

70277

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**İZOLE SIÇAN ATRİYUMUNDA
ADENOZİNİN OLUŞTURDUĞU NEGATİF
KRONOTROP ETKİDE NİTRİK OKSİDİN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Şule KALKAN

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

İZMİR - 1998

ÖNSÖZ

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmalarımın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde ilgi ve yardımlarını gördüğüm sayın hocam Prof.Dr. Hülya GÜVEN'e,
Eğitimime yaptıkları katkılardan ve yakın ilgilerinden dolayı Doç.Dr. Yeşim TUNÇOK ve Doç.Dr. Sedef GİDENER'e,
Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma,
Ve tezimin hazırlanması sırasında yardım ve desteklerini gördüğüm eşim Dr.Hüseyin KALKAN'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Şule KALKAN

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ ve AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
A. ORGAN BANYOSU	3
B. İZOLE ATRİYUM PREPARATLARI	5
C. RESEPTÖR KAVRAMI	6
D. AGONİST VE ANTAGONİST İLAÇ	10
E. FARMAKOLOJİK ANTAGONİZMA	10
F. KONSANTRASYON - CEVAP EĞRİSİ	11
G. ADENOSİN	14
H. NİTRİK OKSİD (NO)	24
III. GEREÇ VE YÖNTEM	38
IV. BULGULAR	42
V. TARTIŞMA	48
VI. SONUÇ	51
VII. ÖZET	52
VIII. KISALTMALAR	54
IX. KAYNAKLAR	55

I.GİRİŞ VE AMAÇ

Kardiyovasküler sistemde, negatif inotrop, negatif kronotrop ve negatif dromotrop etkiye neden olan adenozin çeşitli fizyolojik olayların düzenlenmesinde rolü olan endojen bir nükleotittir. Adenozinin bilinen farmakolojik etkilerini, pürinerjik 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 aktivasyonu ise koroner ve periferik vazodilatasyonla sonuçlanır. Özellikle A_{2a} reseptörlerinin vazodilatasyondan sorumlu olduğu gösterilmiştir (4).

1974 yılında Küçük Hüseyin ve arkadaşları kobay atriyumunda yaptıkları çalışmada adenozinin atriyumun atım hızı ve kasılma gücünü azalttığını göstermişlerdir (5). Kurahashi, sıçan atriyumunda adenozinin negatif kronotrop etkisinden A_1 reseptörlerinin sorumlu olduğunu bildirmiştir (6). Collis ve arkadaşları ise kobay atriyumunda yaptıkları bir diğer çalışmada, hücre yüzeyinde A_1 sub-tipi reseptörlerin bulunduğunu ve adenozinin A_1 reseptörler üzerinden etki ederek kobay atriyumunda kasılma gücünde azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir (7). Yine 1986 yılında Marmo ve arkadaşları, insan atriyumunda yaptıkları çalışmada ATP ve adenozinin negatif kronotrop ve negatif inotrop etkileri olduğunu ve bu inhibitör etkileri P_1 ve P_2 reseptörler üzerinden yaptıklarını bildirmişlerdir (8).

Yapılan çalışmalarda, çeşitli sistemlerde adenozinin etkilerini NO üzerinden gösterdiği kanıtlanmıştır. 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 (9). NO'nin bazal durumda damar endotelinden sürekli olarak salıverildiği ve vazodilatör tonus oluşturup damar rezistansının fizyolojik düzenlenmesine katkıda bulunduğu sanılmaktadır (10). Ayrıca NO'nde kalp üzerinde negatif kronotrop ve negatif inotrop etkisi olduğu bildirilmektedir (11).

Çalışmamızın amacı, izole sıçan atriyumunda adenozinin oluşturduğu (-) kronotrop etkide nitrik oksidin rolünü araştırmaktır.

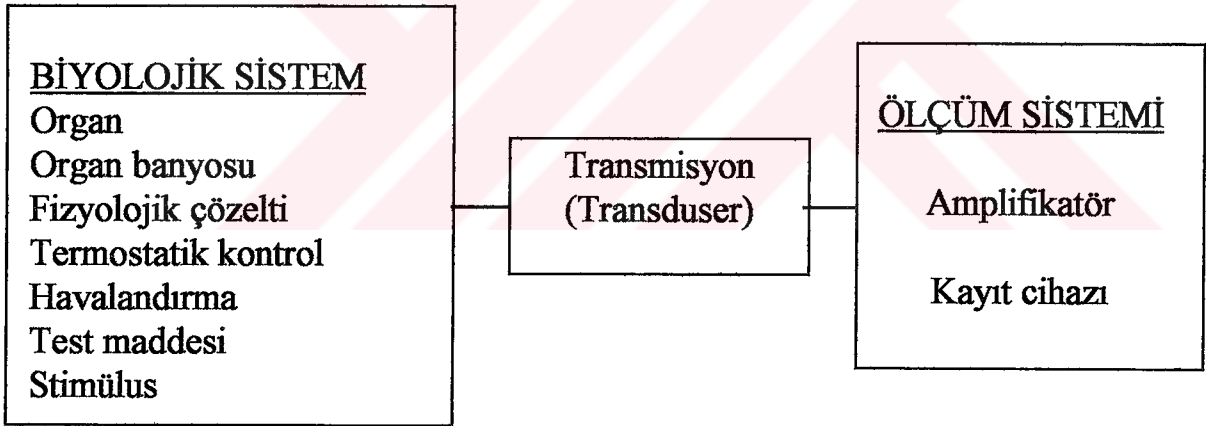


II-GENEL BİLGİLER

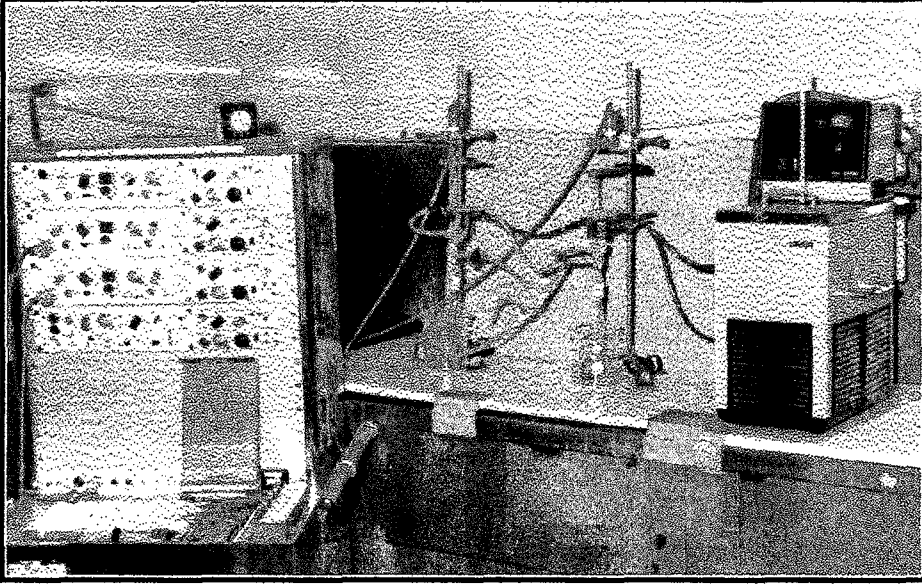
A- ORGAN BANYOSU

İzole organ preparatlarında, organın vücut dışına çıkarılarak uygun bir ortamda canlı tutulabilmesi; ortamın kimyasal yapısının düzenlenmesi, ortam sıcaklığının denetlenmesi ve optimum oksijenasyonun sağlanması suretiyle yapılır.

İzole organ preparatlarının incelenmesi için kullanılan tekniklerden biri organ banyosu sistemidir. Bu sistem iki temel ögeden oluşmaktadır. Bunlardan ilki, preparata optimal in vitro şartları sağlayan biyolojik sistem; ikincisi ise ölçme sistemidir. Bu iki sistem arasındaki mekanik bağlantı da transmisyon (aktarım) denilen üçüncü bir sistem tarafından sağlanmaktadır (**Şekil 1, Resim 1**).



Şekil 1: İzole organ prepatlarının incelenmesinde kullanılan sisteme ait diyagram.



Resim 1: İzole organ prepatlarının incelenmesinde kullanılan sistem

Vücut dışına çıkarılmış bir organın canlı kalmasındaki koşullardan en önemlisi kuşkusuz organın bulunduğu ortamdır. En iyi ortamın kan olduğu tartışılmazdır. Özellikle aynı türden elde edildiği zaman, gerekli gazları taşıma özelliği açısından temel bileşimi çok uygundur. Ancak, kanın yeterli miktarda sağlanması zor ve pahalıdır. Ayrıca içerdiği aktif maddeler spontan aktivitelere neden olabilir ve incelenen ilacın etkinliği değişebilir. Bunlar da istenmeyen özelliklerdir. Bu nedenlerle kanın bileşimine yakın fizyolojik çözeltileri uygulama alanına girmiştir (12).

Fizyolojik çözeltilerin bileşiminde Na^+ K^+ , Mg^{++} , ve Cl^- iyonların bulunması gerekmektedir. Bu iyonlar proteinlerin (enzimler, reseptörler, vd.) işlevleri için gereklidir. Hücrelerdeki fonksiyonel proteinlerin H^+ iyonuna karşı duyarlı olmaları ve bunlar üzerinden oluşan yanıtların ancak dar bir pH aralığında ortaya çıkması nedeniyle, bazı kimyasal maddeler (H_2PO_4 , HCO_3 , albümin ve aminoasitler, tris ve benzeri organik tamponlar) fizyolojik tuz çözeltilerinin tamponlanmasında kullanılır. Tamponlanma ile elde edilen pH nötral ($\text{pH}=7.4$) düzeydedir. Yine kullanılması gereken en önemli maddelerden biri de glukozdur.

Dokuya gerekli oksijen iletimi fizyolojik tuz çözeltilerinin kullanılması durumlarında oldukça güçtür. Bu yüzden deney süresince fizyolojik tuz çözeltisi, % 95 oksijen (O_2) + % 5 karbondioksit (CO_2) gaz karışımı ile havalandırılır.

Organ banyolarında canlılardan elde edilen dokuların fizyolojik yanıtlarının alınabilmesi için, oda sıcaklığının üzerinde 37 °C civarında sıcaklıklar kullanılmalıdır. Bu amaç için ceketli sistem kullanılmakta, banyo çeperindeki ceketten ısıtılmış su geçirilmektedir.

İzole organ preparatına taze fizyolojik çözelti sağlamak ve çalışma sırasında eklenen test bileşiklerini uzaklaştırmak için preparatlar belirli aralıklarla yıkanır. Bu çalışmada kullanılan yıkama şeklinde, banyo önce tamamen boşaltılır ve sonra boşaltma musluğu kapatılarak taze ve uygun ısıdaki fizyolojik çözelti ile yeniden doldurulur.

İzole organ preparatının organ banyosuna asılabilmesi için organ askısına gereksinim vardır. Önce organ bu askıya bağlanır ve sonra organ banyosunun içine yerleştirilir. Preparat ve transduser arasındaki bağlantı iple sağlanır. Dokuya ait cevaplar transduser aracılığı ile amplifikatöre oradan da kaydediciye iletilir ve hareketli kağıt üzerine yazdırılır. Bilgisayar aracılığı ile kaydetmek de mümkündür.

B- İZOLE ATRİYUM PREPARATLARI

İzole atriyum preparatları, aktif kimyasal bir maddenin inotrop ve/veya kronotrop etkilerini değerlendirmek amacı ile kullanılabildiği gibi sinir stimülasyonuna bağlı cevapları değiştirici etkilerini değerlendirmek amacı ile de sıklıkla kullanılır. Deneyin amacı inotropik etkinin değerlendirilmesi ise, daha çok elektriksel stimülasyonla çalıştırılan sol atriyum preparatı, daha az olarak da spontan çalışan atriyum (sağ ve sol) preparatı kullanılır. Eğer kronotrop etki üzerinden bir değerlendirilmeye gidilecekse spontan atan sağ atriyum veya kullanışı daha kolay olan spontan atan atriyum (sağ ve sol) preparatı kullanılır. Ayrıca atriymu kendisini inerve eden sinirlerle birlikte izole organ banyosuna alarak çalışmak mümkündür (Örneğin sıçanın vagus siniri-atriyum preparatı) (13).

Fare, civciv, kobay, sıçan ve kedi gibi hayvanların izole atriyumlarıyla çalışılabilir, ancak bunlar arasında bazı konularda tür farkı vardır. Örneğin, kobay ve sıçan atriyumlarını inerve eden sinir uçlarında bulunmayan dopamin reseptörleri, kedi atriymunu inerve eden sempatik sinir ucunda bulunmaktadır. Bu nedenle kedi sağ

atriyumu presinaptik dopamin reseptörlerinin değerlendirilmesinde ideal bir izole organ preparatıdır. (13).

İzole atriyum preparatları için besleyici çözelti olarak Tyrode, Krebs, Locke veya Feigen çözeltilerinden biri kullanılabilir. Kullanılan izole organ banyosunun hacmi değişik olabilir. Kobay ve sıçan atriyumu için 15-30 ml' lik, kedi sağ atriyumu için 50 ml' lik bir organ banyosu önerilir. Organ banyosu mümkün olduğunca ince ve sık kabarcıklarla gazlandırılmalıdır. Özellikle kedi sağ atriyumu için kullanılan organ banyosunun gazlandırılmasının, preparatın tam altında olmayacak şekilde yapılmasına dikkat edilmelidir. Gaz kabarcıklarının izole organın tam altından gelmesi durumunda, nadir de olsa atriyum boşluğuna gaz kabarcığı takılmasına neden olabilir. İzole organın banyoda yıkanmasının banyoyu taşıma şeklinde değil de boşaltma şeklinde yapılması önerilir (13).

C- RESEPTÖR KAVRAMI

a-Reseptör nedir ?

Hücrelerde, belirli bir makromolekülün özel bir kısmını oluşturan, ilaç veya etkin endojen madde moleküllerini seçici bir şekilde yüksek afinite göstererek bağlayan ve etkinin başlamasında aracılık eden noktalara **reseptör** adı verilir. Reseptörler genellikle protein veya glikoprotein yapısındadır. Hücrede reseptörler sitoplazma membranının yüzeyinde, sitoplazma içinde veya nükleus içinde yerleşmişlerdir.

Reseptörlerin iki önemli görevi vardır:

- 1) İlaç ve diğer madde moleküllerini tanımaları.
- 2) Bu maddelerle reseptörün geçici olarak birleşmesinden doğan 'kimyasal sinyal' kendilerine özgü efektör makromoleküllere 'biyolojik sinyal' şeklinde aktarmaları.

Reseptörlerin kimyasal sinyal, biyolojik sinyale dönüştürmelerine **sinyal transdükleme** adı verilir. Reseptörlerin transdüsör görevi yaptıkları söylenebilir ve olay sırasında sinyal aynı zamanda 'amplifiye' edilir (14).

b- Reseptörlerin izolasyonu:

Reseptör tiplerinin ve alt tiplerinin belirlenmesinde ilk zamanlar, tüm hayvanlarda veya izole dokularda ilaçların yaptığı fonksiyonel değişmelerin karşılaştırılmasına dayanan farmakolojik yöntemler kullanılmıştır. Daha sonra radyoligand bağlama ve otoradyografi yöntemleri kullanıma girmiştir. Günümüzde ise sayılan bu yöntemlerin yanısıra moleküler biyoloji yöntemleri de reseptör belirleme için kullanılmaya başlamıştır.

Bu teknikte; membran reseptörlerinin izolasyonu için önce hücre membranı proteinlerinin deterjanlarla suda çözünmesi gerekir. Bu çözünmüş fraksiyondan reseptör proteinini aşağıdaki yöntemlerle izole ve pürifiye edilebilir:

- Afinite kromatografisi
- İzoelektrik odaklama
- İmmüno afinite kromatografisi
- İmmünopresipitasyon
- Selektif presipitasyon
- İki boyutlu jel elektroforezi
- Jel dışlama kromatografisi
- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

Bu yöntemlerle saflaştırılan reseptör protein molekülünün, moleküler ağırlığı ve primer yapısı (amino asid dizilimi) belirlenir. Son zamanlarda reseptör proteinini sentezini sağlayan o reseptöre özel mRNA'lar izole edilmiş, komplementer DNA'lar (cDNA) yapılmış ve reseptör sentezi ile ilişkili gen klonlanarak reseptör proteinleri üretilmiştir.

Reseptör incelemelerinde klonlama, yer yer diğer reseptör belirleme yaklaşımlarının önüne geçmiştir. Bu nedenle, halen gen klonlama ile varlığı gösterilen, fakat farmakolojik yöntemlerle incelenip fonksiyonel önemi henüz belirlenmemiş reseptör alt tipleri vardır. Ancak, pahalı bir yöntem olduğu için kısıtlı sayıda laboratuvarlarda uygulanabilmektedir (14).

c- Reseptör Aktivasyonu ve Reseptör Sonrası Olaylar:

Endojen etkin maddelerin veya ilaçların kendilerine özgü reseptörleri etkileyebilmeleri için, moleküllerinin reseptör ile temasa gelmesi veya kombinasyonu gerekir.

Reseptörler kendileri gibi hücre membranında bulunan efektör makromoleküller ile kenetlenebilirler. Effektör makromoleküllerin başlıcaları şunlardır:

1. Özel enzimler (Adenilil siklaz, fosfoinoziditaz, guanilat siklaz)
2. İyon kanalları
3. Aktif transport sistemleri (pompalar).

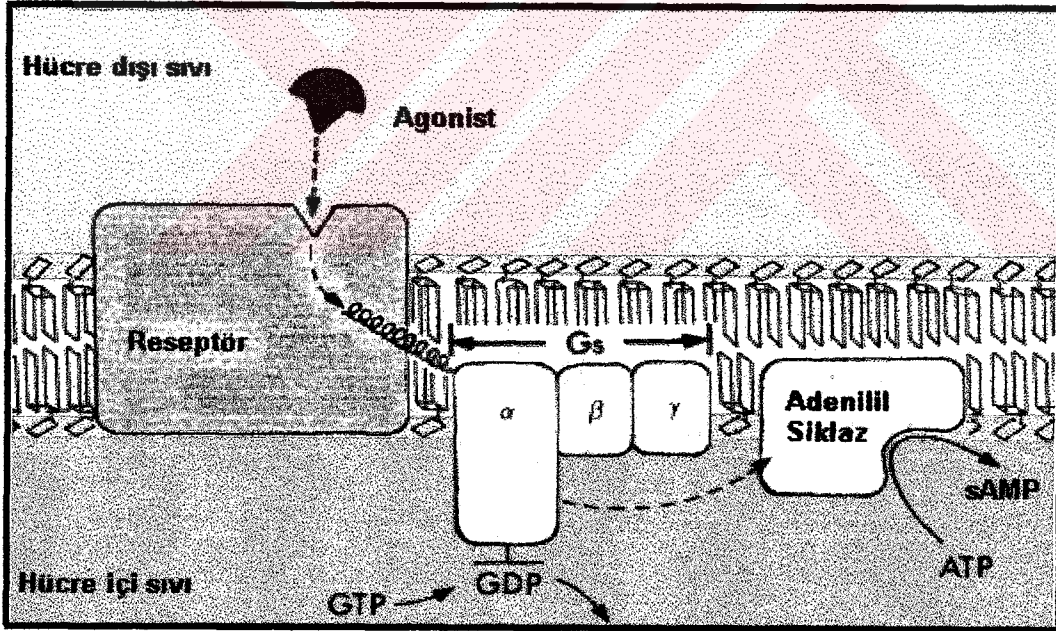
Reseptörlerin membrandaki efektör makromolekülleri etkilemelerine aracılık eden G proteinleridir. G proteinlerinin santral sinir sistemi ve periferik yapılarda en az 12 çeşidinin bulunduğu saptanmıştır. $G_s, G_i, G_k, G_o, G_P, \dots$

Reseptörler, G proteinleri ve efektör makromoleküller, nörotransmitterlerin, nöromodülatörlerin ve hormonların reseptöre olan etkilerini hücre içine aktaran transmembranal sinyal transdükleme sistemlerinin üç ana ögesini oluştururlar.

Reseptör aktivasyonu ile oluşan sinyalin membranda yerleşmiş transmembranal transdükleme sistemleri tarafından transdüklenmesi sonucu oluşan ikinci ulaklar, (sAMP, sGMP, diasil gliserol, inozitol trifosfat gibi) hücre içinde birbirini izleyen bir olaylar dizisi başlatır. Bunlara reseptör sonrası (post-reseptör) olaylar adı verilir. Bu olaylar hücrede gözlenebilen ve klasik farmakolojik yöntemlerle ölçülebilen son etki yani hücre cevabı ile sonuçlanırlar.

G proteinleri üç alt birimden (alfa, beta ve gama- alt birimleri) oluşan bir moleküldür. Fonksiyonel önemi olan, GTP bağlayan ve reseptörle ve efektör makromoleküllerle etkileşen alt birim , G proteini türüne özel olan alfa- alt birimidir. Reseptörün agonist molekül tarafından aktivasyonu reseptörü G proteini ile kısa bir süre için birleştirir; ilaç molekülü+ reseptör molekülü+G proteininden oluşan üçlü kompleks oluşur ve G proteininin aktivasyonuna neden olur. İnaktif durumdaki G proteini GDP(guanozin difosfat) ile bağlanmış ve üç alt-birimi birleşmiş (alfa/ beta/ gama) durumdadır.

Reseptör tarafından aktivasyon; GDP' in ayrılmasına, onun yerini GTP' (guanozin trifosfat) ın almasına ve alfa alt-biriminin beta/ gama alt- birimi kompleksinden ayrılmasına yol açar. GTP ile bağlanmış ve diğer iki alt-birimden kurtulmuş olan alfa alt-birimi (G_α), G proteininin aktif şeklini temsil eder. GTP' in bağlanması , üçlü kompleksi destabilize eder; böylece G proteininin reseptörden ayrılmasına ve ayrıca reseptörün agoniste afinitesinin azalmasına yani reseptör deaktivasyonuna yol açar. Aktive edilmiş alfa alt-birimi, efektör makromolekül (örneğin adenilil siklaz) ile kenetlenir ve onu etkiler (söz konusu G proteini G_s ise adenilil siklazı aktive eder, G_i ise enzimi inhibe eder). GTP, GTP fosfataz tarafından hidroliz edilir; bir fosfat rezidüsünü kaybederek GDP' a dönüşür; aynı zamanda α alt- birimi beta/ gama alt-birimi kompleksi ile birleşerek inaktif duruma geçer. Efektör makromolekül üzerinde etki sona erer. Reseptörün üçlü kompleksin destabilizasyonu sırasında azalmış olan, agoniste karşı afinitesi artar. Agonist molekülü reseptörü tekrar aktive edebilecek duruma gelir (Şekil 2) (15).



Şekil 2: Agonist Reseptör-G proteini ilişkisi - (16).

D- AGONİST VE ANTAGONİST İLAÇ

Reseptörler aracılığı ile hücreleri etkileyen ilaçların temel özellikleri yapıcı, o reseptörleri aktive eden endojen etkin maddelere benzemeleridir. Bu yapı benzerliği o derecededir ki reseptör bağlanma noktası kendine özgü endojen madde ile ilaç molekülünü ayırt edemez ve ilaç tarafından da aktive edilir.

Vücuttaki tüm endojen etkin maddeler, farmakoloji yönünden agonist maddelerdir. Reseptörleri onlar gibi aktive edebilen ilaçlar da agonisttir. Ancak bazı ilaçlar yapıcı, endojen ve ekzojen agonistlere benzerler, böylece reseptör noktalarla yakından ve selektif biçimde temasa gelirler. Fakat onu aktive edemezler ve agonistin reseptörü etkilemesini engellerler. Bu tür ilaçlara antagonist ilaçlar denilir. Antagonist ilaçlar, hücrelerde reseptörleri kapatarak onların endojen etkin maddeler tarafından etkilenmesini engellerler (reseptör bloku). Bunlara o reseptörlerin blokörleri adı verilir (17).

E- FARMAKOLOJİK ANTAGONİZMA

Aynı reseptör ile birleşebilen iki ilaç arasındaki antagonizmadır. Agonist maddenin reseptörle birleşmesi bir etki oluşturur. Ancak, antagonist maddenin reseptörle birleşmesi bir etki meydana getirmez.

Farmakolojik antagonizma, antagonist ilacın reseptörlerle reversibl veya irreversibl bir şekilde bağlanmasına göre ikiye ayrılır:

- a) Kompetitif antagonizma.
- b) Kompetitif olmayan (non-kompetitif) antagonizma.

a- Kompetitif Antagonizma:

Bu tür antagonizmada, agonist ve antagonist ilaçlar aynı reseptör için yarışma halindedirler. Her ikisinin de reseptörle kombinasyonu reversibldir. Antagonizmanın derecesi, ortamda bulunan agonist ve antagonist maddelerin moleküler konsantrasyonları arasındaki orana bağlıdır. Agonist konsantrasyonu artırılırsa

antagonizma tamamen ortadan kaldırılabilir. Bu yüzden kompetitif antagonizma yenilebilir bir antagonizmadır.

Kompetitif antagonistlerin bir kısmı tam antagonist değil, fakat **parsiyel agonist**dir. Parsiyel agonist niteliğindeki antagonist ilaç in vitro incelemelerde tek başına verildiğinde agonist gibi hareket eder ve reseptör aktivasyonuna bağlı özel agonistik etki oluşturur. Eğer parsiyel agonist aynı reseptörü etkileyen tam agonistin yüksek konsantrasyonu ile birlikte uygulanırsa onun etkinliğini azaltır yani antagonist gibi hareket eder.

b- Kompetitif Olmayan Antagonizma:

Bu tür antagonizma da; antagonist molekülleri, reseptör ile kovalent bağlarla irreversibl bir şekilde bağlanırlar. Ortamdaki antagonist konsantrasyonuna göre reseptörlerin belirli bir yüzdesi irreversibl olarak kapatılmıştır. Böylece, agonistin etkisine açık reseptör sayısı azaldığından, agonistle elde edilmesi mümkün maksimum cevabın büyüklüğü azalır. Kompetitif olmayan antagonistin konsantrasyonu artırıldığında, agonistin maksimum etkisi daha fazla düşer. Bu antagonizmada, antagonistin reseptörden ayrılması söz konusu olmadığından, vücutta bu reseptörlerin blokajına bağlı olarak meydana gelen etkinin devam süresi ilacın eliminasyon hızına değil, ilaçla kapatılan reseptörlerin yerine yeni reseptör sentez edilmesinin hızına bağlıdır. Kompetitif olmayan antagonizmanın diğer bir şekli, antagonistin reseptörlere dokunmaksızın, reseptör sonrası olaylarda kalıcı veya reversibl bozukluk yapması sonucu oluşur. Buna **non-spesifik kompetitif-olmayan antagonizma** da denir (14).

F- KONSANTRASYON- CEVAP EĞRİLERİ:

Konsantrasyon ile etki arasındaki ilişki, vücut dışında fizyolojik koşullarda deney süresi boyunca yaşatılan izole organlarda incelendiğinde bu tür incelemelere in vitro ilaç incelemeleri denilir. Tüm organizma düzeyinde yapılanlara ise in vivo ilaç incelemeleri denir.

Konsantrasyon-cevap eğrisi, bir maddenin organ banyosundaki konsantrasyonu ile onun izole organ preparatı üzerinde oluşturduğu etki şiddeti arasındaki ilişkiyi gösterir.

Konsantrasyon-cevap eğrisi bir maddenin farmakolojik aktivitesini tanımlar. Standart konsantrasyon cevap eğrilerinde banyodaki ilaç konsantrasyonu X ekseninde, etki ise maksimum cevabın yüzdesi olarak Y ekseninde gösterilir. Konsantrasyon ile etki arasındaki ilişkinin grafiği çizilirken kural olarak konsantrasyonun logaritması alınır. Böylece elde edilen eğri hiperbol şeklinde değil, sigmoid yani S harfi şeklinde olur. Bunun başlıca iki pratik yararı vardır:

1-Grafiğin enini, yani yatay eksenini daraltır.

2-İlişkiyi gösteren eğrinin daha büyük bir bölümünde lineer duruma gelmesi sağlanır (14).

a- Agonistlerin test edilmesi:

Agonistlerin test edilmesi sırasında izole organa başka herhangi bir madde verilmeksizin sadece test maddesi uygulanır. Bir agonist test edilirken doz kademeli olarak yükseltilir. Bu yükseltme işlemi en küçük cevabın elde edildiği konsantrasyondan başlar ve maksimum etki edilinceye kadar sürdürülür. Organ banyosundaki konsantrasyon Molar ($M=\text{mol/L}$) olarak ifade edilir ve onar onar (10,20,30,...), aritmetik olarak (1,2,4,8,...), veya logaritmik olarak arttırılabilir.

b- Antagonistlerin test edilmesi:

İzole organ preparatı önce antagonist test maddesi ile karşı karşıya bırakılır. İnkübasyon süresinden (10-30 dk) sonra standart agonist organ banyosuna ilave edilir. Eğer test maddesinin antagonist aktivitesi var ise, agonistin preparat üzerindeki bilinen aktivitesi azalacak veya tamamen bloke edilecektir.

c- Çalışmada geçen konsantrasyon-cevap eğrisine ilişkin başlıca terimler:

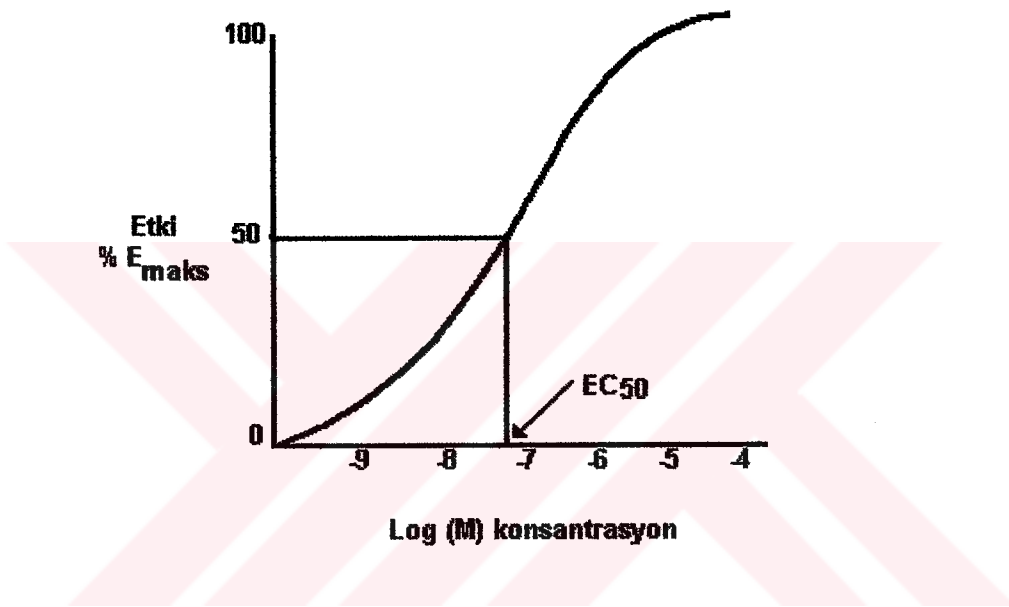
Maksimum Konsantrasyon (E_{maks}):

Preparata zarar vermeksizin onun verebileceği maksimum cevabı oluşturan konsantrasyondur. Maksimum doz, artan konsantrasyonda uygulanan test

maddesine maksimum cevap alındıktan sonra konsantrasyonun artırılmasına karşın doku cevabının azalmaya başladığı konsatrasyondur.

Medyan efektif konsantrasyon (EC_{50} veya ED_{50}):

EC_{50} ; maksimum etkinin % 50' sine eşit bir etki (yarı maksimum etki) oluşturan molar ilaç konsantrasyonudur (**Şekil 3**).

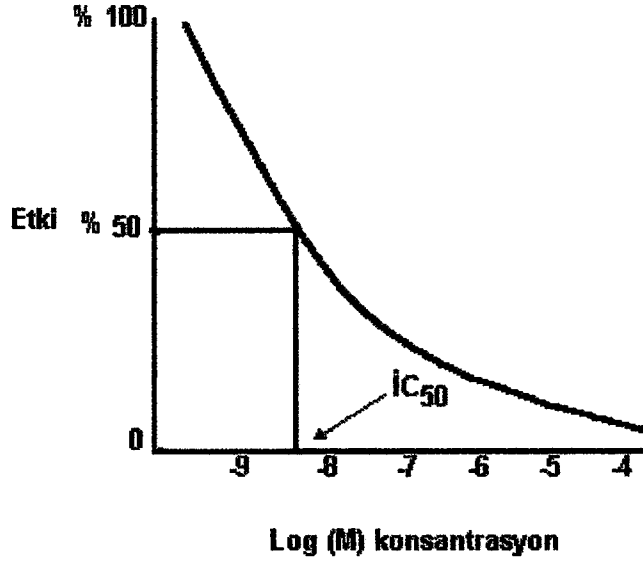


Şekil 3: EC_{50} değeri.

Eğer uygulanan test maddesi, biyolojik bir parametrenin ilaç verilmeden önce varolan değerinin azalmasına neden oluyorsa buna **inhibisyon** denir (örneğin kalp atım sayısının azalması). IC_{50} ise E_{maks} 'ın (ki burada maksimum inhibisyonun) % 50' sine eşit bir inhibisyon (yarı maksimum inhibisyon) yapan konsantrasyondur (**Şekil 4**).

EC_{50} , çeşitli ilaçların aktivitelerinin karşılaştırılmasında kullanılan bir parametredir.

pD_2 maksimum etkinin % 50' sine eşit bir etki (yarı maksimum etki) oluşturan molar ilaç konsantrasyonunun negatif logaritmasıdır. $pD_2 = (-\log EC_{50})$ olarak da gösterilir.



Şekil 4: IC_{50} değeri.

G- ADENOZİN

Adenozin çeşitli kimyasal olayların düzenlenmesinde rolü olan endojen bir nükleotiddir. Adenozin bilinen farmakolojik etkilerini membranda bağlı bulunan ve üç major gruba ayrılan adenozin A_1 , A_2 ve A_3 reseptörleri üzerinden gösterir (1, 2). Bu reseptörlerin aktivasyonunun kalpte depresyona, hipotansiyona, yağ hücrelerinde antilipolitik etkiye, trombositlerde antiagregan etkiye, adrenal kortekste steroidojenezin aktivasyonuna ve santral sinir sistemindeki eksitabl nöronlarda depresyona neden olduğu gösterilmiştir (15, 17).

a-Adenozinin Etki Mekanizması:

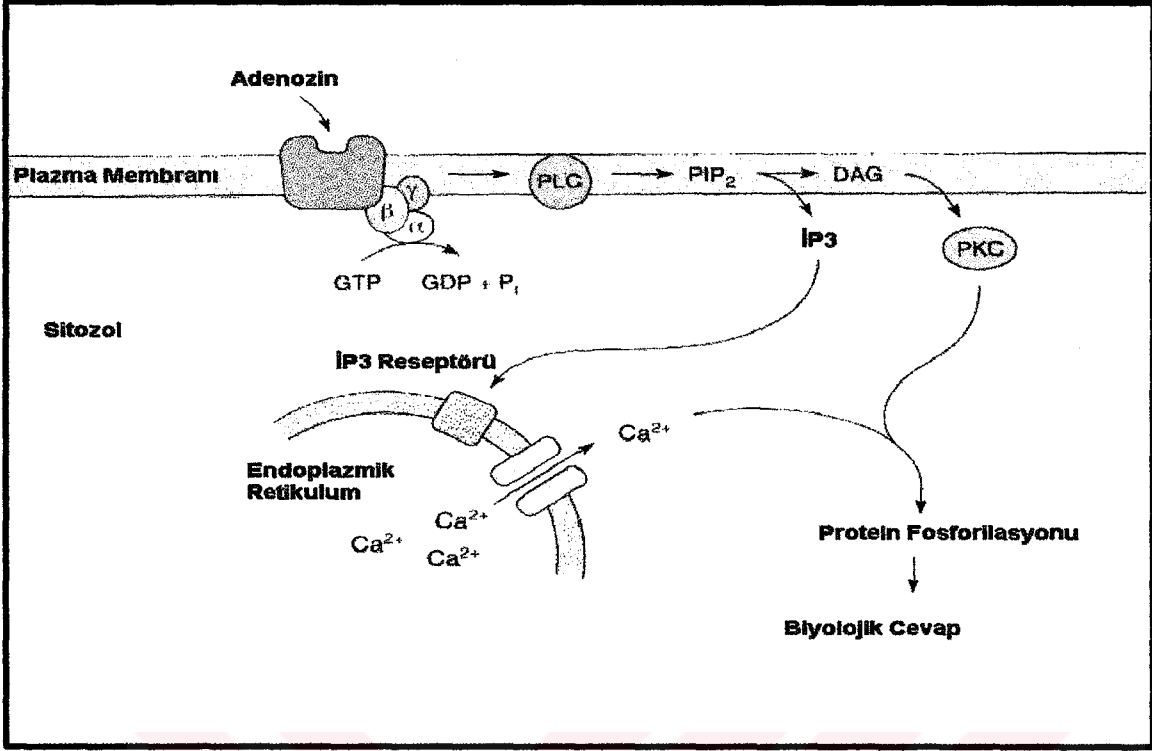
Adenozinin farmakolojik etkileri, adenozin reseptörlerine bağlanan spesifik G proteinleri ile ilişkilidir. Adenozin A_1 reseptörleri $G_{i/o}$, A_2 reseptörleri G_s ve A_3 reseptörleri $G_{i/o}$ proteinleri aracılığı ile efektör makromolekülleri etkilerler. Yüksek affiniteli A_1 reseptörlerin aktivasyonu, adenilat siklazı inhibe ederken, düşük affiniteli A_2 reseptörlerin aktivasyonu, adenilat siklazı stimüle eder (18).

A_1 reseptörleri beyindeki nöronlarda, sempatik ganglionlarda ve ayrıca nöroefektör kavşaklarda bulunur. Bazı dokularda nöroefektör kavşaklarda presinaptik yerleşim gösterir ve nörotransmitter salıverilmesini inhibe ederler. Bu reseptörlerin aktivasyonu, kısmen adenilat siklaz aktivitesini değiştirmek (bazı yapılarda azaltmak, diğerlerinde arttırmak) suretiyle etki oluşturur. A_1 reseptörlerin aktivasyonuna bağlı nörotransmitter salıverilmesi inhibisyonunun, Ca^{++} kanallarının blokajına, protein kinaz C stimülasyonuna veya K^+ kanallarının açılmasına bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Bazı hayvan türlerinde periferik adrenerjik ve kolinerjik sinir uçlarında presinaptik A_1 tipi pürinerjik reseptörlerin bulunduğu ve bu nedenle adenosinin noradrenalin ve asetilkolinin salıverilmesini inhibe ettiği bulunmuştur (15) .

Ayrıca adenosin A_1 reseptörleri adenilat siklaz dışında diğer efektör sistemlerle de etkileşebilmektedir. Tavşan kortikal tübül hücrelerinde, hamster vas deferens hücrelerinde ve kobay myometriumuunda, adenosin A_1 reseptör stimülasyonun inozitol fosfat oluşumunda artışa neden olduğu gösterilmiştir. (19, 20).

Böbrek epitel hücrelerinde, kültürel mezenşiyal hücrelerde, toplayıcı kortikal tübül hücrelerinde ve trakea epitel hücrelerinde, A_1 reseptörlerin hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonlarının artışına neden olduğu da bildirilmiştir (21, 22).

Bu olayların mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte G_i proteinleri üzerinden fosfolipaz C aktivasyonuna neden olabilmektedir. Fosfolipaz C aktivasyonu sonucu membranda fosfoinozitid veya diğer adıyla fosfatidilinozitol 4, 5-bifosfat (PIP_2) hidrolizi artar ve sonuçta inozitol trifosfat (IP_3) ve diasilgliserol (DAG) adlı iki ikinci ulak oluşur. IP_3 , endoplazmik retikulumdan Ca^{++} salıverilmesini artırarak, DAG ise protein kinaz C' yi stimüle ederek biyolojik cevabın oluşmasını sağlar (Şekil 5) (15). Postsinaptik yerleşim gösteren A_2 tipi pürinerjik reseptörler, Ca^{++} kanallarını bloke ederek veya adenilat siklazı stimüle ederek düz kaslarda gevşeme yaparlar (15).



Şekil 5: Adenozin ve G proteini ilişkisi (23).

b-Adenozinin Patofizyolojik Olaylardaki Rolü

Adenozinin Kardiyovasküler Sistemdeki Rolü:

Adenozin kardiyovasküler sistemde, negatif inotrop, negatif kronotrop ve negatif dromotrop etkiye neden olan bir ajandır.

Adenozin A₁ reseptörlerinin aktivasyonu negatif inotrop, negatif kronotrop ve negatif dromotrop etkiye neden olurken A₂ reseptörlerinin aktivasyonu koroner ve periferel vazodilatasyonla sonuçlanır. Özellikle A_{2a} reseptörleri vazodilatasyondan sorumludur. 1993 yılında Vials ve arkadaşları yaptıkları çalışmada koroner arter vazodilatasyonunda da A_{2a} reseptörlerin rolü olduğunu göstermişlerdir (9).

Adenozin kalpteki depresan etkisine karşın ventriküler otomasiteyi artırmaktadır. Adenozinin kardiyak ventriküler otomatisme uyarıcı etkisi adenozin tedavisi yapılan insanlarda ve hayvan çalışmalarında spontan atan izole ventriküllerde gösterilmiştir. İn vitro çalışmalarda adenozinin bu etkisinin konsantrasyona bağımlı olduğu

gözlenmiştir. Adenozin düşük konsantrasyonda (0.1-10 nM) ventriküler otomatisiteyi artırırken, yüksek konsantrasyonlarda (10 µM) ventriküler otomatisiteyi azaltmaktadır. Her iki etki de non-selektif adenozin reseptör antagonisti teofilin ilavesi ile önlenebilmektedir (24).

Adenozinin ventriküler otomatisiteye etkilerinin, A₂ reseptörleri ile ilişkili olduğu ve endojen katekolaminlerin varlığına bağlı olduğu gösterilmiştir. Çünkü rezerpin verilen sıçanlarda veya α₁, B₁ adreno reseptör antagonistlerinin varlığında adenozinin ventriküler otomatisiteyi uyarıcı etkisi gözlenememiştir (24).

Deneyssel preperatlarda adenozinin elektrofizyolojik etkileri şunlardır:

- Sinus nodunda ve purkinje liflerinde otomatisitenin depresyonu.
- Atrioventriküler nodal iletiminin depresyonu.
- Atriyumda aksiyon potansiyelinde hiperpolarizasyon veya kısalma.

Adenozinin bu etkilerinin; indirekt antiadrenerjik etkiler, potasyum iletiminde artma, yavaş kalsiyum kanallarından kalsiyum iletiminde azalma ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (25, 26).

Adenozine, sinüs ve atrioventriküler düğümler fizyolojik dozlarda çok duyarlıdır. Adenozin özellikle, AV-düğümünden kaynaklanan paroksizmal supraventriküler taşikardinin akut epizodlarının önlenmesinde etkilidir. Bu nedenle verapamil ve diğer ajanlara dirençli taşikardinin tedavisinde kullanılır (24). Aynı zamanda adenozin güçlü bir vazodilatör olduğu için, cerrahi girişimlerde kontrollü hipotansiyon oluşturmak amacıyla kullanılabilmektedir (27). Ancak adenozin taşikardinin sonlanmasına yetecek dozdan daha fazla verildiğinde, atrial fibrilasyon veya fluttera yol açabilir. Wolf-Parkinson White sendromlu hastalarda, standart dozda i.v. adenozin verildikten sonra pro-aritmik etki saptanmıştır. Son zamanlarda adenozinin çok ciddi ventriküler aritmilere neden olabildiği gözlenmiştir. İskemik myokardın reperfüzyonundan sonra oluşan ventriküler disritmilerin, adenozin ile ilişkili olduğu görülmüştür. Adenozin antagonisti teofilin i.v verildiğinde hızlanmış idiyoventriküler ritm etkin derecede normal sinüs ritmine dönmüştür (24).

Adenozinin Santral Sinir Sistemindeki Rolü (Adenozinerjik nöromodülatör sistem):

Son 25 yıl içinde periferde ve sonra santral sinir sisteminde bir nükleozid olan adenozinin önemli bir nöromodülatör etkinlik yaptığını gösteren deneysel kanıtlar deney hayvanlarında elde edilmiştir (28). Adenozin reseptörü olması muhtemel yüksek afiniteli bağlanma yerlerinin varlığı ve adenilat siklaz ile kenetlenmiş oldukları beyin çeşitli bölgelerinde saptanmıştır. Ebersolt ve arkadaşları da sıçan serebral korteksi, serebellum, hipokampus ve striatumda Gi-proteinleri üzerinden 3'5'- siklik monofosfat (sAMP) üretimini inhibe eden A₁ reseptörlerinin varlığını göstermişlerdir (29).

Santral sinir sisteminde adenozinin nöronlar üzerinde yaptığı depresan etkiye aracılık eden adenozin reseptörleri, hipokampusta A₁ tipi reseptörler ve serebral kortekste A₂ tipi reseptörlerdir. A₁ reseptörlerinin aktivasyonu ile adenilat siklaz inhibe edilirken A₂ reseptörlerinin aktivasyonu ile stimüle edilir (30). Nöron membranında Ca⁺⁺ kanalları ile kenetli A₃ tipi adenozin reseptörlerinin varlığını gösteren kanıtlar elde edilmiştir. Adenozin ve analogları Ca⁺⁺ influksunu inhibe ederler (31). 1995 yılında Marie ve arkadaşları neonatal sıçan beyninden hazırlanan astrosit kültürlerinde çalışmışlar ve bu çalışmada glial hücrelerde A₁ reseptörlerinin öncelikle tip 2 astrositlerde lokalize olduğunu ve bu hücrelerdeki A₁ reseptörlerinin aktivasyonunun, intrasellüler kalsiyum mobilizasyonuna ve ekstrasellüler kalsiyum influksuna neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca astrositlerde A₁ ve histamin H₁ reseptörlerinin Ca⁺⁺ düzeyindeki artışa sinerjik etki gösterdiğine dair kanıtlar elde edilmiştir (32).

Adenozin santral sinir sisteminde postsinaptik inhibisyon yapar. Ayrıca presinaptik inhibisyon da yaparak, nörotransmitter salıverilmesini inhibe eder. Adenozinin postsinaptik membranın eksitator nöromediyatörlere duyarlılığını azalttığı bildirilmektedir. Bu etkide membranda potasyum konduktansını artırmasının da rol oynayabileceği gösterilmiştir.

Adenozin, beyin ventrikülleri içine enjekte edildiğinde sedatif ve antikonvülzan etki yapar. Bu maddenin santral sinir sistemindeki nöronlarda etkilediği A₁ reseptörlerin,

kafein ve teofilin tarafından kompetitif bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir. Kafein ve teofilinin konvülzan etkinliklerinin nöronal A₁ reseptörlerini bloke etmelerine bağlı olduğu ve benzodiazepinlerin, barbitüratların, karbamazepinin sedatif ve antikonvülzif etkinliğine kısmen adenozinin aracılık ettiği ileri sürülmüştür. Kafeinin stimulan etkisinden başka anksiyojenik etkisinin de endojen adenozinle etkileşmesine bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Ancak A₁ reseptörlerini kafein kadar bloke edebilen enprofilinin konvülzan etki göstermemesi bu varsayıma uygun düşmez (31).

Sinapslarda adenozin düzeyinin ve etkinliğinin düzenlenmesinde adenozin re-uptake'i önemli rol oynar. Adenozin re-uptake inhibitörlerinin ve adenozinin yıkan adenozin deaminaz'ı inhibe eden maddelerin antikonvülzan ve anksiyolitik etki potansiyeli vardır. Benzodiazepinlerin, beyinde adenozin uptake'ini inhibe ettikleri ve adenozinin etkinliğini artırdıkları gösterilmiştir. Bu ilaçların sedatif ve santral çizgili kas gevşetici etkisinde bu etkileşmenin katkısı olduğu ileri sürülmüştür (33, 34).

Adenozinin ve nükleotidlerinin beyin dilimlerinden elektriksel stimulusla salıverilmesi, bu olayın tetradotoksin ile bloke edilmesi ve bazı koşullarda Ca⁺⁺ a bağımlı bir şekilde salıverilmesi adenozinin bir nöromediyatör olabileceğini gösterir. Ancak, bu temel kriterlere rağmen santral sinir sisteminde adenzinerjik (pürinerjik) sinir uçlarının histokimyasal yöntemlerle şimdiye kadar ayırd edilememesi, bu önemli nöroaktif endojen maddenin bir nörotransmitter olması konusunda şüphe uyandırmaktadır (31).

Adenozinin Solunum Sistemindeki Rolü:

Adenozin dokularda oluşan ve astım patogeneğine az da olsa katkıda bulunan bir otakoiddir. Adenozin bronkokonstriktör etki yapar ve ayrıca A₃ reseptörler aracılığı ile mast hücrelerinden histamin ve diğer otakoidlerin salınımına da neden olur.

Bronş düz kasları ve diğer birçok hücre türünde bulunan adenozin reseptörleri, teofilin ve diğer metilksantinlere fazla duyarlıdır ve teofilinin vücut sıvılarında oluşan konsantrasyonları ile antagonize edilebilirler.

Teofilin A_1 ve A_2 reseptörlerini non-selektif bir şekilde bloke eder. Adenozinin A_2 reseptörlerinin A_{2a} alt-tipi teofiline duyarlı olmakla beraber, A_{2b} alt-tipinin teofiline afinitesinin düşük olduğu bulunmuştur.

Bronş düz kaslarında adenozinin bronkokonstriktör etkisine, adenozin reseptör alt-tiplerinden hangisinin aracılık ettiği henüz bilinmemektedir (35).

c-Adenozinin Sentezi Salınımı ve Metabolizması

1970'lerin başında pürinerjik otonomik sinirlerin ucundan primer bir nörotransmitter olarak salıverilen ATP'nin varlığı gösterilmiştir. Bir pürin nükleotidi olan ATP (adenozin trifosfat) hücrenin ana enerji kaynağı olarak bilinir. Bu madde adrenerjik sinirlerin ucundan noradrenalin ve kolinerjik sinirlerin ucundan asetilkolinin ko-transmitteri olarak da salıverilir. ATP salıverildikten sonra Mg^{++} -a bağımlı ATP-az veya 5'nükleotidaz (5' adenilat deaminaz) enzimleri tarafından hidroliz edilir ve en sonunda adenozine dönüştürülür (15).

Adenozin iki yolla metabolize edilir. Bunlardan ilki, adenozin deaminaz tarafından inaktif ürünlere dönüştürülmesidir. Adenozin, deaminasyonla inozin ve hipoksantin adlı inaktif ürünlere parçalanır. Adenozinin metabolize edilmesinde rol oynayan ikinci mekanizma ise; pürinerjik sinir ucu tarafından up-take yapılarak tekrar ATP sentezinde kullanılmasıdır. Dipiridamol adenozin up-take'ini bloke ederek purinerjik etkinliği artırır (15).

d- Adenozin Reseptörlerinin Sınıflandırılması

Pürinerjik reseptörler, P_1 ve P_2 reseptörler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Bunlardan P_1 reseptörler adenozine, P_2 reseptörler ise ATP'a yüksek afinite gösterirler. Pürinerjik reseptörlerden P_1 reseptörlere giren adenozin reseptörleri A_1 , A_{2a} , A_{2b} ve A_3 reseptörler olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Bu sınıflandırma, reseptörlerin protein dizilimleri ve ligandlara afiniteleri göz önüne alınarak yapılmıştır (36, 37).

Son zamanlarda sıçan beyininde A_4 tipi adenozin reseptörü olduğu varsayılan bir reseptör de gösterilmiştir. 1995 yılında David ve arkadaşları rat beyin membranında $4^\circ C$ de $[3H]$ CV 1808=($[3H]$ 2- phenylamidoadenosine)'in bağlandığı bölge ile

yarışan belirgin bir yapısal aktivite gösteren bir bileşik göstermişler ve bunun A_4 adenosin reseptörleri olduğunu varsaymışlardır (38).

e-Adenosin Reseptörlerinin Dağılımı

Adenosin reseptörleri geniş bir dağılım gösterir. Farklı çalışmalarda bu reseptörlerin sıçan, kobay ve insan dokusundaki dağılımları; ligand bağlama yöntemleri, immunohistokimyasal yöntemler, m-RNA in situ hibridizasyonu, Northern blot analizi, RT-PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction) yöntemi kullanılarak gösterilmiştir (36, 39, 40, 41) (Tablo 1).

Tablo 1: Adenosin reseptörlerinin dağılımı

Reseptör Tipi		Dağılımı
A_1		Beyin (korteks, serebellum, n.caudatus, putamen), omurilik, epididimis, vas deferens, testis, yağ okusu, mide, dalak, hipofiz, adrenal, atriyum, kalp, aort, böbrek, karaciğer, göz, mesane.
A_2	A_{2a}	Striatum, n.accumbens, olfaktör tüberkül, globus pallidum, hipokampus, serebral korteks, kalp, aort, dalak, akciğer, karaciğer, retina, uterus, deri, mesane, iskelet kası, timus, vas deferens, özafagus, trakea.
	A_{2b}	Beyin, omurilik, kalp, akciğer, dalak, karaciğer, böbrek, uterus, çekum, kalın barsak, mesane, hipofiz, göz, deri.
A_3		Striatum, n.accumbens, hipokampus, serebral korteks, serebellum, amigdala, hipotalamus, talamus, kalp, aort, dalak, akciğer, karaciğer, uterus, mesane, mide, jejunum, proksimal kolon, böbrek, göz, testis.

f- Adenozin reseptör agonistleri ve antagonistleri

Tablo 2: Adenozin reseptör agonist ve antagonistleri

Adenozin Reseptörleri	Reseptör Agonistleri	Reseptör Antagonistleri
A₁	- ADAC - CCPA - CHA - ENBA S(-)- - 1.Methylsoguanosine - PIA R (-) - 2-CADO - N6 -Benzyladenosine - N6 -Phenyladenosine - N6 -Penylethyladenosine - GR 79236 - CPA	- 1-Allyl-3,7-dimethyl-8-phenylxanthine - CPT - DPCPX - N-0840 - PACPX - 8-Phenyltheophylline - 1,3-Dipropyl-8-p-Sülfophenylxanthine - IBMX - XAC - PAPA-XAC - Paraxanthine - CGS-15943 - [3H]-8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
A₂ (A_{2a}, A_{2b})	- CGS-21680 HCl - CPCA - DPMA - CV-1808 - MECA - Metrifudil - 2HE-NECA - APEC	- DMPX - 1-Allyl-3,7-dimethyl-8-sulfophenylxanthine - 1,3-Dipropyl-7-methylxanthine - CSC
A₃	- APNEA	

A₁ ve A₂ reseptörlere eşit afinite gösteren agonistler:

- NECA= 5'- N- Ethylcarboxamidoadenosine.

A₁ ve A₂ reseptörlere eşit afinite gösteren antagonistler:

- Aminofilin= Theophylline etilendiamin.
- 8- (p- sulfophenyl) theophylline.
- Theobromine= 3, 7- Dimethylxanthine: Zayıf bir adenosin antagonisti ve zayıf bir fosfodiesteraz inhibitörüdür.
- Theophylline= 1, 3- Dimethylxanthine: 5'nükleotidaz'ın, alkalın fosfodiesteraz'ın, siklik fosfodiesteraz'ın zayıf bir inhibitörüdür.
- Enprofylline= (3- n- Propylxanthine): Hem A₁ , hemde A₂ reseptörlerinin kompetitif antagonistidir.

g- Adenosin Uptake İnhibitörleri

- Benzodiazepinler.
- NBII= S- (p- nitrobenzyl) 6- thioinosine.

h- Adenosin Transport İnhibitörleri

- Dipyridamole.
- NBTI= S(4- Nitrobenzyl)- 6- thioinosine.
- NBTG= S(4- Nitrobenzyl)-6-thioguanosine.

i- Adenosin Deaminaz İnhibitörleri

- EHNA= Erythro- 9- (2- Hydroxy- 3- nonyl) adenine hydrochloride.

i- Adenosin Kinaz İnhibitörleri

- İdotubercidin: Kobay ve sıçan beyinindeki adenosin kinaz'ın güçlü inhibitörüdür. Beyin dilimlerine [³H]- adenosine uptake'ni güçlü inhibe eder. İntravenöz enjeksiyonun, normotensif sıçanlarda kalp hızı ve kan basıncını azalttığı gösterilmiştir.

H- NİTRİK OKSİD (NO)

a- NO'in Tarihçesi:

Nitrik oksid (NO) ilk defa 1620'lerde büyük Paracelsus' un öğrencisi olan Belçika'lı Jan Baptista van Helmont tarafından hazırlanmıştır. NO'in bileşimi bundan 150 yıl sonra modern kimyanın kurucusu olarak bilinen Lavosier'nin oksijen ve nitrojenin yapılarını ortaya koymasına dek anlaşılamamıştır. 1799 da Humprey Davy nitrojenin diğer bir oksiti olan nitroz oksitin (N_2O) anestezik aktivitesini göstermiştir. O tarihten bu tarafa NO'e olan biyolojik ilginin üzerinde odaklandığı tek nokta sadece hava kirleticisi olarak toksisitesi olmuştur.

NO'in başka biyolojik özelliklerinin olduğu, 1867' de Brunton tarafından Nitro-ester amil nitritin anjina pectoris ağrısını dindirmesi ile gösterilmiştir. Daha sonra gliseril trinitrat da anjina tedavisinde kullanılmıştır ve hala bu yerini korumaktadır.

Başka bir ayrıntı ise patlayıcı endüstrisinde çalışan işçiler tarafından farkedilmiştir; Gliseril trinitrat hafta başında, beyin damarlarını genişletmesine bağlı olduğunu bildiğimiz, baş ağrısına neden oluyor, ağrı hafta boyunca azalıyor ancak hafta sonu tatilinden sonra yine eski şiddetini kazanıyordu. Yapıca benzer bir çok maddenin de vazodilatör etkileri olmasından dolayı bunlara "nitrovazodilatörler" denmiştir. 1980'lerde yapılan çalışmalar sonucunda nitrovazodilatörlerin aslında ön ilaçlar olup vücutta oluşan aktif maddenin NO olduğu anlaşılmıştır. Bunlara NO-donörleri denmektedir (42).

1980 yılında Furchgott ve Zawadzki tarafından NO'in, asetilkolin etkisi altında tavşan aortası endotel hücrelerinden salıverilen çok labil bir otakoid olduğu gösterilmiştir. Asetilkolinin damar segmentlerinde yaptığı gevşemenin damar endotelinin tahribi sonucu ileri derecede azaldığının bulunması; endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF)'ün damar direncinin düzenlenmesinde rol oynayan aktif bir yapı olduğu varsayımının ortaya atılmasına yol açmıştır. Bu endojen maddenin nitrik oksid (NO) veya bir NO türevi olduğunu gösteren kanıtlar elde edilmiştir (43). 1989' da da Moncada ve arkadaşları EDRF'ün aslında NO olduğunu ve L-arginin aminoasidinden sentezlendiğini göstermişlerdir (42).

Son zamanlarda NO'nin damar endotel hücrelerinden değil, aynı zamanda serebellum ve ön beyindeki nöronlarda, nötrofil lökositlerde, böbrek tubulus epitel hücrelerinde, adrenal medulla hücrelerinde, mast hücrelerinde ve muhtemelen bazı otonom sinirlerin (Non-adrenerjik non-kolinerjik sinirler gibi) uçlarında da sentez edilip salıverildiği bulunmuştur. Venlerin arterlere göre genellikle daha düşük miktarlarda EDRF salıverdikleri bulunmuştur. Arterlerin EDRF salıverme kapasitesi türler arasında ve aynı türde bölgeler arasında farklılık gösterir. Genellikle visserlerin damarları, ekstremit damarlarına göre daha fazla EDRF salıverirler (10).

NO'nin insan vücudunda önemli bir nörotransmitter olduğu ve vazodilatasyon, patojenlerin supresyonu gibi önemli rolleri olduğu ortaya çıkartılmıştır.

b- NO'nin Özellikleri:

Nitrik oksid (NO); bir nitrojen ve bir oksijen atomundan oluşan küçük bir moleküldür. Nitröz oksit olarak bilinen ve güldürücü gaz olan inhalasyon anesteziplerinden N₂O ile karıştırılmaması gerekir. Apolar olması membranlardan kolayca geçmesini sağlayan özellikleridir. Çiftleşmemiş bir elektrona sahip olması NO'e bir radikal molekül özelliği vermekte ve sinyal iletiminden sonra nitrite dönüşmektedir (44).

Dokuda ve oksijenlenmiş fizyolojik sıvılarda EDRF çok çabuk yıkılır. Dokuda eliminasyon yarılanma ömrü yerine ve türüne göre değişmek üzere 6 ile 50 saniye arasında bulunmuştur. Superoksid anyonu ve hemoglobin EDRF'nin yıkımını hızlandırır. Superoksid dismutaz enziminin ortama katılması ise yıkımı yavaşlatır ve EDRF etkisini potansiyalize eder (10).

c- NO'nin Sentezi:

NO'nin oluşumu enzimatik bir reaksiyondur. NO endotel hücrelerinde L-arginin'in guanidino nitrojeninin Ca⁺⁺-a- bağımlı NO-sentaz enzimi aracılığı ile oksidlenmesi sonucu sentez edilir. L-sitrülin NO oluşumundan önceki ara metabolittir (10) (Şekil 6).

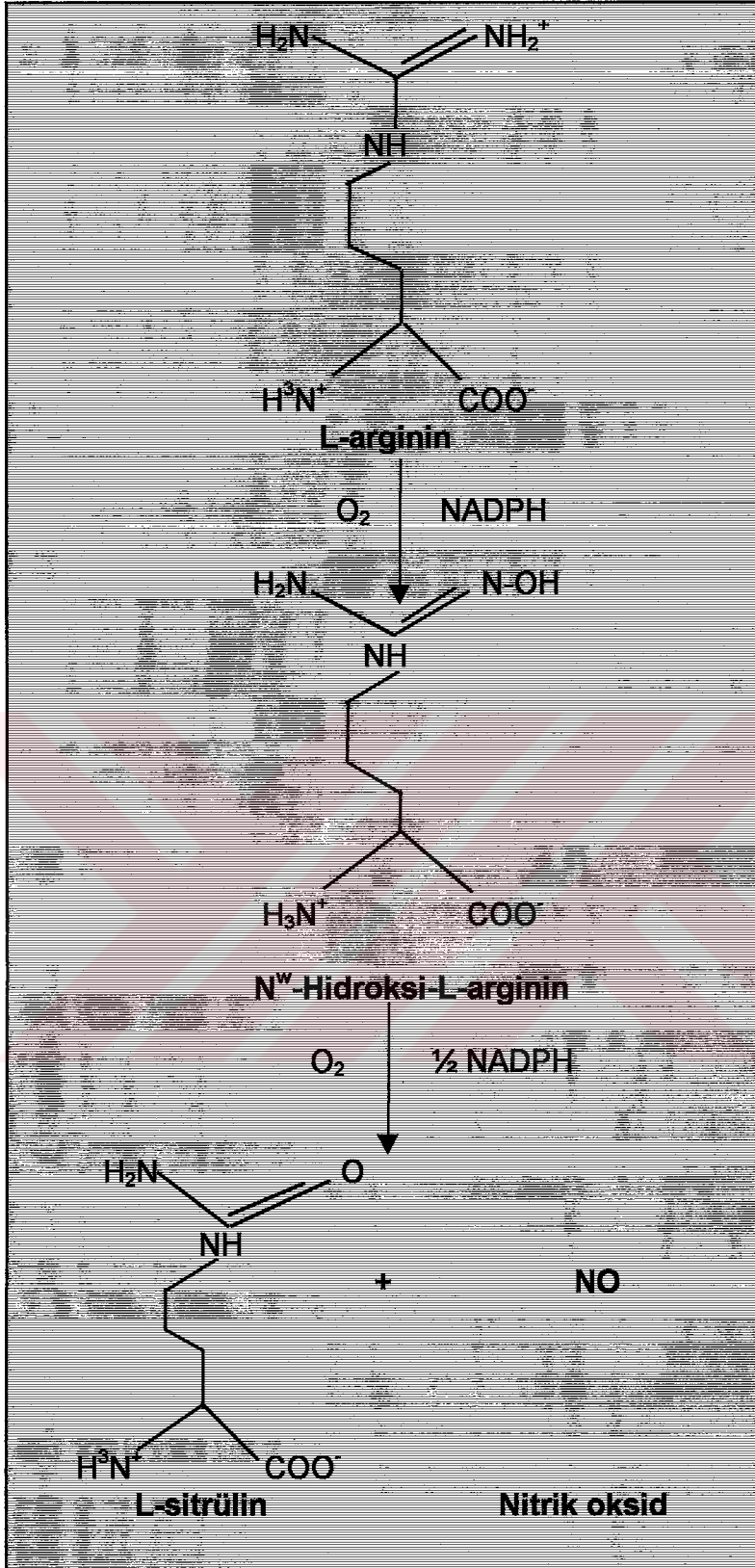
NO-sentaz'ın değişik izoformları vardır. Bilinen üç izoformu klonlanmış ve hatta spesifik monoklonal antikorları elde edilmiştir.

Başlıca üç NO-sentaz izoformu bilinmektedir:

- 1- Endotel hücrelerinde bulunan 135 kD (kilo dalton) olan kalsiyum bağımlı enzim (Konstitütif NO- sentaz).
- 2- Nöron ve iskelet kasında bulunan 168 kD olan NO-sentaz.
- 3- Bakteriyel endotoksin ve iltihabi sitokinlerin etkisi ile oluşan 130 kD olan, kalsiyuma bağımlı olmayan NO-sentaz (İndüklenebilir NO-sentaz).

Bu izoformlar, nöronal NOS (nNOS, NOS1), immünolojik NOS (iNOS, NOS2) ve endotelyal NOS (eNOS, NOS3) olarak da adlandırılır. nNOS ve eNOS yapısaldır, normal durumda aktivitesi vardır. nNOS santral, otonom ve enterik sinir sisteminin belli hücrelerinde (nitrejik nöronlar olarak adlandırılabilir), eNOS vasküler düz kas hücrelerinde bulunur. iNOS ise makrofajların yanısıra bir takım başka hücrelerde indüklenebilir özellik gösterir. eNOS, kendi özgül reseptörleriyle etkileşen çeşitli maddelerin (örneğin; asetilkolin, bradikinin) endotel hücrelerinde hücre-içi Ca^{++} artışını tetiklemesiyle aktive edilir. Fonksiyonel rolü EDRF üreterek belli bir vazodilatör tonus sağlamaktır. Çünkü eNOS inhibisyonu kan basıncında yükselme ve vazokonstriktör ajanlara yanıtta artışa neden olmaktadır (42).

Her üç enzim de aktiviteleri için NADPH, FAD, FMN ve terahidrobiopterin'e gereksinim gösterirler (45). Konstitütif NO-sentaz izoformlarının aktivasyonu için intrasellüler Ca^{++} düzeyinin yükselerek Ca^{++} 'un kalmodüline bağlanması ve Ca^{++} kalmodülin kompleksinin NO'e bağlanarak molekülü aktive etmesi gereklidir. Konstitütif NO-sentaz aktive edildiğinde küçük miktarlarda NO oluşturur. Bunun yanında indüklenebilir NO-sentaz, spesifik sitokinlerle uyarıldığında büyük miktarlarda NO oluşturur ve patojenler üzerinde inhibe edici veya öldürücü özellik gösterir. Nöronal ve endotelyal NO sentaz'ın protein kinazlarla fosforile edilmesi aktivitelerini azaltır. İndüklenebilir formlarının da kalmodüline bağlandıkları bilinse de bunların aktiviteleri üzerinde Ca^{++} çok az etki oluşturmaktadır. Bu izoformun aktivasyonunda kalmodülinin rolü tam olarak açıklanamamıştır (46, 47).



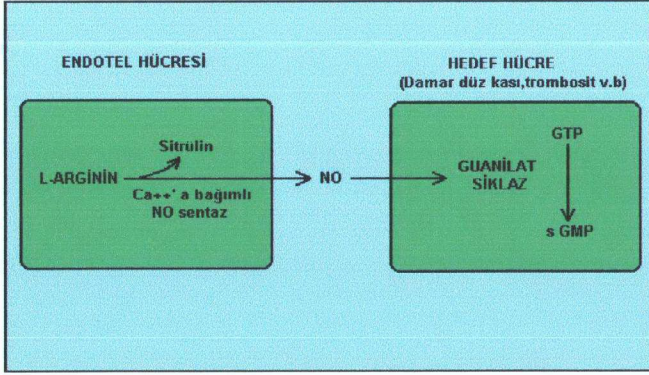
Şekil 6: NO (Nitrik oksid) sentezi. NO, L-arjininden iki basamaklı bir reaksiyon ile sentez edilir. Reaksiyon NADPH, O_2 ve kalmodüline ihtiyaç gösterir. Tetrahidrobiopterin tarafından aktive edilir.

L-argininin bazı analogları NO-sentazı bloke eder ve NO oluşumunu önlerler. N^G-monometil-L-arginin (L-NMA) ve N^G-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) iki önemli NO-sentaz inhibitörüdür.

d- NO'in Etki Mekanizması:

Hücreler arası sinyal iletiminde rol oynayan çoğu moleküller, (hormon, nörotransmitter, büyüme faktörü gibi) plazma membranı ile ilgili protein reseptörler aracılığı ile etki oluşturur. Bunun tersine NO sentez edildiği hücreden dışarıya difüze olarak hedef hücrelerde etki oluşturur. NO'in en bilinen reseptörü hem grubunda veya demir-kükürt kompleksinde bulunan demirdir. NO bazı etkilerini oluştururken demir içeren enzimlere bağlanır ve enzimleri aktive veya inaktive eder. NO guanilat siklazın hem grubundaki demire bağlanarak enzimi aktive eder. Hücrelerde guanilat siklaz enziminin aktivasyonu guanozin trifosfat (GTP)'tan ikinci ulak olarak, siklik guanozin monofosfat oluşumunu (sGMP) artırarak, hücresel işlevleri oluşturur. NO vazodilatör ve patojenleri öldürücü etkisini sGMP'yi artırarak oluşturur (44)(Şekil 7). Guanilat siklaz enzimini inhibe eden metilen mavisi ve hidrokinon NO'in etkilerini ortadan kaldırır (10).

NO ayrıca adenosil ribozasyonu yoluyla da etki yapar. ADP- riboz grubu genellikle bir protein hedefe bağlıdır. Ayrıca hücre içinde NO, enzim aktivasyonu olmaksızın oto adenosil-ribozillenmeyi de aktive edebilir. Örneğin; NO glikolitik bir enzim olan gliseraldehid- 3 fosfat- dehidrogenaz'ı ona bir ADP- riboz grubu bağlayarak inaktif hale getirir ve glikoliz ile ATP oluşumunu engeller (44).



Şekil 7: Endotel kaynaklı nitrik oksid'in hedef hücrelerdeki temel etkileri.

e- NO'nin Salınımı:

Endotel hücreleri üzerindeki muskarinik reseptörlerin stimülasyonu ile endotelden salınan EDRF, damar düz kasında gevşemeye yol açar. EDRF'ün salınımı sadece asetilkoline bağlı değildir. İnsan dahil çeşitli memeli türlerinde, kimyasal ve fiziksel etkenlerin endotelden EDRF salıverdikleri bulunmuştur.

EDRF salıverilmesine neden olan kimyasal etkenler arasında bulunan vazoaaktif endojen maddeler ve ilaçlar şunlardır:

- Asetilkolin
- Histamin
- Serotonin
- Vazopresin
- Bradikinin
- Prostatiklin
- Vazoaaktif intestinal peptid (VIP)
- P maddesi
- Kalsitonin geni ile ilişkili peptid
- İnsülin
- Klonidin (α_2 reseptörler aracılığıyla)
- Katekolaminler (α_2 reseptörler aracılığıyla)

Trombosit agregasyonu sırasında aktive edilen trombositlerin salıverdiği ATP ve ADP maddeleri ile pıhtılaşma sırasında oluşan trombin de EDRF salgılanmasına neden olur. EDRF, endotelde Ca^{++} 'a bağımlı bir şekilde sentez edilip, salıverildiğinden kalsiyum iyonoforu olan kalsiminin EDRF salıverir (10).

Bu etkenlerden çoğu endoteli intakt damarlarda gevşeme yaptıkları halde, endoteli tahrip edilen damarlarda damar düz kası üzerindeki direkt etkileri ile kasılma yaparlar. Damar içinden geçen kan akımının hızlanması gibi fiziksel faktörler de EDRF salıverilmesini stimüle ederek damarlarda gevşeme yapar (10).

f- NO'in Fizyolojik ve Patofizyolojik Olaylardaki Rolü:

NO'in Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri:

Eksojen olarak uygulanan nitratların vasküler sistem üzerine etkileri yıllardır bilinmesine karşın 1980 yılında Furchgott ve Zawadski tarafından endotelial hücreler tarafından salınan bir maddenin vazodilatasyon oluşturduğu bulunmuştur. Araştırmacılar endoteli olan aort halkalarında agonist ilaçların gevşeme cevabı oluşturduğunu, fakat endoteli hasarlanmış dokularda bu cevabın oluşmadığını bulmuşlardır. EDRF adı verilen bu maddenin NO olduğu birkaç yıl sonra ortaya çıkmıştır (48).

a)- NO'in Vazodilatasyondaki Rolü:

NO'in bazal durumda damar endotelinden sürekli olarak salıverildiği ve vazodilatör tonus oluşturup damar rezistansının fizyolojik düzenlenmesine katkıda bulunduğu sanılmaktadır. L-NMMA verilmesi ile NO sentezinin inhibe edilmesinin sıçan, kobay ve tavşanlarda kan basıncını yükselttiği bulunmuştur. Bu olay L-arginin verilerek tersine çevrilmiştir (10).

NO damarları direkt etkisi ile gevşetmektedir. Asetilkolin gibi bir agonist endotelial hücrelerdeki reseptörlerine bağlandığında hücre içi Ca^{++} 'da geçici bir artış oluşturmaktadır. Ca^{++} kalmodülin'e bağlanmakta ve Ca^{++} -kalmodülin kompleksi endotelial NO-sentazı aktive ederek NO oluşturmaktadır. Daha sonra NO endotelial hücreden komşu düz kas hücrelerine diffüze olarak guanilat siklaz'ın hem

grubuna bağlanmaktadır. Guanilat siklaz aktivasyonu ile oluşan sGMP protein kinazlar aracılığıyla gevşeme cevabı oluşturmaktadır. Biyolojik sıvılarda NO'nin yarı ömrü kısa olduğundan etki geçer geçmez damar düz kası kasılmakta ve yeni NO yapımı olmadan gevşeyememektedir (44).

b)-NO'nin Kan Akımındaki Rolü:

İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan araştırmalarda hasarlı dokuda oluşan iskemi sonrası reperfüzyon ile oluşan vazodilatör etkiden NO'nin sorumlu olduğu gösterilmiştir. Yalnız bazı araştırmacılar tarafından hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda iskemi ve reperfüzyon sonrası NO düzeyinin azaldığı bulunmuştur. Hayvanlar üzerinde yapılan izole kalp çalışmalarında ise kan akımındaki artış ile NO salınımı ve vazodilatasyonda artış gözlenirken, kan basıncı artışı ile NO salınımında artış arasında bir bağlantı bulunamamıştır. Komşu dokular tarafından salınan bradikinin ve asetilkolin gibi bazı maddeler de bazı damarlarda NO salınımına neden olmaktadır. Bazal düzeyde salınan NO beyin, kalp, akciğer, gastrointestinal kanal ve böbrek gibi bazı organlarda kan akım hızının endojen otoregülasyonunu yapmaktadır. Damar sisteminde NO salınımı otonom sinir sistemi tarafından düzenlenmektedir. NO sentaz içeren parasempatik sinir uçları serebral ve retinal arterler gibi büyük damarların adventisya tabakasında sonlanmaktadır. Sinir ucundan salınan NO damar dışı kas dokusuna geçerek gevşeme oluşturur (44).

c)- Hipertansiyon, Ateroskleroz ve Vazospazmda NO'nin Rolü:

EDRF eksikliğinin, deney hayvanlarında hipertansiyon, ateroskleroz ve diyabet gibi hastalıkların patogenezeine katkıda bulunduğunu gösteren kanıtlar vardır (10). Esansiyel hipertansiyonlu hastalarda asetilkoline bağlı vazodilatasyon cevabının sağlıklı kişilerden az olması bize hipertansiyonda endotelin normal olmadığını göstermektedir. Tersine, hipertansiyonlu ve sağlıklı kişilerde NO salıvererek etki gösteren sodyum nitroprussid ile eşit miktarda vazodilatasyon oluşması vasküler düz kasın hipertansiyonda normal olduğunu göstermektedir (49). Hipertansiyonlu hastalarda endotelial NO-sentaz düzeyinin azalması asetilkolin cevabında rol oynayabilir. Sağlıklı kişilerde NO-sentaz inhibitörleri ile kan basıncında yükselme gözlenirken, hipertansiyonlu kişilerde bu etki görülmemektedir. Bu da bize hipertansiyonlu hastalarda NO düzeyinin düşük olduğunu göstermektedir. Buna

karşın hipertansiyonlu hastaların arterlerinde NO-sentaz aktivitesi normal bulunmuştur. Bu verilere dayanarak hipertansiyonlu hastalardaki NO-sentazın değişik bir yapısı olabileceği varsayımı üzerinde durulmaktadır (44).

NO yalnızca sistemik kan basıncının değil beyin, böbrek, akciğer, kalp, gastrointestinal kanal gibi spesifik damar yataklarındaki lokal kan akım hızını da düzenlemektedir. NO oluşumundaki defektler belirli organlarda vazospazma neden olurlar. Hepatorenal sendrom, prinzmetal angina, raynaud hastalığı ve preeklampside de NO'in rolü olduğu düşünülmektedir (44).

Diyabet ve ateroskleroz endotelial fonksiyonun değiştiği hastalıklardandır. Ateroskleroz sadece lipid birikiminin neden olduğu basit bir patolojik bozukluk değildir, gelişiminde bir çok faktörlerin etkili olduğu bir hastalıktır. Endotel hücrelerinden salıverilen prostasiklin (PGI_2) ve endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF/NO) gibi trombosit inhibitörleri trombosit birikimini önlerler, aynı zamanda mediadaki düz kas hücrelerini gevşetebilir ve böylece lümen çapının genişlemesini sağlarlar. Endotelial hücreler düz kas göçü ve çoğalmasını inhibe eden heparan sülfat ve EDRF/NO gibi faktörler de salıverirler. Sonuç olarak endotel hücreleri monosit ve lenfositlerin arterin luminal yüzeyine adezyonunu engelleyen bir yüzey oluşturmaktadır. Hasarlı endotel hücrelerinde azalmış olan PGI_2 ve EDRF/NO üretimi, bu hücrelerin daha trombojenik olmasına yol açar. Ateroskleroz gelişme olasılığı yaş, cinsiyet, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, diyabet, şişmanlık, sigara içme alışkanlığı, fiziksel inaktivite ve stres gibi risk faktörleri ile yüksek korelasyon gösterir. Bu risk faktörlerinin ateroskleroza başlatmasında endotelyumdan EDRF/NO salıverilmesini azaltarak rol oynadıkları yönünde önemli bulgular vardır. Gerçekten de endotelyumdan EDRF/NO salıverilmesinin yaş, sigara içme, hiperkolesterolemi, esansiyel hipertansiyon ve diyabette azaldığı klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Diğer yandan hayvan çalışmaları, arterlerde herhangi bir morfolojik değişiklik meydana gelmeden önce, hiperkolesterolemik hayvanlardaki endotel hücrelerinin EDRF/NO üretiminde azalma olduğunu ortaya çıkarmıştır, bunun aterosklerozun başlaması için bir etken olabileceği ileri sürülmektedir (42).

Endotele bağımlı gevşemelerin eNOS aracılığı ile geliştiğinin henüz bilinmediği dönemlerde yapılan organ banyosu deneylerinde aterosklerotik hayvanlardan alınan damar segmentlerinde bu gevşemelerin olmadığı saptanmıştır. Hemen ardından insanlarda yapılan invaziv incelemeler aterosklerozlu hastaların koroner arterlerinde endotele bağımlı gevşemelerin zayıfladığını ortaya koymuştur. Zarar görmüş eNOS yolağı sağlıklı arterlerde dilatasyona neden olan uyarıların paradoksik kontraksiyonlara dönüşmesine neden olmakla kalmaz, aynı zamanda Katekolamin'lere ve serotonin'e karşı verilen vazokonstriktör cevabın artmasına ve trombosit agregasyonuna yatkınlığa da zemin hazırlar (42).

Süperfüzyon biyoeseyi kullanılarak tavşan aortasında yapılan NO ölçümleri, aterosklerotik arterlerde NO biyosentezinin azaldığını ya da yıkımının arttığını göstermiştir. Plak üzerindeki endotel hücrelerinin NO biyosentezinde görülen bu azalma kısmen endotel reseptörlerin selektif değişime uğramasından kaynaklanabilir (42). Ancak çok sayıda in vitro çalışma NO'nin aterojenez sürecindeki bazı mekanizmaları baskılayabildiğini ortaya koymuştur. Bugün oksidatif stresin aterosklerozun başlamasında önemli bir faktör olduğu kabul edilmekte ve bu görüşten hareketle süperoksit iyonunun NO tarafından inaktive edilmesi oksidasyondan koruyucu bir mekanizma olarak düşünülmektedir (42).

Diğer yandan, in vitro araştırmalar yüksek konsantrasyonda NO'nin eNOS aktivitesini feedback inhibisyonla azaltabileceğini ortaya koymuştur. Gerçekten de sürekli olarak NO salıveren bir NO donörünün yüksek dozlarıyla uzun süreli olarak tedavi gören tavşanlarda endotele bağımlı gevşemenin iki farklı mekanizma ile azaldığı saptanmıştır. Bunlardan ilki, gerek aterosklerotik gerekse aterosklerotik olmayan damar bölümlerinde eNOS'a bağlı NO üretiminde görülen azalma , ikincisi ise donörün vasküler düz kas hücrelerini NO'e karşı duyarsızlaştırmasıdır.

NO düzeyinin anormal artışı hastalıklar pek bilinmese de idiyopatik ortostatik hipotansiyon aşırı NO yapımı ile ilişkili olabilir (44).

d)- NO'in Kalp Kontraktilitesi ve Pıhtılaşmadaki Rolü:

Kalp üzerinde NO negatif kronotrop ve negatif inotrop etkilidir **(11)**. Viral miyokarditte NO- sentaz'ın indüklendiği gösterilmiştir. Miyokardit sırasında oluşan reversibl sol ventrikül fonksiyon bozukluğundan aşırı NO yapımı sorumlu tutulmuş ve NO yapımında azalma olması ile bu etkinin ortadan kalktığı gözlenmiştir **(44)**.

NO trombositler üzerinde direkt etki göstererek pıhtılaşmayı azaltmaktadır. Endotel hücreleri tarafından yapılan NO damar lumeni içine ve trombositler içine de girebilir. Trombositler içinde de NO-sentaz aktivitesine rastlanmıştır **(50)**. Trombosit agregasyonunu ve adezyonunu önleyerek pıhtılaşmayı engeller. Bu etkinin moleküler mekanizması tam olarak açıklanamasa da NO'in trombosit guanilat siklaz'ını ve adenilat siklaz'ını aktive ederek, trombosit fosfalipaz C'sini inhibe ederek veya trombosit gliseralehid 3-fosfat dehidrogenaz'a ADP-Riboz grubu ekleyerek pıhtılaşmayı engellediği düşünülmektedir.

Sepsik Hipotansiyonda NO'in Rolü:

Sepsiste oluşan hipotansiyondan NO'in sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bakteriyel enfeksiyonlarda bakteriyel hücre duvarından salınan lipopolisakkarid komponentler makrofaj, hepatosit, endotel hücresi gibi birçok hücrede indüklenebilir NO-sentaz üretimini artırmaktadır. Büyük miktarlarda NO'in kan dolaşımına katılması arteriyel düz kası gevşeterek hipotansiyona neden olmaktadır. Hayvanlarda sepsisin NO-sentaz inhibitörleri ile engellenmesinin dakikalar içinde hipotansiyonu ortadan kaldırdığı gözlenmiştir. Birkaç sepsisli hasta NO-sentaz inhibitörleri ile tedavi edilmiş ve ortalama arteriyel basıncın 50-90 mm-Hg civarında arttığı, sistemik vasküler direncin iki katına çıktığı gözlenmiştir. Bu da büyük miktarda NO yapımının sepsiste hipotansiyona neden olduğu varsayımını doğrulamaktadır. Fakat sepsiste oluşan hipotansiyonda rol oynayan mekanizmalar yalnızca NO ile ilgili olmadığından hastalar yine de kısa bir zaman içinde kaybedilmektedir **(51)**.

Nörotransmitter olarak NO:

Beyinde belirli nöronlarda NO sentezinin yapıldığı ve bu maddenin nörotransmitter işlevi yapabileceği gösterilmiştir. NO-sentaz enziminin dağılımını histokimyasal yöntemlerle incelemek suretiyle nitrejik nöronların beyindeki dağılımını belirlemek mümkün olmuştur (10).

Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarla NO-sentaz, gastrointestinal sistemde myenterik pleksusta yaygın olarak bulunmaktadır. Gastrointestinal sistem nöronlarından salınan NO yemek sonrası mide, ileokolonik bileşke ve anal sfinkterde gevşemeye yol açar. Pelvik plexus nöronlarındaki NO-sentaz ile oluşan NO penil ereksiyonda nörotransmitter olarak rol oynamaktadır.

Serebellumda NO-sentaz içeren nöronların bulunması bize NO'in koordinasyon ve denge fonksiyonlarında da rol oynayabileceğini göstermektedir. Kokunun sinyal iletiminde de NO'in etkisi vardır (44).

Nöronlardan salınan NO komşu nöronlarda bir dizi reaksiyon sonucu diffüze olur. Glutamatın N-metil D-aspartat reseptörüne bağlanması ile presinaptik nöron uyarılır. Bu reseptörde bulunan Ca^{++} kanalının açılması ve hücre içine giren kalsiyum'un kalmodülin'le birleşmesi sonucu oluşan kompleks nöronal NO-sentazı uyarır. NO oluşuktan sonra postsinaptik nörona geçerek guanilat siklazın hem grubuna bağlanıp sGMP oluşturur. Fizyolojik koşullarda beyinde oluşan küçük miktarlarda NO glutamat' ın sGMP düzeylerini artırmasına neden olurken inmede masif miktarda salınan glutamat ile büyük miktarlarda NO oluşumu komşu nöronlarda nörotoksik etki oluşturur. Santral sinir sistemindeki NO-sentaz içeren nöronlar NADPH varlığında nitroblue tetrazolium ile boyanır ve NADPH diaforaz nöronları olarak bilinir.

Vasküler inmede NO-sentaz içeren nöronlar nörotoksiste oluşumunda rol oynarlar. İnmede büyük miktarlarda eksitator bir aminoasit olan glutamat salınımı olur. Yüksek dozda glutamat veya türevlerinden N-metil-D-aspartat kullanılması inmedekine benzer nörolojik hasar oluşturur. Glutamat reseptörünün N-metil-D-aspartat sub-tipini bloke eden ajanlar serebral arter oklüzyonunda bile inmenin oluşturduğu

nörolojik hasarı önlerler. Bu etkinin NO aracılığıyla olduğunun ileri sürülmesinin nedeni NO-sentaz inhibitörlerinin doku kültüründe glutamat'ın nörotoksik etkilerini önlemeleri ve fare, sıçan ve kedilerde serebral arter ligasyonu sonrası oluşan nörolojik hasarı önlemeleridir. NO-sentaz inhibisyonu aynı zamanda damarlarda vazokonstriksiyon oluşturur ve oluşan serebral iskemi NO-sentaz inhibisyonunun yararlı yönlerini yok edebilir. Bu nedenle çok yüksek dozlarda NO-sentaz inhibitörleri verilmesinin bazı hayvan çalışmalarında inmeyi önlemede faydalı olmadığı gözlenmiştir (44, 52).

f- NO'nin Tedavideki Yeri:

Anjina pectoris tedavisinde nitratların uzun yıllardan beri kullanılmasına karşın etki mekanizması ancak son yıllarda açıklığa kavuşmuştur. Nitratlar NO oluşturarak koroner arterlerin direkt vazodilatasyonuna neden olmaktadır. Nitroprussid gibi bazı nitratlar spontan olarak parçalanarak NO oluştururken nitroglicerine ve izosorbiddinitrat hücreler tarafından parçalanmaktadır.

İnhalasyon yoluyla uygulanan NO pulmoner arterleri gevşeterek pulmoner vasküler direncin düşmesine neden olurken NO'nin hemen metabolize olması sistemik vasküler dirençte herhangi bir değişiklik oluşturmamaktadır. Yeni doğanlarda oluşan pulmoner hipertansiyonda pulmoner arterleri genişletmek için kullanılmaktadır. Adult respiratuvar distres sendromunda da (ARDS) NO, pulmoner arter basıncını ve intrapulmoner şantları azaltarak etkili olmaktadır. NO'nin hayvanlarda myokardiyal infarktüs büyüklüğünü değiştirdiği de gözlenmiştir. Bu etkinin mekanizması ise vazodilatasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonunun azalması veya radikal moleküllerin ortamdan uzaklaştırılması olabilir (53).

NO ile inhalasyon tedavisinin bronşiyal astım veya kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastalarda bronş düz kasını gevşeterek bronkodilatasyona neden olabileceği de düşünülmektedir (53).

NO-sentaz inhibitörleri sepsiste oluşan hipotansiyonu önlemekte başarıyla kullanılmalarına karşın mortaliteyi tam olarak azaltmamaktadır. NO sentezinin arttığı diğer patolojik durumlarda inhibitörlerin kullanılıp, kullanılmayacağı tam olarak

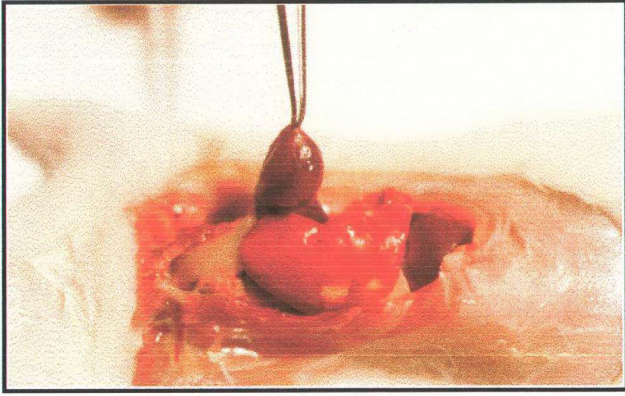
bilinmemektedir. NO-sentaz inhibitörlerinin bazı hayvan modellerinde inme sonucu oluşan infarkt büyüklüğünü azalttığı gözlenirken, bazı hayvan türlerinde de etkili olmadığı gözlenmiştir. NO'in bir çok fizyolojik olaydaki rolü açıklandığından NO-sentaz inhibitörlerinin ilaç olarak kullanımı oldukça kısıtlıdır. Nöronal NO sentaz inhibisyonu inmenin şiddetini azaltırken öte yandan endotelial NO-sentazın da inhibisyonu hipertansiyon ve hiperkoagülabileiteye yol açabilecektir. En sık kullanılan NO-sentaz inhibitörleri L-NMMA ve L-NAME'dir. Bu bileşikler nonselektif olarak tüm NO-sentaz formlarını inhibe edebilmektedir. Hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere spesifik NO-sentaz inhibitörlerinin geliştirilmesine çalışılmaktadır (44).

III- GEREÇ VE YÖNTEM

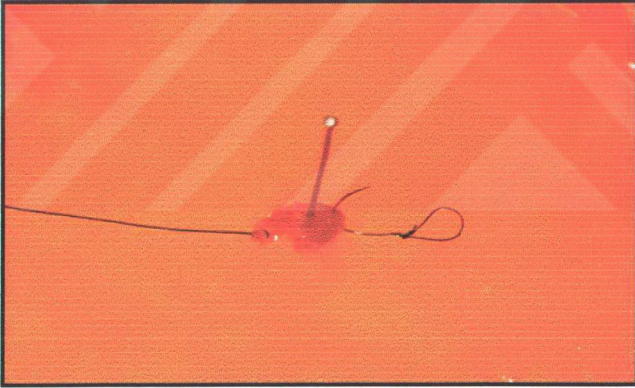
Çalışmada, aynı laboratuvar koşullarında yetiştirilmiş, 250-300 g ağırlığında, erkek Wistar sıçanları kullanıldı. Sıçanlar herhangi bir anestezi madde kullanılmadan servikal dislokasyon ile öldürüldü. Göğüs kafesi açılarak çıkarılan kalp, modifiye Hukovich Krebs Solüsyonu içeren (mM olarak: NaCl 112,8; KCl 4,7; MgSO₄ 7H₂O 2,5; CaCl 4,5; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; Glukoz 11,5 içermektedir ve pH:7,4 tür) petri kutusuna alındı **(54) (Resim 2,3)** Sağ ve sol atriyum birlikte zedelenmeden hızlı bir şekilde kalp dokusundan temizlendi. Bu işlem sırasında petri kutusu içindeki fizyolojik solüsyon % 95 O₂ + % 5 CO₂ gaz karışımı ile havalandırıldı.

Petri kutusuna alınan sağ ve sol atriyum aorttan bir toplu iğne geçirilerek petri kutusu içinde sabitleştirildi **(Resim 3)**. Daha sonra sağ ve sol atriyum apekslerinden düğüm atılarak bağlandı. Düğümlerden bir tanesi halka oluşturacak şekilde bağlanıp, bu halka organ askısının kancasına geçirildi. Organ askısına asılan spontan olarak atan sağ ve sol atriyum, 37° C de % 95 O₂ + %5 CO₂ ile gazlandırılmış olan Modifiye Hukovich Krebs' solüsyonu içeren 30 ml'lik organ banyosuna asıldı **(Resim 4)**. Diğer apekse bağlanan ipliğin ucu ise gerilim transduserine (Grass 7 PT 03E force-displacement transdüser) bağlandı **(54)**.

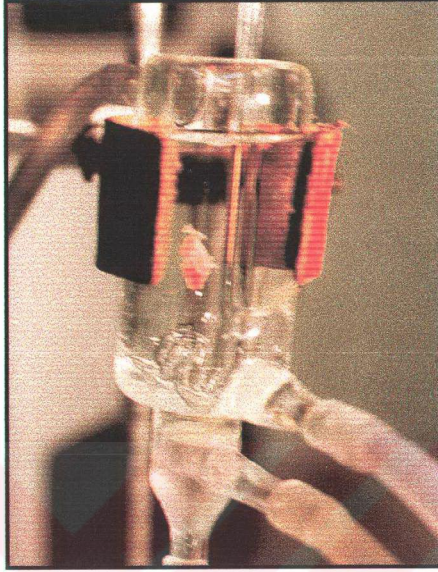
Her bir preparata 0.4 g gerilim uygulanarak, en az 45 dakika dinlenme periyoduna bırakıldı. Dinlenme periyodu süresince her 15 dakikada bir organ banyosu içerisindeki solüsyon taze Modifiye Hukovich Krebs solüsyonu ile değiştirildi. Spontan atan izole sıçan atriyumunda, atım hızında meydana gelen değişiklikler Grass 7 F Poligrafa bağlı bir izometrik gerilim transduseri (Grass 7 PT 03E force-displacement transdüser) aracılığı ile yazdırıldı **(54)**.



Resim 2: Sığan kalbinin çıkarılması.



Resim 3: İzole sıçan atriyumunun görünümü.



Resim 4: İzole sıçan atriyumunun organ banyosu içinde görünümü.

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^{-4} M) ilave edilerek kontrol adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi elde edildi (55). Her bir adenozin dozu arasında bir dakika beklendi. 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 doku 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 (9). Daha sonra adenozin kümülatif olarak ilave edilerek adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi elde edildi. Bu cevaplar kontrol adenozin konsantrasyon- cevap eğrileri ile karşılaştırıldı.

İstatistiksel analiz:

Verilerin analizinde varyans analizi (**ANOVA**), onu izleyen post-hoc testler (**TUKEY-KRAMER**) ve unpaired t-testi kullanıldı (Graphpad Instat V2.05a-1994). Bulgular ortalama $\pm$ SH (standart hata) şeklinde gösterildi. $p < 0.05$ olması durumunda aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Deneyde kullanılan ilaçlar: Çalışmaya başlamadan önce adenozin deiyonize su ile çözülerek (**56**). 10^{-2} M konsantrasyonda stok solüsyon hazırlandı ve kullanılacağı gün Modifiye Hukovich Krebs solüsyonu ile dilüe edildi.

Kullanılan ilaçların elde edildiği kaynaklar:

Adenozin : Merck , ABD

L-NAME : Sigma®, ABD

İzoproterenol: Sigma®, ABD

IV- 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 ($p>0.05$)(**Tablo 3**).

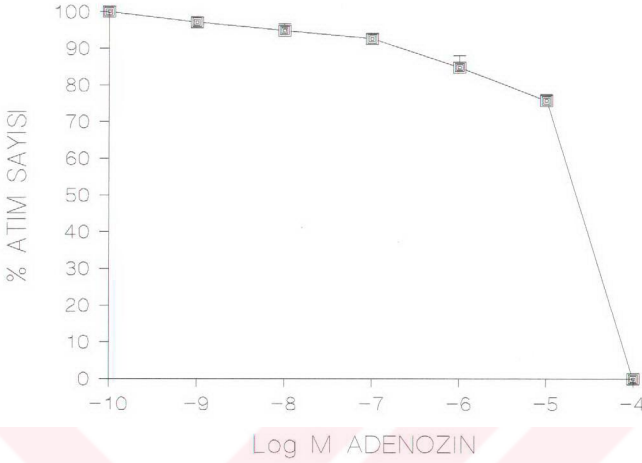
Tablo 3: Spontan atan izole sıçan atriyumunun başlangıç atım hızı ortalamaları

Atım Sayısı / dk (Ortalama $\pm$ SH)	
ADENOZİN (kontrol) (n=6)	295.0 ± 6.2
10^{-6} M L-NAME + ADENOZİN (n=6)	316.7 ± 13.3
10^{-5} M L-NAME + ADENOZİN (n=6)	298.3 ± 12.8
10^{-4} M L-NAME + ADENOZİN (n=6)	300.0 ± 5.2

Kontrole göre $p>0.05$

A- ADENOZİNİN ATIM HIZI ÜZERİNE ETKİSİ:

Spontan atan izole sıçan atriyumunda adenozin konsantrasyona (10^{-9} M - 10^{-4} M) bağımlı olarak negatif kronotrop etki oluşturdu (**Şekil 8**)(**Tablo 4**). 10^{-4} M adenozin konsantrasyonu ile maksimum inhibisyon cevabı elde edildi. PD_2 , IC_{50} ve E_{maks} (%) değerleri sırasıyla 5.7 ± 0.1 , 5.5 ± 0.1 , 100.0 ± 0.0 olarak bulundu (n=6)(**Tablo 5**).



Şekil 8: Kümülatif konsantrasyonda uygulanan adenozinin (10⁻⁹ M-10⁻⁴ M) spontan atan izole sıçan atriyumunda atım hızı üzerine negatif kronotrop etkisi. Sonuçlar atriyumun başlangıç atım hızı % 100 kabul edilerek, adenozin cevabının buna göre yüzdesi alınarak bulunmuştur. (■) Kontrol adenozin konsantrasyon cevap eğrisi.

Tablo 4: Spontan atan izole sıçan atriyumunda adenozinin atım hızı üzerine etkisi

Atım Hızı / dk (Ortalama ± SH)		
	Sayı / dk	Yüzde (%)
Başlangıç Atım Hızı	295 ± 6.2	100.0 ± 0
10 ⁻⁹ M Adenozin	286.7 ± 8.8	97.1 ± 1.4
10 ⁻⁸ M Adenozin	280.7 ± 9.7	94.8 ± 4.7
10 ⁻⁷ M Adenozin	273.3 ± 8.4	92.6 ± 1.4
10 ⁻⁶ M Adenozin	248.3 ± 7.5	84.8 ± 3.2*
10 ⁻⁵ M Adenozin	223.3 ± 6.7	75.7 ± 1.7*
10 ⁻⁴ M Adenozin	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0*

(n=6) Başlangıç atım hızına göre p<0.001

Tablo 5: Adenozin cevabı üzerine L-NAME'nin etkisi

İLAÇ	E _{maks} (%)	İC ₅₀	pD ₂
ADENOZİN (kontrol) (n=6)	100.0± 0.0	5.5 ± 0.1	5.7 ± 0.1
10 ⁻⁶ M L-NAME+ ADENOZİN (n=6)	77.6 ± 15.1	5.6 ± 0.1	5.7 ± 0.1
10 ⁻⁵ M L-NAME+ ADENOZİN (n=6)	50.7 ± 17.2**	4.7 ± 0.2*	4.9 ± 0.2*
10 ⁻⁴ M L-NAME+ ADENOZİN (n=6)	29.1 ± 6.3*	4.9 ± 0.1	5.1 ± 0.1**

* Kontrole göre p<0.01

** Kontrole göre p<0.05

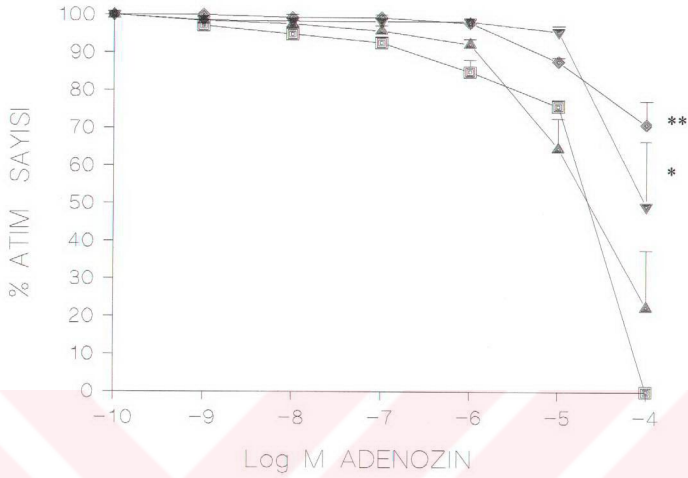
B- L- NAME + ADENOZİNİN ATIM HIZI ÜZERİNE ETKİSİ:

Adenozin spontan atan izole sıçan atriyumunda konsantrasyona bağımlı olarak negatif kronotrop cevap oluşturdu. Artan L-NAME konsantrasyonu ile beraber pD₂ değerlerinde kontrol grubuna göre azalma olduğu bulundu (**Tablo 5**). Bu gruplarda , adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevaplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. L-NAME varlığında adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevapta azalma saptandı. (F=8.564, p=0.0007) .

a) 10⁻⁶ M L-NAME'in adenozin cevabına etkileri:

Çalışmamızda, 10⁻⁶ M L-NAME varlığında elde edilen adenozin konsantrasyon-cevap eğrisinin pD₂, İC₅₀ ve E_{maks} (%) değerleri sırasıyla 5.7 ± 0.1, 5.6± 0.1, 77.6 ± 15.1 olarak bulundu (n=6)(**Tablo 5**). 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. 10⁻⁶ M L-NAME varlığında adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevapda anlamlı bir azalma saptanmadı (p>0.05)(**Şekil 9**).

10⁻⁶ M L-NAME varlığında adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevaba ait bulgular tablo 6 da gösterilmiştir.



Şekil 9: Adenozinin spontan atan izole sıçan atriyumunda oluşturduğu negatif kronotrop cevaba L-NAME'min 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)

Tablo 6: 10⁻⁶ M L-NAME varlığında adenozin cevapları

Atım Hızı / dk (Ortalama ± SH)		
	Sayı / dk	Yüzde (%)
10 ⁻⁶ M L-NAME ile İnkübasyondan sonra atım hızı	316.7 ± 13.3	100.0 ± 0
10 ⁻⁶ M L-NAME + 10 ⁻⁹ M Adenozin	311.7 ± 13.3	98.5 ± 1.0
10 ⁻⁶ M L-NAME + 10 ⁻⁸ M Adenozin	308.3 ± 11.4	97.5 ± 0.9
10 ⁻⁶ M L-NAME + 10 ⁻⁷ M Adenozin	303.0 ± 12.7	95.7 ± 1.3
10 ⁻⁶ M L-NAME + 10 ⁻⁶ M Adenozin	291.3 ± 9.9	92.2 ± 1.3
10 ⁻⁶ M L-NAME + 10 ⁻⁵ M Adenozin	204.7 ± 25.2	64.5 ± 7.9
10 ⁻⁶ M L-NAME + 10 ⁻⁴ M Adenozin	67.5 ± 44.1	22.4 ± 15.1

(n=6) Kontrolle göre p>0.05

b) 10^{-5} M L-NAME'in adenozin cevabına etkileri:

Çalışmamızda, 10^{-5} M L-NAME varlığında elde edilen adenozin konsantrasyon-cevap eğrisinin pD_2 , IC_{50} , E_{maks} (%) değerleri sırasıyla 4.9 ± 0.2 , 4.7 ± 0.2 , 50.7 ± 17.2 olarak bulundu ($n=6$)(**Tablo 5**). 10^{-5} M L-NAME varlığında elde edilen adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi ile kontrol adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevap 10^{-5} M L-NAME varlığında anlamlı olarak azaldı ($p<0.01$)(**Şekil 9**). 10^{-5} M L-NAME varlığında adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevaba ait bulgular tablo 7 de gösterilmiştir.

Tablo 7: 10^{-5} M L-NAME varlığında adenozin cevapları

ATIM HIZI (Ortalama $\pm$ SH)		
	Sayı / dk	Yüzde (%)
10^{-5} M L-NAME ile İnkübasyondan sonra atım hızı	298.3 ± 12.8	100.0 ± 0.0
10^{-5} M L-NAME + 10^{-9} M Adenozin	294.3 ± 14.1	98.7 ± 0.9
10^{-5} M L-NAME + 10^{-8} M Adenozin	293.0 ± 12.9	98.2 ± 0.9
10^{-5} M L-NAME + 10^{-7} M Adenozin	293.0 ± 12.9	$98.2 \pm 0.9^*$
10^{-5} M L-NAME + 10^{-6} M Adenozin	293.0 ± 12.9	$98.2 \pm 0.9^*$
10^{-5} M L-NAME + 10^{-5} M Adenozin	285.3 ± 15.0	$95.5 \pm 1.5^*$
10^{-5} M L-NAME + 10^{-4} M Adenozin	151.5 ± 53.4	$50.9 \pm 17.9^*$

($n=6$)

*Kontrolle göre $p<0.05$

c) 10^{-4} M L-NAME'in adenozin cevabına etkileri:

Çalışmamızda, 10^{-4} M L-NAME varlığında elde edilen adenozin konsantrasyon-cevap eğrisinin pD_2 , IC_{50} , E_{maks} (%) değerleri sırasıyla 5.1 ± 0.1 , 4.9 ± 0.1 , 29.1 ± 6.3 olarak bulundu ($n=6$)(**Tablo 5**). 10^{-4} M L-NAME varlığında elde edilen adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi ile kontrol adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Adenozinin oluşturduğu negatif

kronotrop cevabın 10^{-4} M L-NAME varlığında anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p<0.05$) (**Şekil 9**).

10^{-4} M L-NAME varlığında adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevaba ait bulgular tablo 8 de gösterilmiştir.

Tablo 8: 10^{-4} M L-NAME varlığında adenozin cevapları

Atım Hızı (Ortalama $\pm$ SH)		
	Sayı / dk	Yüzde (%)
10^{-4} M L-NAME ile İnkübasyondan sonra atım hızı	300.0 $\pm$ 5.2	100.0 $\pm$ 0.0
10^{-4} M L-NAME + 10^{-9} M Adenozin	300.0 $\pm$ 5.2	100.0 $\pm$ 0.0
10^{-4} M L-NAME + 10^{-8} M Adenozin	297.7 $\pm$ 5.7	99.2 $\pm$ 0.8
10^{-4} M L-NAME + 10^{-7} M Adenozin	297.7 $\pm$ 5.7	99.2 $\pm$ 0.8*
10^{-4} M L-NAME + 10^{-6} M Adenozin	293.3 $\pm$ 5.9	97.8 $\pm$ 1.0*
10^{-4} M L-NAME + 10^{-5} M Adenozin	262.7 $\pm$ 4.9	87.6 $\pm$ 1.0*
10^{-4} M L-NAME + 10^{-4} M Adenozin	212.7 $\pm$ 19.3	70.9 $\pm$ 6.3*

(n=6)

*Kontrole 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. 10^{-6} M L-NAME varlığında adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevabın, 10^{-5} M ve 10^{-4} M L-NAME varlığında anlamlı olarak azaldığı saptandı (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 istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

V. TARTIŞMA

Adenozin kardiyovasküler sistemde negatif inotrop, negatif kronotrop ve negatif dromotrop etki yapan bir ajandır. Bu etkilerinin, adenozin A_1 reseptörlerinin aktivasyonuna, indirek antiadrenerjik etkilere, potasyum iletiminde artmaya veya yavaş kalsiyum kanallarından kalsiyum iletiminde azalmaya bağlı olabileceği gösterilmiştir (3, 25, 26).

Yaptığımız çalışmada, adenozin ile spontan atan izole sıçan atriyumunda konsantrasyona bağımlı olarak negatif kronotrop cevap elde edildi. Farklı araştırmacılar tarafından kobay atriyumu (5), sıçan atriyumu (6) ve insan atriyumu (8) ile yapılan çalışmalarda da adenozinin konsantrasyona bağımlı olarak negatif kronotrop cevap oluşturduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda adenozin konsantrasyon cevap eğrisinin pD_2 değeri 5.7 ± 0.1 olarak bulundu. Bu sonuç, 1974 yılında Küçükhüseyin ve arkadaşlarının kobay atriyumunda (5), 1981 yılında Kurashi ve arkadaşlarının sıçan atriyumunda (6), 1986 yılında Marmo ve arkadaşlarının ise insan atriyumunda (8) adenozin ile yaptıkları çalışmaların sonuçları ile uyumlu bulundu. 1974 yılında Küçükhüseyin ve arkadaşları, spontan atan yada elektrik ile stimüle edilen kobay atriyumunda adenozinin atım hızını ve kasılma gücünü azalttığını göstermişlerdir. Adenozinin negatif inotrop etkisinin ekstrasellüler Ca^{++} konsantrasyonuna bağlı olabileceğini düşünmüşler ve bu yüzden adenozinin elektrofizyolojik etkilerinde inorganik bir katyon olan Ca^{++} 'un rolünün araştırmışlardır. Düşük Ca^{++} konsantrasyonu adenozinin negatif inotrop etkisini artırırken, artan Ca^{++} konsantrasyonu adenozinin negatif inotrop etkisini bloke etmiştir (5). Yine 1974 yılında Küçükhüseyin ve arkadaşları, memeli kalbinde adenozinin internal Ca^{++} depolarından Ca^{++} salınımını inhibe ederek, membranda Ca^{++} birikimine neden olduğunu ve bununla membrandan K^+ geçişini artırarak negatif inotrop etki oluşturduğunu bildirmektedir (54). 1986 yılında Marmo ve arkadaşları, insan atriyumunda adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop ve negatif inotrop etkilerden pürinerjik reseptörlerin inhibisyonunun sorumlu olduğunu ve P_1 reseptör blokleri aminofilin ile bu etkilerinin tamamen antagonize edildiğini göstermişlerdir (8).

Kobay koroner arteri (9), domuz koroner arteri (57, 58), insan sefan veni endotel hücreleri (57) ve sıçan renal arterinde (59) yapılan çalışmalarda adenozinin vazodilatör etkisinde arteriyel endotelial hücrelerden NO salınımının rolü olduğu bildirilmektedir.

Amanda ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada adenozin ve analogları, adenozin A₂ reseptörleri üzerinden kobay koroner arterinde vazodilatör cevap oluşturmuştur. Bu cevap 3×10^{-5} M L-NAME varlığında anlamlı derecede azalmıştır. Bu sonuç, adenozinin düz kaslarda oluşturduğu vazodilatör cevabın bir kısmından nitrik oksidin sorumlu olabileceğini göstermiştir (9). Fenton ve arkadaşları da, adenozin ile bir saat inkübe edilen domuz karotid arteri ve insan safen veni endotel hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada, banyodaki NO₂ ve NO₃ düzeylerini ölçerek NO oluşumunda artış olduğunu bildirmiştir. Bu artış kompetitif NO sentaz inhibitörü NG- monomethyl-L-arginin (L-NMMA) ve adenozin antagonisti teofilin varlığında önlenmiştir. Bu da adenozinin reseptöre bağımlı bir mekanizma ile arteriyel endotelial hücrelerden nitrik oksid üretimini arttırdığını göstermektedir. (57). Olanrewaju domuz koroner arterinde yaptığı bir çalışmada, adenozin analoglarının hiperpolarizasyona yol açtığını ve bunun 10^{-5} M L-NMMA ve 10^{-5} M L-NAME varlığında azaldığını göstermiştir. L-NAME bu etkisi L-arginin ile geri dönmüştür. (58). Martin ve arkadaşlarının endoteli sağlam sıçan renal arterinde yaptıkları çalışmada, adenozin analogları doza bağımlı olarak gevşeme cevabı oluşturmuştur. Bu cevap L-NAME varlığında inhibe edilmiştir. Adenozinin oluşturduğu bu etkide renovasküler endoteliumdan NO salınımının rolü olduğu bildirilmektedir (59).

Bu çalışmalar adenozinin kalp üzerindeki etkilerinde de, NO'nin rolü olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda spontan atan izole sıçan atriumunda adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop etkide NO'nin rolü araştırıldı. Adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevapda, NO - sentaz inhibitörü L-NAME (10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M)'in etkisi gözlemlendi. 10^{-6} M L-NAME varlığında adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevapda anlamlı bir değişme saptanmadı. 10^{-5} M ve 10^{-4} M L-NAME varlığında adenozin ile oluşan negatif kronotrop cevabın azalması ve adenozin konsantrasyon-cevap eğrisinin değişmesi, adenozin ile spontan atan izole sıçan

atriyumun da oluşan negatif kronotrop cevaba , NO (nitrik oksid) salınımının katkıda bulunabileceğini gösterdi.

Sonuç olarak; adenzin spontan atan izole sıçan atriyumunda konsantrasyona bağımlı olarak negatif kronotrop cevap oluşturdu. Adenzinin oluşturduğu negatif kronotrop cevabın NO - sentaz inhibitörü L - NAME varlığında azalması, adenzinin oluşturduğu negatif kronotrop etkide nitrik oksidin rolü olduğunu dūřündürmektedir.

VI. SONUÇ

Çalışmadan elde ettiğimiz bulgulara göre; adenosin spontan atan izole sıçan atriyumunda konsantrasyona bağımlı olarak atım hızını azaltıp, negatif kronotrop cevap oluşturdu.

Buna karşın L-NAME varlığında, adenosinin oluşturduğu negatif kronotrop cevap azaldı ve L-NAME varlığında adenosinin oluşturduğu konsantrasyon-cevap eğrisi ile kontrol adenosin konsantrasyon-cevap eğrisi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Bu bulgulara dayanarak; spontan atan izole sıçan atriyumunda adenosinin oluşturduğu negatif kronotrop cevapta NO (nitrik oksid) salınımında rolü olabileceği sonucuna varıldı.

VII.ÖZET

Adenozin; çeşitli fizyolojik olayların düzenlenmesinde rolü olan endojen bir nükleotittir. Adenozinin farmakolojik etkilerini P_1 pürinerjik reseptörlerden A_1 , A_2 , A_3 reseptörler üzerinden gösterdiği kanıtlanmıştır **(1,2)**. Adenozin kardiyovasküler sistemde negatif inotrop, negatif kronotrop ve negatif dromotrop etkiye neden olan kardiyodepresan bir ajandır **(24)**.

NO; bazal durumda damar endotelinden sürekli olarak salınan, damar direncinin fizyolojik düzenlenmesine katkıda bulunan ve kalp üzerinde negatif kronotrop, negatif inotrop etkisi olduğu bildirilen endojen bir otakoidtir **(43, 10, 11)**.

Çalışmada, spontan izole sıçan atriyumunda adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevapta NO (nitrik oksid)' in rolü araştırıldı.

Çalışmada , aynı laboratuvar koşullarında yetiştirilmiş 250-300 gr ağırlığında , erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar herhangi bir anesteziik madde kullanılmadan servikal dislokasyonla öldürüldü. Göğüs kafesi açılarak çıkarılan kalp, Modifiye Hukovich Krebs' Solüsyonu içeren petri kutusuna alındı. Sağ ve sol atriyum birlikte zedelenmeden hızlı bir şekilde kalp dokusundan temizlendi. Hazırlanan spontan atan izole atriyum preparatı $37^{\circ}C$ de % 95 O_2 + % 5 CO_2 ile gazlandırılmış olan Modifiye Hukovich Krebs' Solüsyonu içeren 30 ml' lik organ banyosuna asıldı. Her bir preparata 0.4 gr gerilim uygulandıktan sonra 45 dk. dinlenmeye bırakıldı. Dokunun verdiği cevaplar Grass 7 F Poligraf'a bağlı bir izometrik gerilim transduseri (Grass 7 PT-03E force-displacement transduser) aracılığı ile yazdırıldı **(54)**.

Çalışmadan elde ettiğimiz bulgulara göre; adenozin spontan atan izole sıçan atriyumunda konsantrasyona bağımlı olarak atım hızını azaltıp, negatif kronotrop cevap oluşturdu.

Buna karşın L-NAME varlığında, adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevap azaldı ve L-NAME varlığında adenozinin oluşturduğu konsantrasyon-cevap eğrisi ile

kontrol adenozin konsantrasyon-cevap eğrisi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Bu bulgulara dayanarak; spontan atan izole sıçan atriyumunda adenozinin oluşturduğu negatif kronotrop cevapta NO (nitrik oksid) salınımında rolü olabileceği sonucuna varıldı.

VIII. KISALTMALAR:

ATP	= Adenozin trifosfat
G_i	= İnhibitör G proteinin tipi (Adenil siklazı inhibe eder)
G_s	= Stimülatör G proteini tipi (Adenil siklazı stimüle eder)
G_o	= G _{other} . İşlevi tam olarak anlaşılmamış olan G proteini tipi.
NO	= Nitrik oksid
DNA	= Deoksiribonükleik asit
sAMP	= Siklik adenozin 3' 5' monofosfat
sGMP	= Siklik guanozin 3' 5' monofosfat
GDP	= Guanozin difosfat
GTP	= Guanozin trifosfat
PIP₂	= Fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat
PLC	= Fosfalipaz C
IP₃	= İnozitol trifosfat
DAG	= Diasilgliserol
RT-PCR	= Reverse transcription-polymerase chain reaction
EDRF	= Endotel kaynaklı gevşetici faktör
N₂O	= Nitroz oksit
nNOS	= Nöronal NO-sentaz
iNOS	= İmmünolojik NO-sentaz
eNOS	= Endotelyal NO-sentaz
NADPH	= Dihidronikotinamid adenin dinükleotid fosfat
FAD	= Flavin adenin nükleotid
FMN	= Flavin mono nükleotid
L-NAME	= N ^G -nitro-L-arginin metil ester
L-NMA	= N ^G -monometil -L-arginin

IX. 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 A₃ 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 hypertensive rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 1990; 254: 1090- 1099.
5. 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.
6. Kurashi K, Paton DM. Structure- activity relations for negative chronotropic action of adenosine in rat atria. *Br. J. Pharm* 1981; 74: 829.
7. Collis MG. Evidence for an A₁- adenosine receptor in the guinea- pig atrium. *Br. J. Pharmacol* 1983; 78: 207- 212.
8. Marmo E, Filippelli A, Iarussi D, Matera C, Lampa E, Acampora R, Soreca S, Tortora G. Experimental documentation of presence of purinergic receptors at human atria. *Int. J. Tiss. Reac* 1986; 5: 411- 419.
9. Vials A, Burnstock G. A₂ purinoceptor- mediated relaxation in the guinea- pig coronary vasculature: a role for nitric oxide. *Br. J. Pharmacol* 1993; 109: 424- 429.
10. Prof.Dr. Kayaalp O. Otakoidler: In: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji Cilt 3, 6. Baskı, ANKARA; 1993. 2897- 3029.
11. 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.
12. Üstünes L. Türk Farmakoloji Derneği Eğitim Sempozyumları Dizisi: 1. Düz kas preparatları. Türk Farmakoloji Derneği Yayınları, ANKARA; 1993. 65- 117.

- 13.** Bökesoy TA. İzole Organ Preparatları. Türk Farmakoloji Derneği Eğitim Sempozyumları Dizisi. 2. invitro ve in vivo izole- perfüze preparatlar. Türk Farmakoloji Derneği Yayınları, ANKARA; 1994. 57- 61.
- 14.** Prof.Dr. Kayaalp O. Genel Farmakoloji: In: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji Cilt 1, 7. Baskı, ANKARA; 1994. 1- 303.
- 15.** Prof. Dr. Kayaalp O. Otonom Sinir Sistemi İlaçları. In: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji Cilt 3, 6. Baskı, ANKARA ; 1993. 2193- 2241.
- 16.** Wingard, Brody, Larner. Sites of Action : Receptors. Human Pharmacology, 1991. 10-24.
- 17.** Jacobson KA, Trivedi BK, Churchill PC, Williams M. Novel therapeutics acting via purine receptors. Biochem. Pharmacol 1991; 41: 1399 – 1410.
- 18.** Van Calker D, Muller M, Hamprecht B. Adenosine regulates via two different types of receptor, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. J. Neurochem 1979; 33: 999 – 1005.
- 19.** Arend LJ, Handler JS, Rhim JS, Gusovsky F, Spielman WS. Adenosine-sensitive phosphoinositide turnover in a newly established renal cell line. Am. J. Physiol 1989; 256: 1067- 1074.
- 20.** Schiemann WP, Doggwiler KO, Buxton ILO. Action of adenosine in estrogen-primed nonpregnant guinea- pig myometrium: characterisation of the smooth muscle receptor and coupling to phosphoinositide metabolism. J. Pharmacol. Exp.Ther 1991; 258: 429-437.
- 21.** Weinberg JM, Davis JA, Shayman JA, Knight PR. Alterations of cytosolic calcium in LL- PK₁ cells induced by vazopressin and exogenous purines. Am. J. Physiol 1989; 256: 967- 976.
- 22.** Arend LJ, Burnatowska-Hledin MA, Spielman WS. Adenosine receptor-mediated calcium mobilisation in cortical collecting tubule cells. Am. J. Physiol 1988; 255:581- 588.
- 23.** Trends in Pharmacological Sciens 1995. 193 (16): 284.
- 24.** Hernandez J, Ribeiro JA. Excitatory actions of adenosine on ventricular automaticity. Tips 1996; 17: 141- 144.
- 25.** Di Marco JP, Sellers ID, Berne RM. Adenosine: electrophysiologic effects and therapeutic use for terminating supraventricular tachycardia. Circulation 1983; 68: 1254- 1263.

26. Belardinelli L, Isenberg G. Isolated atrial myocytes: adenosine and acetylcholine increase potassium conductance. *Am. J. Physiol* 1983; 244: 734-737.
27. Sollevi A, Lagerkranser M, Irestedt L. Controlled hypotension with adenosine in cerebral aneurysm surgery. *Anesthesiology* 1984; 61: 400-405.
28. Dunviddie TV. The physiological role of adenosine in the central nervous system. *Int. Rev. Neurobiol* 1985; 27: 63.
29. Ebersolt C, Premont J, Prochiantz A, Perez M, Bockaert J. Inhibition of brain adenylate cyclase by A₁ adenosine receptor. Pharmacological characteristics and locations. *Brain Res* 1983; 267: 123-129.
30. Calker V, Muller D, Hamprecht B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem* 1979; 33: 999-1005.
31. Prof.Dr. Kayaalp O. Santral sinir sistemini etkileyen ilaçlar ve anesteziyolojide kullanılan ilaçlar. In: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* Cilt 2, 7. Baskı, ANKARA ; 1995. 1617- 2074.
32. Peakman MC, Hill SJ. Adenosine A₁ receptor- mediated changes in basal and histamine stimulated levels of intracellular calcium in primary rat astrocytes. *Br. J. Pharmacol* 1995; 115: 801-810.
33. Bender AS. Diazepam and Flurazepam inhibit adenosine- uptake by rat brain synaptosomes. *Br. J. Pharmacol* 1980; 32: 293.
34. Czuczwar SJ, Szczepanik B, Wamil A. Differential effects of agents enhancing purinergic transmission upon the antielectroshock, efficacy of carbamazepine, diphenylhydantoin, diazepam, phenopbarbital and valproate in mice. *J. Neurol. Trans* 1990; 81: 153-166.
35. Prof.Dr. Kayaalp O. Solunum sistemi ile ilgili bazı ilaçlar. In: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* Cilt 2, 7. Baskı, ANKARA; 1995. 1551- 1614.
36. Dixon AK, Gubitzi AK, Dalip JS, Richardson PJ, Freeman TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNA' s in the rat. *Br. J. Pharmacol* 1996; 118: 1461- 1468.
37. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev* 1994; 46: 143- 156.

38. David R, Linden J. Comparison of A₄ and A_{2a} binding sites in striatum and COS cells transfected with adenosine A_{2a} receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1995; 272: 511- 518.
39. Reppert SM, Weaver DR, Stehle JH, Rivkees SA. Molecular cloning and characterisation of a rat A₁ adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Mol. Endocrinology* 1991; 5: 1037- 1048.
40. Jarvis MF, Williams M. Direct autoradiographic localisation of adenosine A₂ receptors in rat brain using the A₂ selective agonist [³H]-CGS 21680. *Eur. J. Pharmacol* 1989; 168: 243- 246.
41. Kirk IP, Richardson PJ. Further characterisation of [³H]- CGS 21680 binding sites in rat striatum and cortex. *Br. J. Pharmacol* 1995; 114: 537- 543.
42. Bökesoy TA: Türk Farmakoloji Derneği Eğitim Sempozyumları Programı.Endotel kaynaklı vazoaktif maddeler. Türk Farmakoloji Derneği Yayınları, ANKARA; 1997. 1- 46.
43. Prof.Dr. Kayaalp O. Kalp- damar sistemi ilaçları. In: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji Cilt 2, 7. Baskı, ANKARA; 1995. 1115- 1550.
44. Charles J, Lowenstein MD, Dinerman MD, Solomon H, Synder MD. Nitric Oxide: A Physiologic Messenger. *Ann. Inter Med* 1994; 120: 227- 237.
45. İzmir Tabip Odası Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu. Endotel, İZMİR; 1994. 1-120.
46. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Scie, U.S.A*; 1990; 87: 682- 685.
47. Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP- dependent protein kinase, protein kinase C and calcium/ calmodulin protein kinase identiification of flavin and calmodulin binding sites. *J. Biol. Chem* 1992; 267: 10976- 10981.
48. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373- 376.
49. Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium derived nitric oxide in the abnormal endothelium dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 1993; 87: 1468- 1474.
50. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets. *Br. J. Pharmacol* 1990; 101: 325- 328.

51. Petros A, Bennett D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991; 338: 1557- 1558.
52. Nowicki JP, Duval D, Poignet H, Scatton B. Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur.J. Pharmacol* 1991; 204: 339- 340.
53. Roberts JD, Polaner DM, Lang P, Zapol WM. Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the new born. *Lancet* 1992; 304: 818- 819.
54. 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.
55. Marmo E, Filippelli A, Iarussi D, Matera C, Lampa E, Acampara R, Soreca S, Tortora S. Experimental documentation of presence of purinergic receptors at human atria. *Int. J. Tiss. Reac* 1986; 5: 411- 419.
56. Clarke C and et al: The preparation and use of adenosine injection. *Pharm. J* 1990; 244: 595- 597.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ