

Tavşan trakea düz kasında β -adrenerjik reseptör agonistleri ve fosfodiesteraz inhibitörlerinin gevşetici etkilerinde K^+ –kanallarının rolü*

Ayşe Saide ŞAHİN, K.Esra ATALIK, Mehmet KILIÇ, Necdet DOĞAN

S.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı, KONYA

ÖZET

Tavşan trakea düz kasında yapılan bu *in vitro* çalışmada izoprenalin, salbutamol, teofilin ve aminofilin ile alınan gevşeme cevapları üzerine K^+ kanal blokörleri tetraetilamonyum (TEA) ve glibenklamidin inhibitör etkileri araştırılmıştır. Karbakol (10^{-6} M) uygulanarak kasılan dokularda, kümülatif tarzda ilave edilen izoprenalin (10^{-9} - 10^{-4} M), salbutamol (3×10^{-7} - 10^{-3} M), teofilin (10^{-9} - 10^{-4} M) ve aminofilin (10^{-9} - 10^{-4} M) doza bağımlı tarzda gevşeme cevapları oluşturmuş ve elde edilen % maksimum gevşeme değerleri sırasıyla % 87.83 ± 2.89 , % 75.83 ± 2.04 , % 73.33 ± 2.55 , % 69.83 ± 2.36 olarak bulunmuştur. Belirtilen ajanlara bağlı gevşeme cevaplarının K^+ kanal blokörleri TEA (10^{-4} M) ve glibenklamid (10^{-6} M) ile anlamlı olarak inhibe edildiği, izoprenalin ve salbutamol cevaplarının inhibisyon oranının daha yüksek olduğu görülmüştür. Kontrol EC_{50} değerleri karşılaştırıldığında gevşetici etki güçlerinin izoprenalin > aminofilin > teofilin > salbutamol şeklinde olduğu saptanmış ve K^+ kanal blokörleri bu ajanlar için bulunan doz cevap eğrilerini anlamlı olarak sağa kaydırmıştır. Sonuç olarak izole tavşan trakea düz kasında yapılan bu *in vitro* çalışmada beta-adrenerjik reseptör agonistleri izoprenalin ve salbutamolun bronkodilatör etkilerinin önemli ölçüde K^+ kanallarının aktivasyonu ile meydana geldiği, fosfodiesteraz inhibitörü olan teofilin ve aminofilinin bronkodilatör etkilerinde K^+ kanallarının daha az rol oynadığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler : Tavşan trakeası, izoprenalin, salbutamol, teofilin, aminofilin, K^+ kanal blokörleri

SUMMARY

The role of K^+ channels in β -adrenoceptor agonists- and phosphodiesterase inhibitors- induced relaxation in the rabbit tracheal smooth muscle

The aim of this *in vitro* study was to investigate the inhibitory effects of K^+ channel blockers, tetraethylammonium (TEA) and glibenclamide, on the isoprenaline-, salbutamol-, theophylline- and aminophylline- induced relaxation in the rabbit trachea.

In the tracheal strips pre-contracted with carbachol (10^{-6} M), isoprenaline (10^{-9} - 10^{-4} M), salbutamol (3×10^{-7} - 10^{-3} M), theophylline (10^{-9} - 10^{-4} M) and aminophylline (10^{-9} - 10^{-4} M) each produced concentration- dependent relaxation. Mean maximal relaxant responses to isoprenaline, salbutamol, theophylline and aminophylline in the tracheal strips were 87.83 ± 2.89 %, 75.83 ± 2.04 %, 73.33 ± 2.55 % and 69.83 ± 2.36 %, respectively. Relaxant responses of these agents were significantly inhibited by K^+ channel blockers, TEA (10^{-4} M) and glibenclamide (10^{-6} M). The inhibitory effects of K^+ channel blockers on theophylline- and aminophylline-induced relaxations were lower than those of isoprenaline and salbutamol. The rank order of potency of these compounds was isoprenaline > aminophylline > theophylline > salbutamol and K^+ channel blockers caused a displacement to the right of the dose response curves to these agents.

Results indicate that the K^+ channels play an important role in the relaxant effects of β -adrenoceptor agonists meanwhile their role in the theophylline- and aminophylline- induced relaxation is less.

Key Words : Rabbit trachea, isoprenaline, salbutamol, theophylline, aminophylline, K^+ channel blockers.

İzoprenalin ve salbutamolun β -adrenerjik reseptörleri aktive ederek, teofilin ve aminofilinin ise fosfodiesteraz enzimini inhibe ederek solunum yolu düz

kaslarında gevşeme oluşturduğu ve bu nedenle bronşial astma tedavisinde kullanıldıkları bilinmektedir (1,2). Hücre içinde siklik AMP miktarını

Haberleşme Adresi: Yrd.Doc.Dr.Ayşe Saide ŞAHİN, S.Ü.T.F.Farmakoloji Anabilim Dalı, KONYA

* XV. Ulusal farmakoloji kongresinde tebliğ edilmiştir.

artırmaları nedeniyle, bu ajanların oluşturduğu bronkodilatör etkinin esasen intraselüler kalsiyum sekestrasyonunda artma ve/veya hücre dışına kalsiyum çıkışındaki artışa bağlı olduğu kabul edilmekteydi (3,4). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda, solunum yolu düz kaslarının oldukça zengin bir şekilde K⁺ kanalları içerdiği ve hücre içine K⁺ iyonu girişini artırarak membranda hiperpolarizasyon oluşturan maddelerin de bronkodilatör etki gösterdiği saptanmıştır (5,6). Tavşan trakea düz kasında yapılan bir çalışmada, izoprenalin uygulanmasının sıklık AMP aracılığı ile K⁺ kanallarının açılmasını aktive ettiği ve bu şekilde bronkodilatasyon olduğu yayınlanmıştır (7). Diğer bir in vitro çalışmada ise kobay trakeasında izoprenalin ve salbutamolun K⁺ kanallarını açarak düz kaslarda hiperpolarizasyon oluşturduğu gösterilmiştir (8).

Tavşan trakea düz kasında yapılan bu in vitro çalışmada β-adrenerjik reseptör agonistleri izoprenalin, salbutamol ve fosfodiesteraz inhibitörleri teofilin ve aminofilinin oluşturduğu gevşemeler üzerine potasyum kanal blokörleri tetraetilamonyum (TEA) ve glibenklamidin etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Her iki sekse ait Yeni Zelanda türü erişkin tavşanlar (2- 2,5 kg) başlarına vurularak sersemletilip, a. carotisleri kesilmek suretiyle öldürüldü. Trakea çıkarılarak besleyici solüsyona alındı ve herbiri iki düz kas içerecek şekilde 3 mm eninde spiral şeritler hazırlandı. Dokular 37 °C'de Krebs-Henseleit solüsyonu içeren ve % 95 O₂- % 5 CO₂ karışımı ile sürekli gazlandırılan 25 ml hacminde organ banyosu içine alındı ve 1 g istirahat gerilimi uygulanarak 60 dk süreyle dengelenmeye bırakıldı. Alınan cevaplar izometrik olarak osilografa (Harvard) kaydedildi. Deneylerde kullanılan Krebs-Henseleit solüsyonunun içeriği (mM) olarak şöyledir: NaCl 119; KCl 4.7; MgSO₄ 1.5; KH₂PO₄ 1.2; CaCl₂ 2.5; NaHCO₃ 25; glukoz 11.

DeneySEL prosedür: Dengelenme periyodunun bitiminde ortama 10⁻⁶ M karbakol ilave edilerek kasılma cevapları alındı. Maksimum kararlı amplitüde ulaşıldıktan sonra ortama kümülatif tarzda izoprenalin (10⁻⁹-10⁻⁴ M), salbutamol (3x10⁻⁷-10⁻³ M), teofilin (10⁻⁹-10⁻⁴ M) veya aminofilin (10⁻⁹-10⁻⁴ M) ilave edilerek kontrol kümülatif konsantrasyon-cevap eğrileri elde edildi. Dokular 15 dakika aralıklarla bes-

leyici solüsyonla yıkandı. Ortama tekrar karbakol (10⁻⁶ M) ilavesiyle elde edilen kasılma cevabı kararlı amplitüde ulaşıldıktan sonra, çalışmada denenen K⁺ kanal blokörlerinden biri ile 20 dakika süreyle inkübasyon yapıldı ve yukarıda belirtilen gevşetici ajanlara verilen cevaplar tekrar elde edildi. Doku besleyici solüsyonla yıkandı ve aynı işlem kullanılan diğer K⁺ kanal blokörü maddenin varlığında da tekrarlandı. Çalışmada TEA 10⁻⁴ M ve glibenklamid 10⁻⁶ M konsantrasyonlarda denendi.

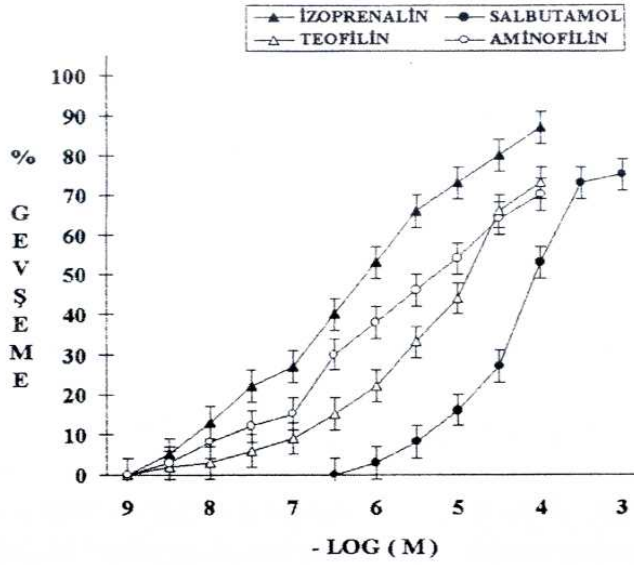
İstatistik: Çalışmada izoprenalin, salbutamol, teofilin ve aminofilin için % maksimum gevşeme ve EC₅₀ değerleri hesaplanarak veriler ortalama ± SH şeklinde belirtildi. Gruplararası karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi ve p<0.05 olması durumunda ise çoklu karşılaştırma için Tukey-HSD testi kullanıldı. Grup içi karşılaştırmalarda tekrarlı ölçümlerde varyans analizi kullanıldı ve p<0.05 olması durumunda çoklu karşılaştırmalar paired t testi ile yapıldı.

İlaçlar : İzoprenalin (Sigma), salbutamol (Sigma), teofilin (Sigma), aminofilin (Sigma), karbakol (Sigma), tetraetilamonyum (Sigma), glibenklamid (Sigma). Glibenklamidin stok solüsyonu (10⁻⁴ M) dimetilsülfoksit (DMSO) içinde, diğer ilaçlar ile glibenklamidin dilüsyonları distile suda hazırlandı.

BULGULAR

Tavşan trakea düz kasında karbakol ilavesiyle elde edilen kasılma cevaplarının tekrarlanabilir nitelikte olduğu ve zamana bağlı değişme görülmediği saptanmıştır. Ortama kümülatif tarzda uygulanan izoprenalin, salbutamol, teofilin veya aminofilin karbakole bağlı kasılma cevabını doza bağımlı tarzda inhibe etmişlerdir (Şekil 1). Bu ajanlar için bulunan % maksimum gevşeme değerleri Tablo 1'de gösterilmektedir. % Maksimum gevşeme değerleri karşılaştırıldığında izoprenalin ile oluşan maksimum gevşeme cevabı diğer üç ajana göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p < 0.05). Salbutamol, teofilin ve aminofilin ile oluşan maksimum gevşeme cevapları arasında ise anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Bu ajanlar için bulunan EC₅₀ değerleri Tablo 2'de gösterilmektedir. Kontrol EC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında gevşetici etki güçlerinin izoprenalin > aminofilin > teofilin > salbutamol şeklinde olduğu saptanmıştır.

K⁺ kanal blokörleri TEA (10⁻⁴ M) ve glibenklamid (10⁻⁶ M) , bu ajanlara bağlı maksimum gevşeme ce-



Şekil 1. Tavşan trakea düz kasında karbakol (10^{-6} M) ile oluşan kasılma cevapları üzerine izoprenalin, salbutamol, teofilin ve aminofilinin gevşetici etkileri. (n = 8)

Tablo 1. Karbakol (10^{-6} M) ile kasılan tavşan trakea düz kasında izoprenalin, salbutamol, teofilin ve aminofilin için bulunan % max. gevşeme değerleri ve TEA (10^{-4} M) veya glibenklamid (10^{-6} M) varlığında bu değerlerin değişimi.

* Kontrol değerlere göre ; $p < 0,05$

+ TEA ve glibenklamid varlığında teofilin ve aminofilin ile alınan değerlere göre; $p < 0,05$

Madde	Kontrol	TEA (10^{-4} M)	Glibenklamid (10^{-6} M)	n
İzoprenalin	87.83 ± 2.89	38.00 ± 2.22*+	45.67 ± 1.89*+	8
Salbutamol	75.83 ± 2.04	32.33 ± 2.84*+	44.50 ± 2.19*+	8
Teofilin	73.33 ± 2.55	54.67 ± 3.24*	59.83 ± 3.00*	8
Aminofilin	69.83 ± 2.36	51.33 ± 3.18*	53.50 ± 2.79*	8

Tablo 2. Karbakol (10^{-6} M) ile kasılan tavşan trakea düz kasında izoprenalin, salbutamol, teofilin ve aminofilin için bulunan EC_{50} (μ M) değerleri ve TEA (10^{-4} M) veya glibenklamid (10^{-6} M) varlığında bu değerlerin değişimi.

* Kontrol değerlere göre; $p < 0,05$

Madde	Kontrol	TEA (10^{-4} M)	Glibenklamid (10^{-6})	n
İzoprenalin	0.76 ± 0.13	3.52 ± 1.14*	4.16 ± 1.09*	8
Salbutamol	85.21 ± 31.33	130.68 ± 6.12*	135.49 ± 5.27*	8
Teofilin	14.60 ± 4.14	25.19 ± 3.47*	28.13 ± 5.61*	8
Aminofilin	5.74 ± 1.58	17.48 ± 3.58*	14.33 ± 2.47*	8

vaplarını değişen oranlarda ve anlamlı olarak inhibe etmişlerdir (Tablo 1). K⁺ kanal blokörlerinin izoprenalin ve salbutamole bağlı maksimum gevşeme cevapları üzerine olan inhibitör etkileri, teofilin ve aminofilinle oluşan gevşeme cevaplarının inhibisyonuna oranla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (p<0.05). K⁺ kanal blokörü maddelerin varlığında izoprenalin, salbutamol, teofilin ve aminofilin için bulunan EC₅₀ değerlerinin anlamlı olarak sağa kaydığı saptanmıştır (p<0.05; Tablo 2).

Glibenklamid ile yapılan çalışmalarda bu maddeyi eritmek amacıyla kullanılan dimetilsülfoksitin banyodaki konsantrasyonu ile yapılan solvent kontrolü denemelerinde, solvante ait bir etki gözlenmemiştir.

TARTIŞMA

Solunum yolu düz kaslarında bulunan muskarinik reseptörlerin endojen kaynaklı olan veya eksojen olarak uygulanan agonist maddelerle aktive edilmesiyle bu düz kaslı yapılarda kasılma olduğu ve bronşial astma gibi bazı solunum yolu hastalıklarında oluşan bronkospazmda kolinerjik hiperaktivitenin de önemli rolü olduğu bilinmektedir (9,10). Tavşan trakea düz kasında yapılan bu çalışmada da kasıcı ajan olarak muskarinik reseptör agonisti karbakol kullanılmış ve karbakolle kasılan dokularda nonselektif β-adrenerjik reseptör agonisti izoprenalin ve β₂-selektif etkili salbutamol ile fosfodiesteraz inhibitörleri teofilin ve aminofilinin doza bağımlı tarzda gevşeme oluşturdukları görülmüştür. Bu ajanlar için bulunan EC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında gevşetici etki güçlerinin izoprenalin > aminofilin > teofilin > salbutamol şeklinde olduğu saptanmıştır. % Maksimum gevşeme değerleri karşılaştırıldığında ise izoprenalin diğer üç ajana göre daha etkin bulunmuştur. Farklı türlerden alınan trakea ve bronş düz kası preparatlarında izoprenalin, salbutamol ve rolipramın gevşetici etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada kobay ve dana trakea düz kasında β-adrenerjik reseptör agonistleri olan izoprenalin ve salbutamolun potensleri arasında anlamlı bir fark bulunmamış ancak fare trakea ve domuz bronş düz kaslarında salbutamolun izoprenaline göre daha az etkili olduğu gösterilmiştir. Fosfodiesteraz inhibitörü rolipram ise kobay ve dana trakea düz kas preparatlarında izoprenalin ile eşit etkinlik gösterdiği halde, fare trakea ve domuz bronş düz kaslarında izoprenalinden daha az etkin bulunmuş ve araştırmacılar β-adrenerjik reseptör tipleri ve fos-

fodiesteraz enzim aktiviteleri yönünden türler arasında farklılık olabileceğini öne sürmüşlerdir (11).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda solunum yolu düz kaslarının yoğun bir şekilde K⁺ kanalları içerdiği saptanmış ve ATP'ye duyarlı bulunan veya Ca²⁺ ile aktive edilen K⁺ kanallarının agonisti olan maddelerin belirtilen yapılarda gevşeme oluşturduğu gösterilmiştir (6, 12). β-Adrenerjik reseptör agonistleri ile yapılan çalışmalarda bu ajanların bronkodilatör etkilerinde ikinci ulak görevi yapan siklik AMP'nin K⁺ kanallarının açılmasını sağlayarak düz kas membranında hiperpolarizasyon oluşturduğu öne sürülmüştür (13,14). Huang ve ark. nın kobay trakea düz kasında yaptıkları bir çalışmada, kasıcı ajan olarak asetilkolin kullanılmış ve salbutamole bağlı gevşeme cevaplarının K⁺ kanal blokörleri TEA, karibdotoksin ve iberotoksin ile inhibe edildiği gösterilmiştir (15). Benzer şekilde, kobay trakea düz kasında yapılan diğer bir çalışmada da karbakolle kasılan dokularda izoprenalin ve salbutamol ile oluşan gevşeme cevaplarının K⁺ kanal antagonisti karibdotoksinle bloke edildiği yayınlanmıştır (16).

TEA'un 2mM'a kadar olan konsantrasyonlarda Ca²⁺ ile aktive edilen K⁺ kanallarını bloke ettiği (17), glibenklamidin ise ATP'ye bağımlı K⁺ kanal blokörü olduğu bilinmektedir (18). Sunulan bu çalışmada kullanılan TEA ve glibenklamidin, izoprenalin, salbutamol, teofilin ve aminofilinle bağımlı gevşeme cevaplarını anlamlı olarak inhibe ettiği görülmüştür. Bu bulgu tavşan trakea düz kasında hem Ca²⁺ ile aktive edilen hem de ATP'ye duyarlı olan K⁺ kanallarının bulunduğunu göstermektedir. Çalışmada kullanılan iki farklı K⁺ kanal blokörü, izoprenalin ve salbutamole bağımlı gevşeme cevaplarını teofilin ve aminofilinle oluşan gevşemelere göre daha güçlü bir şekilde inhibe etmişlerdir. Nitekim teofilin ve aminofilinin düz kas hücrelerinde fosfodiesteraz enzimini inhibe ettikleri ve dolayısıyla β-adrenerjik reseptör agonistlerinden farklı bir mekanizma ile, hücre içinde siklik AMP miktarını artırdıkları bilinmektedir (11). Çalışmada kullanılan her iki K⁺ kanal blokörünün fosfodiesteraz enzim inhibitörleriyle oluşan gevşeme cevaplarını, β-adrenerjik reseptör agonistleri ile elde edilen gevşeme cevaplarına oranla daha az inhibe etme özellikleri, bu maddelerin etkisiyle oluşan siklik AMP miktarındaki artışın ve dolayısıyla açılan K⁺ kanalı sayısının farklı olmasına bağlı olabilir.

Sonuç olarak izole tavşan trakea düz kasında yapılan bu in vitro çalışmada, β -adrenerjik reseptör agonistleri izoprenalin ve salbutamolun bronkodilatör etkilerinin önemli ölçüde K^+ kanallarının aktivasyonu ile meydana geldiği, fosfodiesteraz inhibitörü olan teofilin ve aminofilinin bronkodilatör etkilerinde ise K^+ kanallarının daha az rol oynadığı saptanmıştır. Bron-

kodilatör olarak kullanılan bu ajanların etkilerinde K^+ kanallarının rolünün bulunması bu kanalları aktive eden maddelerin bronkodilatör etkileri potansiyalize edebileceğini düşündürmektedir. Ancak bunun ortaya konulabilmesi için ilave çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Bergendal A, Linden A, Lötvall J, Skoogh BE, Löfdahl CG. Different effects of salmeterol, formoterol and salbutamol on cholinergic responses in the ferret trachea. *Br J Pharmacol*, 1995; 114: 1478-82.
- Torphy TJ and Undem BJ. Phosphodiesterase inhibitors: new opportunities for the treatment of asthma. *Thorax*, 1991; 416: 512-23.
- Giembycz MA and Raeburn D. Putative substrates for cyclic nucleotide-dependent protein kinases and the control of airway smooth muscle tone. *Auton Pharmacol* 1991; 11: 345-8.
- Felbel J, Trockur B, Ecker T, Landgraf W, Hoffmann F. Regulation of cytosolic calcium by c AMP and c GMP in freshly isolated smooth muscle cell from bovine trachea. *J Biol Chem* 1988; 263:16764-71.
- Chapman ID, Kristersson A, Mathelin G, Schaeublin E, Mazzoni L, Boubekeur K, et al. Effects of a potassium channel opener (SDZ PCO 400) on guinea-pig and human pulmonary airways. *Br J Pharmacol* 1992; 106: 423-9.
- Cook SJ, Archer K, Martin A, Buchheit KH, Fozard JR, Müller T, et al. Further analysis of the mechanisms underlying the tracheal relaxant action on SCA 40. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 143-51.
- Kume H, Takai A, Tokano H, Tomita T. Regulation of Ca^{2+} -dependent K^+ -channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. *Nature* 1989; 341: 152-4.
- Cook SJ, Small RC, Berry JL, Chiu P, Downing SJ, Foster RW. β -Adrenoceptor subtypes and the opening of plasmalemmal v -channels in trachealis muscle: electrophysiological and mechanical studies in guinea-pig tissue. *Br J Pharmacol* 1993; 109:1140-8.
- Richardson JB. Nerve supply to the lungs. *Amer Rev Resp Dis* 1979; 119: 785-802.
- Barnes PJ. Cholinergic control of airway smooth muscle. *Amer Rev Resp Dis* 1987; 136: 42-5.
- Tomkinson A, Karlsson JA, Raeburn D. Comparison of the effects of selective inhibitors of phosphodiesterase types III and IV in airway smooth muscle with differing β -adrenoceptor subtypes. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 57-61.
- Kamei K, Nabata H, Kuriyama H, Watanabe Y, Itoh T. Effect of KC 399, a newly synthesized K^+ channel opener, on acetylcholine-induced electrical and mechanical activities in rabbit tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 1493-1501.
- Barnes PJ. Beta-adrenergic receptors and their regulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:838-60.
- Vaali K, Liang L, Vapaatalo H. Interactions between β_2 -adrenoceptor agonist and NO donors in the relaxation of guinea pig trachea in vitro. *Eur J Pharmacol* 1998; 363: 167-74.
- Huang JC, Garcia ML, Reuben JP and Kaczorowski GJ. Inhibition of β -adrenoceptor agonist relaxation of airway smooth muscle by Ca^{2+} -activated K^+ channel blockers. *Eur J Pharmacol* 1993; 235: 37-43.
- Jones TR, Charette L, Garcia ML, Kaczorowski GJ. Selective inhibition of relaxation of guinea-pig trachea by charybdotoxin, a potent Ca^{2+} -activated K^+ channel inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255: 697-701.
- Clapp LH, Turcato S, Hall S, Baloch M. Evidence that Ca^{2+} -activated K^+ channels play a major role in mediating the vascular effects of iloprost and cicaprost. *Eur J Pharmacol* 1998; 356: 215-24.
- White R, Hiley CR. Effects of K^+ channel openers on relaxations to nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol* 1998; 357: 41-