

İZOLE SIÇAN ATRİYUMUNDA ADENOZİNİN OLUŞTURDUĞU NEGATİF KRONOTROP ETKİDE NİTRİK OKSİDİN ROLÜ

Şule KALKAN, Yeşim TUNÇOK

D.E.Ü.Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Adenozin kardiyovasküler sistemde negatif kronotrop, dromotrop ve inotrop etkiye neden olan endojen bir nükleotiddir. Adenozin farmakolojik etkilerini P_1 purinerjik reseptör alt tiplerinden olan A_1 , A_2 , A_3 reseptörleri üzerinden gösterir. Damar endotelinden sürekli olarak salınan nitrik oksid de (NO), kalpte negatif inotrop, negatif kronotrop etkiye neden olan ve damar direncinin fizyolojik düzenlenmesine katkıda bulunan vazovaktif otakoidlerdendir.

Çalışmamızda izole sıçan atriyumunda adenozinin neden olduğu negatif kronotrop etkiye NO'nun rolü araştırıldı. Adenozin spontan atan sıçan atriyumunda konsantrasyona bağımlı olarak atım hızını azaltarak, negatif kronotrop cevap oluşturdu. Adenozinin negatif kronotrop etkisi, L-argininden NO oluşumunu kompetitif olarak inhibe eden L-NAME (10^{-5} M ve 10^{-4} M) ile anlamlı derecede azaldı.

Bu sonuçlar, spontan atan izole sıçan atriyumunda adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop etkiye NO'nun rolü olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: İzole sıçan atriyumu, Adenozin, Negatif kronotrop etki, Nitrik oksid (NO)

Kardiyovasküler sistemde, negatif inotrop, negatif kronotrop ve negatif dromotrop etkiye neden olan adenozin çeşitli fizyolojik olayların düzenlenmesinde rolü olan endojen bir nükleotiddir. Adenozinin bilinen farmakolojik etkilerini, purinerjik reseptörlerden P_1 reseptörlere giren ve hücre membranında bağlı olarak bulunan A_1 , A_2 , A_3 reseptörleri üzerinden gösterdiği kanıtlanmıştır (1,2). Adenozin A_1 reseptörlerinin aktivasyonu negatif inotrop, negatif kronotrop ve negatif dromotrop etki ile ilişkilidir (3). Adenozin A_2 reseptörlerinin

SUMMARY

Adenosine is an endogenous nucleoside that produces negative chronotropic, dromotropic and inotropic effects on the cardiovascular system. Pharmacological effects of adenosine are produced via the A_1 , A_2 , A_3 subclasses of P_1 -purinoceptor. Nitric oxide (NO) which is released continuously from the vascular endothelium is a variety of vasoactive autacoids which develops negative chronotropic and negative inotropic effects on the heart. It also plays a role in the physiologic regulation of vascular resistance.

In the present study, we investigated the role of nitric oxide on the negative chronotropic effect of adenosine in the isolated rat-atria. Adenosine induced a concentration-dependent reduction in the beating rate of the isolated atria and produced negative chronotropic effect. The negative chronotropic effect of adenosine was significantly reduced by L-NAME (10^{-5} M and 10^{-4} M), a competitive inhibitor of the synthesis of NO from L-Arginine.

These results suggest that production of NO plays a role in the negative chronotropic effect induced by adenosine in a spontaneously beating isolated rat-atria.

Key words: Isolated rat-atria, Adenosine, Negative chronotropic effect, Nitric oxide (NO)

aktivasyonu ise koroner ve periferik vazodilatasyonla sonuçlanır. A_{2a} ve A_{2b} diye sınıflandırılan A_2 reseptörlerden, özellikle A_{2b} reseptörlerinin vazodilatasyondan sorumlu olduğu gösterilmiştir (4). İlk olarak 1993 yılında Amanda ve arkadaşları adenozinin düz kaslarda oluşturduğu vazodilatör etkiden A_2 reseptörlerinin sorumlu olduğunu ve bu vazodilatör cevabın bir kısmının nitrik oksid ile ilişkili olabileceğini göstermişlerdir (5). Bazal durumda damar endotelinden sürekli olarak salıverildiği rapor edilen NO'nun vazodilatör tonus oluşturup

damar rezistansının fizyolojik düzenlenmesine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (6). Damar üzerindeki etkilerine ilave olarak çeşitli nonvasküler yapılar üzerinde de etkisi araştırılan NO'nin de kalp üzerinde negatif kronotrop ve negatif inotrop etkisi olduğu bildirilmektedir (7).

Bu araştırma, izole sıçan atriyumunda adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop etkide nitrik oksidin rolünü araştırmak üzere planlanmıştır.

YÖNTEM

Çalışmada, aynı laboratuvar koşullarında yetiştirilmiş, 250-300 g ağırlığında, erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar servikal dislokasyon ile öldürüldükten sonra göğüs kafesi açılarak çıkarılan kalp, modifiye Hukovich Krebs Solüsyonu içeren (mM olarak: NaCl 112,8; KCl 4,7; MgSO₄ 7H₂O 2,5; CaCl 4,5; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; Glukoz 11,5 içermektedir ve pH:7,4) petri kutusuna alındı (8). Sağ ve sol atriyum birlikte zedelenmeden hızlı bir şekilde kalp dokusundan temizlendi. İzole sıçan atriyumu, 37° C de % 95 O₂ + %5 CO₂ ile gazlandırılmış olan Modifiye Hukovich Krebs' solüsyonu içeren 30 ml'lik organ banyosuna asıldı. Her bir preparata 0,4 g gerilim uygulanarak, en az 45 dakika dinlenme periyoduna bırakıldı. Dinlenme periyodu süresince her 15 dakikada bir organ banyosu içerisindeki solüsyon taze Modifiye Hukovich Krebs solüsyonu ile değiştirildi. Spontan atan izole sıçan atriyumunda, atım hızında meydana gelen değişiklikler Grass 7 F Poligrafa bağlı bir izometrik gerilim transduseri (Grass 7 PT 03E force-displacement transdüser) aracılığı ile yazdırıldı (8).

Dengelenme süresinden sonra, deneye başlamadan önce spontan atan atriyumun atım hızı ölçüldü. 280/ dk'nın üzerinde atan atriyumlar çalışmaya alındı. Daha sonra organ banyosuna kümülatif olarak adenozin (10⁻⁹ M- 10⁻¹ M) ilave edilerek kontrol adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi elde edildi. Her bir adenozin dozu arasında bir dakika beklendi (9). Adenozine desensitizasyon gelişip gelişmediği, kümülatif olarak adenozin uygulamasının başında ve sonunda dokunun 10⁻⁶ M izoproterenole cevaplarına bakılarak kontrol edildi.

Çalışmanın diğer bölümünde adenozin konsantrasyon-cevap eğrisinde, NO'nin etkisi araştırıldı. Bunun için izole atrium önce NO-sentaz inhibitörü L-NAME'e (N-nitro-L-arginine methylester) sırasıyla 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M ve 10⁻⁴ M konsantrasyonda 20 dakika süreyle maruz bırakıldı (5). Daha sonra kümülatif adenozin ilave edilerek adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi elde edildi. Bu cevaplar kontrol adenozin konsantrasyon- cevap eğrileri ile karşılaştırıldı.

Verilerin analizinde varyans analizi (ANOVA), onu izleyen post-hoc testler (TUKEY-KRAMER) ve unpaired t-testi kullanıldı (Graphpad Instat V2.05a-1994). Bulgular ortalama ± SH (standart hata) şeklinde gösterildi. p< 0,05 olması durumunda aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çalışmaya başlamadan önce adenozin deiyonize su ile çözülerek, 10⁻² M konsantrasyonda stok solüsyon hazırlandı ve kullanılacağı gün Modifiye Hukovich Krebs solüsyonu ile dilüe edildi (10). Kullanılan ilaçların elde edildiği

kaynaklar: Adenozin (Merck, ABD), L-NAME (Sigma[®], ABD), İzoproterenol (Sigma[®], ABD).

BULGULAR

Çalışmaya alınan izole sıçan atriyumlarının ortalama spontan atım hızları 302.5 ± 5.0 /dakika olarak hesaplandı. Tek başına adenozin (10^{-9} M - 10^{-4} M) denenen grup ile, L-NAME ile inkübasyondan sonra adenozin (10^{-9} M - 10^{-4} M) denenen grupların, spontan atan atriyumlarının başlangıç atım hızları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Spontan atan izole sıçan atriyumunda adenozin konsantrasyonuna (10^{-9} M - 10^{-4} M) bağımlı olarak negatif kronotrop etki oluşturdu (Şekil 1). Sonuçlar atriyumun başlangıç atım hızı %100 kabul edilip, adenozin cevabının buna göre yüzdesi alınarak bulunmuştur. 10^{-4} M adenozin konsantrasyonu ile maksimum inhibisyon cevabı elde edildi. pIC_{50} değerleri 5.7 ± 0.1 bulundu ($n=6$)(Tablo 1).

Adenozin konsantrasyon cevap eğrisinde, NO in etkisini değerlendirmek için izole atriyum önce NO-sentaz inhibitörü L-NAME ile (10^{-5} M, 10^{-3} M ve 10^{-4} M konsantrasyonda) inkübe edildi. Artan L-NAME konsantrasyonu ile beraber pIC_{50} değerlerinde adenozin konsantrasyon ce-

vap eğrisine göre azalma olduğu bulundu (Tablo 1). Bu gruplarda , adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevaplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=8.564$, $p=0.0007$).

10^{-6} M L-NAME varlığında elde edilen adenozin konsantrasyon- cevap eğrisinin pIC_{50} değeri 5.7 ± 0.1 bulundu ($n=6$)(Tablo 1). 10^{-6} M L-NAME varlığında elde edilen adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi ile kontrol adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 1).

10^{-5} M L-NAME varlığında elde edilen adenozin konsantrasyon cevap eğrisinin pIC_{50} değeri 4.9 ± 0.2 bulundu ($n=6$)(Tablo 1). 10^{-5} M L-NAME varlığında elde edilen adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi ile kontrol adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$) (Şekil 1).

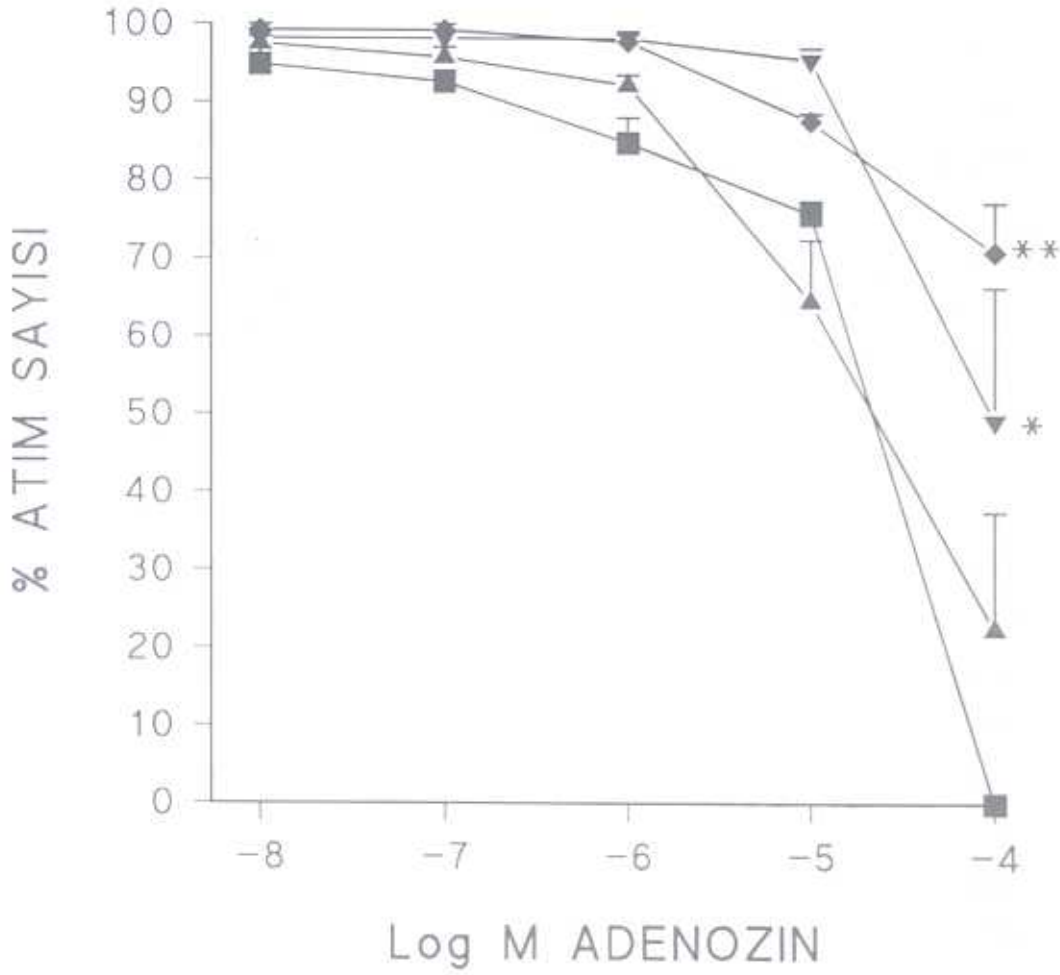
10^{-4} M L-NAME varlığında elde edilen adenozin konsantrasyon- cevap eğrisinin pIC_{50} değeri 5.1 ± 0.1 bulundu ($n=6$)(Tablo 1). 10^{-4} M L-NAME varlığında elde edilen adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi ile kontrol adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$) (Şekil 1).

Tablo 1: Adenozin cevabı üzerine L-NAME'nin etkisi

İLAÇ	pIC_{50}
ADENOZİN (10^{-9} M- 10^{-4} M) (kontrol) (n=6)	5.7 ± 0.1
10^{-6} M L-NAME+ ADENOZİN (10^{-9} M- 10^{-4} M) (n=6)	5.7 ± 0.1
10^{-5} M L-NAME+ ADENOZİN (10^{-9} M- 10^{-4} M) (n=6)	$4.9 \pm 0.2^*$
10^{-4} M L-NAME+ ADENOZİN (10^{-9} M- 10^{-4} M) (n=6)	$5.1 \pm 0.1^{**}$

*Kontrolle göre $p<0.01$

**Kontrolle göre $p>0.05$



Şekil 1: Adenozinin spontan atan izole sıçan atriyumunda oluşturduğu negatif kronotrop cevabta L-NAME'in etkisi. Kontrol adenozin cevabı (n=6), (▲) 10⁻⁶ M L-NAME varlığında adenozin cevabı (n=6), (▼) 10⁻⁵ M L-NAME varlığında adenozin cevabı (n=6), (◆) 10⁻⁴ M L-NAME varlığında adenozin cevabı (n=6).

(*Kontrolle göre p<0.01, **Kontrolle göre p<0.05)

10⁻⁵ M ve 10⁻⁴ M L-NAME varlığında adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevap ile 10⁻⁶ M L-NAME varlığında adenozinin oluşturduğu cevaplar arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulundu. (Sırasıyla p<0.01, p<0.05). 10⁻⁵ M L-NAME ve 10⁻⁴ M L-NAME varlığında adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevap arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05)

TARTIŞMA

Adenozin, A₁ reseptörlerinin aktive ederek, indirekt antiadrenerjik etki ile, potasyum iletiminde artmaya neden olarak veya yavaş kalsiyum kanallarından kalsiyum girişini engelleyerek kardiyovasküler sistemde negatif inotrop, negatif kronotrop ve negatif dromotrop etki gösterir (3, 11, 12).

Yaptığımız çalışmada da, adenozin ile spontan

atan izole sıçan atriyumunda konsantrasyona bağımlı olarak negatif kronotrop cevap elde edildi. Farklı araştırmacılar tarafından kobay atriyum (13, 14), sıçan atriyum (15) ve insan atriyum (16) ile yapılan çalışmalarda da adeno- zinin konsantrasyona bağımlı olarak negatif kronotrop cevap oluşturduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda adenozin konsantrasyon cevap eğrisinin pIC_{50} değeri 5.7 ± 0.1 bulundu. Bu sonuç, 1974 yılında Küçükhüseyin ve arkadaşla- rının kobay atriyumunda (13), 1981 yılında Kurashlı ve arkadaşlarının sıçan atriyumunda (15), 1986 yılında Marmo ve arkadaşlarının ise insan atriyumunda (9) adenozin ile yaptıkları çalışmaların sonuçları ile uyumlu bulundu.

Adenozinin neden olduğu vazodilatör etkide NO'nin rolü olduğunu ileri süren çalışmalar yapılmıştır. İlk olarak Amada ve ark. adenozin ve analoglarının, kobay koroner arterinde A₂ reseptörleri üzerinden oluşturduğu vazodilatör cevabın L-NAME varlığında anlamlı derecede azaldığını göstererek, adenozinin düz kaslarda oluşturduğu vazodilatör cevabın bir kısmından nitrik oksidin sorumlu olabileceğini ileri sürmüşlerdir (5). Fenton ve ark. da, domuz karotis arteri ve insan safen veni endotel hücrelerinde yaptıkları çalışma ile adenozinin NO düzeyinde artış oluşturduğunu ve bu artışın kompetitif NO sentaz inhibitörü NG-monometil-L-arginin (L-NMMA) ve adenozin A₁ reseptör antagonisti teofilin varlığında önlendiğini göstermişlerdir. Bu sonuçlara

dayanarak adenozinin, reseptöre bağımlı bir mekanizma ile nitrik oksid üretimini artırdığını bildirmişlerdir (16). Domuz koroner arterinde (17) ve sıçan renal arterinde (18) adenozin ve analoglarının oluşturduğu vazodilatör cevapların L-NAME varlığında inhibe olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmalar adenozinin kalp üzerindeki etkisinde, negatif kronotrop ve inotrop etkisi olduğu ileri sürülen NO'nin rolü olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda spontan atan izole sıçan atriyumunda adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop etkide NO'nin rolünü araştırmak için NO - sentaz inhibitörü L- NAME (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M) kullandık. 10^{-5} M L-NAME varlığında adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevapta istatistiksel olarak anlamlı bir değişme saptanmazken, 10^{-4} M ve 10^{-3} M L-NAME varlığında adenozin ile oluşan negatif kronotrop cevabın istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalması adenozin ile spontan atan izole sıçan atriyumunda oluşan negatif kronotrop cevaba, NO (nitrik oksid) salınımının katkıda bulunabileceğini düşündürdü.

Sonuç olarak; adenozin spontan atan izole sıçan atriyumunda konsantrasyona bağımlı olarak negatif kronotrop cevap oluşturdu. Adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevabın NO - sentaz inhibitörü L - NAME varlığında azalması, adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop etkide nitrik oksidin rolü olduğunu düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Anon: Adenosine revisited. *Lancet* 1985;2:927-928.
2. Van Galen PJM, Van Bergen AH, Gallo Rodriguez G, Melman N, Olah ME, Ijzerman AP, Stiles GL, Jacobson KA. A binding site model and structure activity relationships for the rat A_1 adenosine receptor. *Mol Pharmacol* 1994;45: 1101-1111.
3. Evans DB, Schenden JA, Bristol JA. Adenosine receptors mediating cardiac depression. *Life Sci* 1982; 31: 2425- 2432.
4. Webb RL, Mc Neal RB, Barclay BW, Yasay GD. Hemodynamic effects of adenosine agonists in the conscious spontaneously hipertensive rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254: 1090- 1099.
5. Vials A, Burnstock G. A_2 purinoceptor- mediated relaxation in the guinea- pig coronary vasculature: a role for nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1993; 109: 424- 429.
6. Prof.Dr. Kayaalp O. Otakoidler: In: Rasyonel Tedavi Yönteminden Tıbbi Farmakoloji Cilt 3, 6. Baskı, Ankara; 1993; 2897- 3029.
7. Fort S, Lewis MJ. Regulation of myocardial contractile performance by sodium nitroprusside in the isolated perfused heart of the ferret. *Br J Pharmacol* 1991;102: 351.
8. Küçükhüseyin C. The model of the electrophysiological actions of adenosine in mammalian cardiac muscle and it's interaction with theophylline and external calcium. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1979;4:127- 135.
9. Marmo E, Filippelli A, Iarussi D, Matera C, Lampa E, Acampora R, Soreca S, Tortora S. Experimental documentation of presence of purinergic receptors at human atria. *Int J Tiss Reac* 1986; 5: 411-419.
10. Clarke C and et al: The preparation and use of adenosine injection. *Pharm J* 1990;244:595-597.
11. Di Marco JP, Sellers ID, Berne RM. Adenosine: electrophysiologic effects and therapeutic use for terminating supraventricular tachycardia. *Circulation* 1983; 68: 1254- 1263.
12. Belardinelli L, Isenberg G. Isolated atrial myocytes: adenosine and acetylcholine increase potassium conductance. *Am J Physiol* 1983; 244: 734- 737.
13. Küçükhüseyin C, Kayaalp O. Enhancement of the muscular effects of adenosine by Lidoflazine and Dipyridamole in isolated atria. Reprinted from *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 1974; 2: 208.
14. Collis MG. Evidence for an A_1 - adenosine receptor in the guinea- pig atrium. *Br J Pharmacol* 1983; 78: 207- 212.
15. Kurashi K, Paton DM. Structure- activity relations for negative chronotropic action of adenosine in rat atria. *Br J Pharm* 1981; 74: 829.
16. Li JM, Fenton RA, Cutler BS, Dobson JG. Adenosine enhances nitric oxide production by vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1995; 269(2 Pt1): C 519-23.
17. Olanrewaju HA, Hargittai PT, Lieberman EA, Mustafa SJ. Role of endothelium in hiperpolarization of coronary smooth muscle by adenosine and its analogues. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25: 234-239.
18. Martin PL, Potts AA. The endothelium of rat renal artery plays an obligatory role in A_2 adenosine receptor mediated relaxation induced by 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine and N6- cyclopentyladenosine. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270: 893-899