salıverilmesinde esas unsuru teşkil etmektedir (7,8).

Ekstraselüler  $Mg^{++}$  iyonları, köpek koroner arterlerinde ACh'in neden olduğu endotele bağlı gevşemede önemli bir yardımcı faktördür (9).  $Mg^{++}$ 'suz ortamda ACh'e bağlı gevşeme konsantrasyon-cevap eğrisinin önemli ölçüde inhibe olması, vasküler düz kas hücreleri üzerinde EDRF'nin etkili olabilmesi için  $Mg^{++}$  iyonunun ortamda gerektiğini telkin etmektedir (5). Hayvanlar üzerinde yapılan çok sayıda çalışmada  $Mg^{++}$ 'dan eksik diyetin myokard dejenerasyonuna neden olduğu gözlenmiş,  $Mg^{++}$ 'dan yoksun tutulan köpeklerde deneysel koroner spazm teşekkül etmiştir (10,11).

Yapılan bu çalışmada, tavşan torasik aortunda ACh ile stimüle edilen ve endotelden salıverilen gevşetici faktörün ortamdaki  $Ca^{++}$  ve  $Mg^{++}$  iyonlarının değişen konsantrasyonlarına ne ölçüde bağımlı olduğunu araştırmak amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOD

Erkek Yeni Zelanda türü beyaz tavşanlar (2-2.5 kg) karotis arterleri kesilerek öldürüldü. Göğüs açılarak torasik aorta özenle çıkarıldı. Krebs solüsyonu içine alınan arterler çevre dokulardan temizlenerek 2-3 mm eninde, 15-20 mm boyunda spiral şeritler halinde getirildi. Her defasında hazırlanan iki şeritten birinin endotel tabakası küçük ve yumuşak bir fırça yardımı ile hafifçe sürtülerek mekanik yolla tahrip edildi. Endotelin uzaklaştırıldığı histolojik tanı ile kanıtlandı. Preparatlar 25 ml Krebs-Hanseleit solüsyonu içeren, 37°C de ısıtılan ve %95 O<sub>2</sub>-%5 CO<sub>2</sub> karışımı ile sürekli gazlandırılan organ banyosuna asıldı. 2 g gerilim uygulanarak 120 dk dinlendirildi. Bu esnada dokular 15 dakikada bir yıkandı.

Endoteli sağlam dokular normal Krebs solüsyonunda önce  $10^{-9}$ M NA ile kasıldı, kümülatif konsantrasyonda ACh ilave edilip cevaplar gözlemlendi. Preparat tekrar dinlendirildi. Ortamın  $Ca^{++}$  konsantrasyonu yarıya indirilip aynı işlem tekrarlandı. Denemenin sonunda preparatlar Na<sub>2</sub>-EDTA içeren ortama alınarak 90 dakika beklendi. Yukarıda belirtilen işlemler endoteli tahrip edilen dokularda da aynı şekilde uygulandı.

Çalışmanın diğer bölümünde ise, endotelli ve endotelsiz dokularda NA'in oluşturduğu kasılma üzerine ACh'in etkisi normal solüsyon,  $Mg^{++}$  konsantrasyonu yarıya indirilerek hazırlanmış solüsyon ve  $Mg^{++}$  içermeyen solüsyonda araştırıldı.

Histolojik tanı için endotelli ve endotelsiz preparatlar standart formaldehit solüsyonu içerisine alınarak tespit edildi. Parafine gömüldü. Bloklama için demir blokaj yöntemi kullanıldı. Dokulardan 20 mikron kalınlığında kesitler hazırlandı Mikroskopik inceleme için kesitler, hematoksilin-eozin ile boyandı (12). Işık mikroskobu ile endotelli ve endotelsiz dokunun histolojik görünümü tespit edildi.

Besleyici solüsyon olarak Krebs-Hanseleit solüsyonu kullanıldı. Solüsyondaki  $Ca^{++}$  ve  $Mg^{++}$  konsantrasyonları yukarıda belirtildiği şekilde düzenlendi.

Kullanılan normal Krebs-Hanseleit solüsyonunun içeriği mM olarak şöyledir: NaCl 118.00, KCl 4.70, CaCl<sub>2</sub> 1.60, MgSO<sub>4</sub> 1.20, NaHCO<sub>3</sub> 24.90, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.20, Glukoz 11.10, Askorbik asid 0.28.



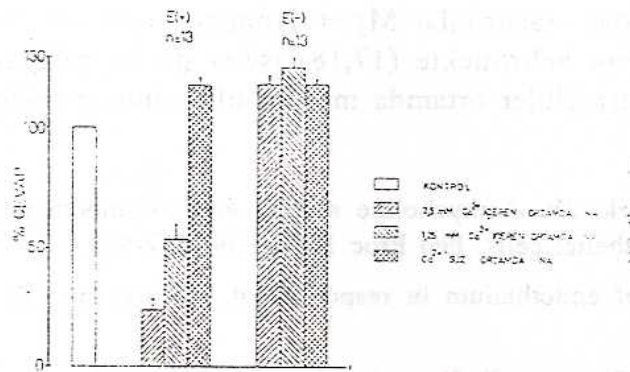
Deneylerde noradrenalin (Sigma) ve asetilkolin HCl (Haver) kullanıldı.

$Ca^{++}$  ve  $Mg^{++}$  iyonlarının değişen konsantrasyonları ile bu iyonların yokluğunda NA ile kasılan endotelli ve endotelsiz dokularda, ortama ilave edilen ACh'e bağlı cevaplar NA cevabının %'si olarak değerlendirildi. Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılık derecesi, Student'ın "t" testi ile hesaplandı (13). Grup içi analizlerde eşleştirilmiş ve gruplar arası analizlerde de eşleştirilmemiş test uygulandı.

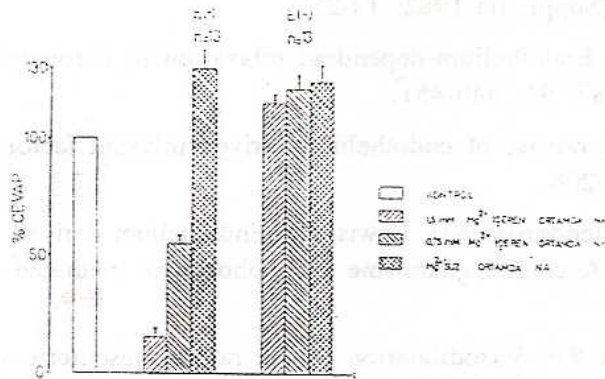
## BULGULAR

Endoteli sağlam ve endoteli uzaklaştırılan dokuya,  $10^{-9}M$  konsantrasyonunda uygulanan NA tekrarlanabilir nitelikte kısılmalar meydana getirdi. 2.5 mM ve 1.25 mM  $Ca^{++}$ 'lu ortamda endotelli dokuda, kümülatif konsantrasyonda uygulanan ACh, bu kısılmaları sırası ile  $76.17 \pm 4.29$ ,  $46.25 \pm 5.58$  oranında anlamlı olarak inhibe etti.  $Ca^{++}$ 'suz ortamda ise  $19.92 \pm 3.60$  oranında anlamlı olarak artırdı. Endotelsiz dokuda ise ACh, NA'e bağlı cevapları 2,5 mM  $Ca^{++}$  içeren ortamda  $25.71 \pm 5.98$  ve  $Ca^{++}$ 'suz ortamda ise  $16.79 \pm 1.52$  oranında anlamlı olarak artırıldı ( $p < 0.05$ ) (Şekil 1).

1.5 mM ve 0.75 mM  $Mg^{++}$  içeren ortamda endotelli dokuda NA'e bağlı kasılmalar kümülatif konsantrasyonda uygulanan ACh tarafından sırası ile  $84.92 \pm 4.81$ ,  $45.47 \pm 4.33$  oranında anlamlı olarak inhibe edilirken,  $Mg^{++}$ 'suz ortamda  $29.36 \pm 7.82$  oranında anlamlı olarak artırıldı. Endotelsiz dokuda ise NA'e bağlı cevapların ACh tarafından 1.5 mM  $Mg^{++}$  içeren ortamda  $20.98 \pm 5.87$  ve  $Mg^{++}$ 'suz ortamda da  $24.14 \pm 7.11$  oranında anlamlı olarak artırıldığı görüldü ( $p < 0.05$ ) (Şekil 2).



Şekil 1: Tavşan torasik aortunda, endotelli E(+) ve endotelsiz E(-) dokuda farklı  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu içeren ve  $Ca^{2+}$ 'suz ortamda NA'e bağlı kasılma üzerine ACh'in etkisi



Şekil 2: Tavşan torasik aortunda, endotelli E(+) ve endotelsiz E(-) dokuda farklı  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu içeren ve  $Mg^{2+}$ 'suz ortamda NA'e bağlı kasılma üzerine ACh'in etkisi



## TARTIŞMA VE SONUÇ

Sunulan bu çalışmada endoteli sağlam dokuda, normal  $Ca^{++}$ 'lu ortamda kümülatif konsantrasyonda uygulanan ACh,  $10^{-9}$ M NA'e verilen kasılma cevabını büyük ölçüde inhibe etmiş,  $Ca^{++}$  konsantrasyonu yarıya indirildiğinde inhibisyon da anlamlı ölçüde azalmış ve nihayet besleyici sıvı  $Ca^{++}$ 'suz iken inhibisyon görülmemiştir. Endotelsiz dokuda ise ACh ilavesi NA'e verilen kasılma cevabını her üç ortamda da anlamlı ölçüde artırmıştır. Uyarılma sonucu EDRF salıvermesinin ekstraselüler  $Ca^{++}$ 'un varlığına bağlı olduğu görülmüştür. Nitekim, tavşan aortunda perfüzyon suretiyle yapılan bir çalışmada, perfüzattan  $Ca^{++}$ 'un uzaklaştırılmasıyla EDRF salıverilmesinin inhibe olduğu bilinmektedir (6).

Çalışmanın endoteli sağlam doku ile yapılan ikinci bölümünde,  $Mg^{++}$  iyonun besleyici sıvıda normal konsantrasyonda bulunması durumunda NA'e bağlı kasılma cevabının ACh tarafından inhibe edildiği görülmüştür.  $Mg^{++}$  konsantrasyonun yarıya düşürülmesi ACh cevabında azalmaya ve  $Mg^{++}$ 'suz ortam ise ACh cevabının ortadan kalkmasına hatta ACh'e bağlı kasılma cevabı oluşmasına neden olmuştur. Endotelsiz dokuda ise ACh, NA'in oluşturduğu kasılmayı artırmış ve  $Mg^{++}$  yokluğunda bu cevap daha da belirginleşmiştir.

Çalışmada endotelsiz dokuya uygulanan ACh, NA'e bağlı kasılmaları artırmıştır. Araştırmacılar bunların ACh'e bağlı tipik kasılmalar olduğunu belirtmektedirler (14,15,16).

Tavşan aortunda NA'e bağlı kasılmaların ACh tarafından inhibe edilebilmesi için endotelin sağlam olmasının gerektiği görülmüştür. Ayrıca sağlam endotelli dokuda da ACh'in gevşeme yapabilmesi için ortamda  $Ca^{++}$  iyonunun bulunması gerektiği ortaya konmuştur. Her ne kadar araştırmacılar  $Mg^{++}$  iyonunun endotele bağlı gevşemedeki rolünün tam olarak bilinmediğini belirtmekte (17,18) iseler de bu çalışmada ACh'e bağlı gevşeme için bu iyonun da ekstraselüler ortamda mevcut olmasının gerektiği gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. Acetylcholine relaxes arterial smooth muscle by releasing a relaxing substance from endothelial cells. *Fed Proc* 1980a; 39: 557-573.
2. Furchgott RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 1983; 53: 557-573.
3. Busse R, Trogisch G, Bassenge E. The role of endothelium in the control of vascular tone. *Research in Cardiology* 1985; 80: 475-590.
4. Singer HA, Peach MJ. Calcium and endothelial mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta. *Hypertension* 4 (Suppl. II) 1982; 19-25.
5. Altura BM, Altura MA. Endothelium-dependent relaxation in coronary arteries requires magnesium ions. *Br J Pharmac* 1987; 91: 449-451.
6. Long JR, Stone JW. The release of endothelium-derived relaxant factor is calcium dependent. *Blood Vessels* 1985; 22: 205-208.
7. Collins P, Griffith TM, Henderson AH, Lewis MJ. Endothelium derived relaxing factor alters calcium fluxes in rabbit aorta: A cyclic guanosine monophosphate mediated effect. *J Physiol* 1986; 381: 427-437.
8. Carvalho MH, Furchgott RF. Vasodilatation of the rabbit mesenteric vascular bed by acetylcholine and A23187. *Pharmacologist* 1981; 23: 223.
9. Lloyd TI, James HF, Irvine C. Magnesium: Nature's physiologic calcium blocker. *American Heart Journal* 1984; 108: 188-193.

10. Altura BM Sudden-death ischemic heart disease and distary magnesium intake: Is the target site coronary vascular smooth muscle? *Med Hypothesas* 1979; 5: 843-848.
11. Turlapaty PDM, altura BM. Magnesium deficiency produces pasms of coronary arteries: Relationship to atiology of sudden death ischmeic heard disease. *Science* 1980; 208: 198-200.
12. Mikkelsen EO, Costa G, Nyborg NCB. Influence of endothelium on the response to calcium, potassium and noradrenaline in rat oarta. *Pharmacology and Toxicaology* 1988; 62: 22-28.
13. Goldstein A. *Biostatistics and Introductory Text*. New York: The Mc Millan Co, 1971.
14. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980b; 228: 373-376.
15. Furchgott RF. The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators. *Trends Pharmacol Sci* 1981; 2: 173-176.
16. Vanhoutte PM, Rubanyl GM, Miller MV, Houston DS. Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann Rev Physiol* 1986; 48: 307-320.
17. Ku D. Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. *Sicinece* 1982; 218: 576-578.
18. Ku D. Ann HS. Magnesium deficiency produces endothelium dependent vasorelaxation in canine coronary arteries. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1987; 241: 961-966.