

Hidrojen peroksidin dana koroner arterini gevşetici etkisinde L-tipi voltaja bağlı kalsiyum kanallarının rolünün araştırılması

Hasan Basri Ulusoy, Hülya Gültekin, Nuran Küçük

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Kayseri

Amaç: Bu in vitro çalışmada, hidrojen peroksidin L-tipi voltaja bağımlı kalsiyum kanallarını etkileyip etkilemediğinin araştırılması amaçlandı. **Yöntem:** Dana sol koroner arterinin inen ön dalından elde edilen halkalar rastlantısal şekilde bir kontrol ve iki deneme grubuna ayrıldı. Tüm halkalar 37 °C derecede Krebs-Henseleit solüsyonu içeren ve % 95 O₂ - % 5 CO₂ karışımı ile sürekli olarak gazlandırılan 10 ml hacminde organ banyosu içine alındı. 1,5 g gerim altında 90 dakika dinlenme periyodunu takiben halkalara ilaç ve maddeler uygulandı. **Bulgular:** Tüm gruplarda, kümülatif tarzda uygulanan hidrojen peroksit (10⁻⁷ – 10⁻² M), serotonin (10⁻⁶ M) ile ön kasılma oluşturulan halkalarda doza bağlı gevşemeler oluşturdu. Deneme gruplarındaki gevşeme cevaplarının, L-tipi voltaja bağlı kalsiyum kanal blokleri nifedipin (10⁻⁶ M) ve L-tipi voltaja bağlı kalsiyum kanal açıcı BAY K-8644 (10⁻⁷ M) ile değiştirilmediği gözlemlendi (P>0.05). **Sonuç:** Bu veriler ile hidrojen peroksidin L-tipi voltaja bağımlı kalsiyum kanalları üzerine etkisinin olmadığı söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Hidrojen peroksit, L-tipi voltaja bağlı kalsiyum kanalları, dana koroner arteri

Evaluation of the role of L-type voltage dependent calcium channels on relaxing effect of hydrogen peroxide in bovine coronary artery

Objective: In this study, it was aimed to investigate whether hydrogen peroxide effect L-type voltage-gated calcium channels. **Methods:** The rings obtained from bovine left anterior descending coronary artery randomly assigned into one control (n=6) and two experimental groups (n=6). All of the rings were placed into 10 ml organ baths containing Krebs-Henseleit solution at 37 °C continuously bubbled with 95% O₂ - 5% CO₂ gas mixtures. Following 90 minutes resting period under 1,5 g tension, drugs and chemicals were applied to the rings. **Results:** In all groups, hydrogen peroxide, in a cumulative manner (10⁻⁷ – 10⁻² M), induced dose-dependent relaxations in the rings precontracted with serotonin (10⁻⁶ M). It was observed that the relaxation responses in experimental groups were not changed by L-type calcium channel blocker, nifedipine or L-type voltage dependent calcium channel opener, BAY K-8644 (10⁻⁷ M). **Conclusion:** According to these data it may suggest that hydrogen peroxide has no effect on L-type voltage dependent calcium channels.

Key words: Hydrogen peroxide, L-type voltage dependent calcium channels, bovine coronary artery

Genel Tıp Derg 2008;18(2): 61-64

Bir Reaktif Oksijen Türü (ROT) olan hidrojen peroksit diğer ROT'lar gibi hücrelerin normal metabolizma ürünü olarak vücutta sürekli şekilde oluşmakta ve belirli bir düzeyde kaldığı sürece organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyon ajanlarına karşı savunmasında rol oynamaktadır (1).

Ancak hidrojen peroksit aşırı miktarda oluştuğunda ve organizma tarafından temizlenemediğinde lipid peroksidasyonu, membran permeabilitesinde artma, proteolitik enzimlerin aktivasyonu ve gen yapısında bozulma gibi etkiler oluşturabilmektedir (2). Bu etkileri nedeniyle hipertansiyon, kalp yetmezliği, ateroskleroz gibi çeşitli kalp damar hastalıklarının etyopatogenezinde rol oynadığı iddia edilmektedir (3,4). Ayrıca çeşitli hücre içi olayları indükleyerek ve metabolik bir sinyal olarak damar tonusunun düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (5,6). Hidrojen

Yazışma adresi: Dr.Hasan Basri Ulusoy, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Kayseri

e-posta: ulusoyhb@yahoo.com

peroksit türe ve dokuya göre değişmek üzere çeşitli vasküler düz kaslarda kasılma ya da gevşemeye yol açmaktadır. İn vitro, insan umbilikal arteri (7) ve tavşan pulmoner arterinde (8) kasılmaya, dana pulmoner arteri (9) ve kedi serebral arterinde (10) ise gevşemeye neden olduğu bildirilmiştir.

Literatürde hidrojen peroksidin kalsiyum kanallarıyla olan etkileşiminin çalışıldığı araştırma sayısı sınırlıdır ve bulgular çelişkilidir. Bu çalışmada hidrojen peroksidin dana koroner arterinde L-tipi voltaja bağlı kalsiyum kanalları üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem

Çalışmada kullanılan dana koroner arterleri bölgesel bir mezbahadan elde edildi. Dana kesiminden hemen sonra alınan kalpler soğuk Krebs-Henseleit solüsyonu (NaCl 119 mM; KCl 4.7 mM; MgSO₄ 1.5 mM; KH₂PO₄ 1.2 mM; CaCl₂ 2.5 mM; NaHCO₃ 25 mM; glukoz 11mM.) içerisinde laboratuara getirildi. Sol koroner arterin ön inen dalı izole edildi ve çevre dokulardan temizlendi. Bu dalın distal kısmından yaklaşık 3-4 mm genişliğinde ve 3 mm uzunluğunda 3 adet halka elde edildi. Halkalar 37 °C'de, Krebs-Henseleit solüsyonu içeren ve % 95 O₂ - % 5 CO₂ karışımı ile sürekli olarak gazlandırılan 10 ml hacminde organ banyosu içine alındı. Dokular 1,5 g istirahat gerilimi altında 90 dakika süreyle dinlendirildi ve bu süre boyunca 15 dakikada bir besleyici solüsyon ile yıkandı.

Dinlenme periyodunu takiben;

1. halkada, submaksimal konsantrasyonda serotonin (10⁻⁶ M) ile ön kasılma oluşturuldu ve bu kasılma kararlı düzeye ulaştıktan sonra kümülatif tarzda hidrojen peroksit (10⁻⁷ - 10⁻² M) uygulandı.

2. ve 3. halka, serotonin (10⁻⁶ M) ile ön kasılma sonrası kararlı durum oluştuktan sonra sırasıyla L-tipi voltaja bağlı kalsiyum kanal blokleri nifedipin (10⁻⁶ M) ve L-tipi voltaja bağlı kalsiyum kanal açıcı olan BAY K 8644 (10⁻⁷ M) ile 30 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra dokulara kümülatif tarzda hidrojen peroksit (10⁻⁷ - 10⁻² M) uygulandı.

Uygulanan işlemlere dokuların verdiği cevaplar bir MAY FDT 10-A gerim transdüseri aracılığıyla Harvard Osillografa (Harvard Apparatus Limited, Edenbridge, Kent) yazdırıldı.

İlaçlar: Hidrojen Peroksit Merck (Darmstadt Almanya), diğer ilaçlar ve kimyasal maddeler Sigma (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edildi.

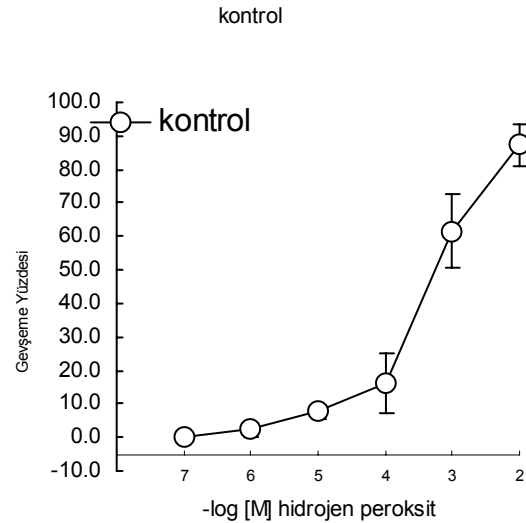
İstatistiksel Yöntemler: Hidrojen peroksit ile elde edilen gevşeme cevapları 10⁻⁶ M serotonin ile alınan maksimum kasılma cevabının %'si şeklinde değerlendirildi. Her bir grupta hidrojen peroksit için PD₂ (% 50 oranında gevşeme oluşturan konsantrasyonun negatif logaritması) ve Emax (% maksimum gevşeme) değerleri hesaplandı.

Bulgular ortalama ± % 95 güven aralığı şeklinde belirtildi ve ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel analizi için Student'in *t* testi kullanıldı.

Bulgular

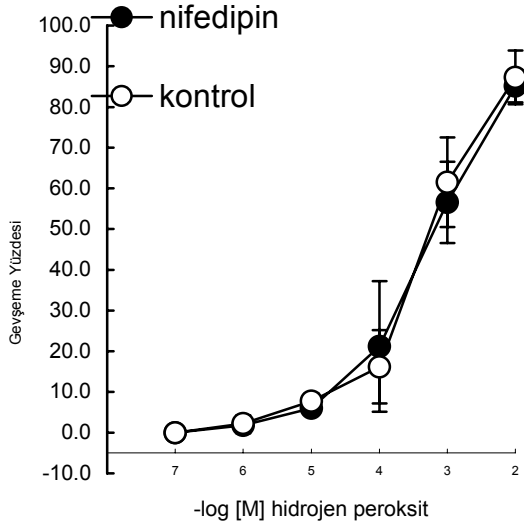
Serotonin (10⁻⁶ M) ile ön kasılma ve takiben kararlı durum elde edildikten sonra organ banyosuna kümülatif tarzda uygulanan hidrojen peroksit (10⁻⁷ - 10⁻² M) dana koroner arter halkalarında doza bağımlı bir şekilde gevşeme cevabı oluşturdu (Şekil 1, kontrol grubu) (Emax: 86.3±6.6 ; PD₂: 3.32±0.22).

Nifedipin (Şekil 2) ve BAY K 8644 (Şekil 3) ile inkübe edilen dokularda da, kümülatif tarzda uygulanan hidrojen peroksit (10⁻⁷ - 10⁻² M) kontrol

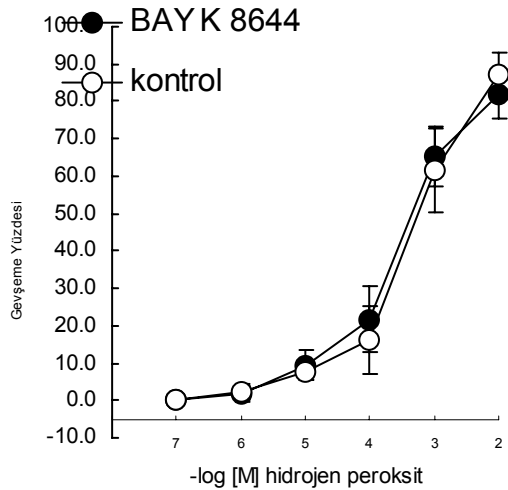


Şekil 1: Dana koroner arterinde hidrojen peroksit ile elde edilen gevşeme cevapları. Sonuçlar ortalama ± % 95 GA şeklinde gösterilmiştir (n=6).

grubuna benzer şekilde doza bağımlı gevşeme cevapları oluşturdu (Emax: sırasıyla 84.2±4, 80.2±5; PD₂: sırasıyla 3.19±0.42, 3.35±0.16). Bu ilaçlar ile inkübe edilen halkaların gevşeme cevapları ile kontrol grubu halkaların gevşeme cevapları arasında anlamlı bir fark bulunamadı (p>0.05).



Şekil 2: Dana koroner arterinde nifedipin (10^{-6} M) varlığında hidrojen peroksit ile elde edilen gevşeme cevapları. Sonuçlar ortalama \pm % 95 GA şeklinde gösterilmiştir (n=6).



Şekil 3: Dana koroner arterinde BAY K 8644 (10^{-7} M) varlığında hidrojen peroksit ile elde edilen gevşeme cevapları. Sonuçlar ortalama \pm % 95 GA şeklinde gösterilmiştir (n=6).

Tartışma

Hidrojen peroksit türe ve dokuya göre değişmek üzere çeşitli vasküler düz kaslarda membranal iyon kanallarını etkileyerek gevşeme ya da kasılma cevapları oluşturabilmektedir. Kedi serebral arteri (10) ve dana koroner arterinde (11) ATP'ye duyarlı, domuz koroner arterinde (12) kalsiyuma duyarlı, köpek koroner arteri (13) ve fare serebral arterinde (14) ise voltaja duyarlı potasyum kanallarını aktive ederek gevşeme cevabı oluşturmaktadır. Ayrıca sıçan pulmoner arterinde voltaja duyarlı potasyum kanallarını inhibe ederek (15), köpek serebral arterinde (16) ve sıçan mezenter arterinde (17) ise voltaja bağlı L-tipi kalsiyum kanallarını açarak kasılma oluşturduğu bildirilmiştir. Literatürde hidrojen peroksidin kalsiyum kanalları üzerine etkisinin araştırıldığı az sayıda araştırma mevcuttur. Dana koroner arterinde kalsiyum kanalları üzerine etkisi ise çalışılmamıştır.

Bu çalışmada hidrojen peroksit gevşemesi ile L-tipi voltaja bağlı kalsiyum kanallarının ilişkisi araştırıldı. Hidrojen peroksit gevşemeleri, ne nifedipin ne de BAY K 8644 tarafından anlamlı şekilde etkilenmedi. Literatürde hidrojen peroksidin kalsiyum kanalları üzerine olan etkisinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışmada veriler çelişkilidir. Hidrojen peroksidin köpek serebral arterinde ve sıçan mezenter arterinde hücre içine kalsiyum girişini artırarak kasılmaya yol açtığı bildirilmiştir (16,17). Sıçan arter düz kas hücre kültüründe yapılan bir çalışmada (18) benzer şekilde hidrojen peroksidin hücre içine kalsiyum girişini artırdığı gösterilmiştir. Tersine Fujimoto ve arkadaşlarının (19) tavşan küçük mezenter arterinde yaptığı çalışmada ise, hidrojen peroksit gevşemelerinin kalsiyum kanalları ile ilişkili olmadığı rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda elde edilen bulgular diğerleri ile ters, Fujimoto ve arkadaşlarının (19) bulguları ile uyumludur. Fujimoto ve grubunun çalışması (19) ile bizim bulgularımızın diğer iki çalışmanın verilerine zıt olmasının nedeni tür, doku ve deneysel prosedür farklılığından kaynaklanabilir, nitekim bu sayılan araştırmalar farklı tür ve farklı arterlerde, farklı deneysel prosedürlerle yapılmıştır. İlave olarak hidrojen peroksit farklı türdeki aynı arterde de farklı sonuçlar oluşturabilmektedir, örneğin köpek serebral arterinde (16) kasılma oluştururken kedi ve fare serebral arterinde gevşemeye (10,14) neden olmuştur.

Sonuç

Hidrojen peroksidin dana koroner arterinde oluşturduğu gevşeme cevapları L-tipi voltaja bağlı kalsiyum kanalları ile ilişkili değildir ve literatürde çelişkili olan bu konunun aydınlatılabilmesi için daha ileri deneylere gereksinim vardır.

Kaynaklar

1. Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am Heart J* 1982;107:397-417.
2. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Onbirinci baskı. Ankara: Hacettepe-Taş; 2005.
3. Prasad K, Kalra J. Experimental atherosclerosis and oxygen free radicals. *Angiology* 1989;40:835-43.
4. Flora SJ. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol* 2007;53:1-2.
5. Toren F. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:248-53.
6. Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 2007;26:1-14.
7. Okatani Y, Watanabe K, Sagara Y. Effect of nitric oxide, prostacyclin, and thromboxane on the vasospastic action of hydrogen peroxide on human umbilical artery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997;76:515-20.
8. Sheehan DW, Giese EC, Gugino SF, Russel JA. Characterization and mechanisms of H₂O₂-induced contractions of pulmonary arteries. *Am J Physiol* 1993;264:1542-47.
9. Iesaki T, Gupte SA, Kaminski PM, Wolin MS. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H₂O₂. *Am J Physiol* 1999;277: 978-85.
10. Wei EP, Kontos HA, Beckman JS. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol* 1996;271:1262-6.
11. Ulusoy HB, Şahin AS, Doğan N. Hidrojen peroksid'in dana koroner arter düz kasında gevşetici etki mekanizmaları. *SÜ Tıp Fak Derg* 2003;19:71-8.
12. Barlow RS, White RE. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *Am J Physiol* 1998;275:1283-89.
13. Rogers PA, Dick GM, Knudson JD, Focardi M, Bratz IN, Swafford AN et al. H₂O₂-induced redox-sensitive coronary vasodilation is mediated by 4-aminopyridine-sensitive K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:2473-82.
14. Drouin A, Thorin-Trescases N, Hamel E, Falck JR, Thorin E. Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H₂O₂ production in mouse cerebral arteries. *Cardiovasc Res* 2007;73:8-9.
15. Cogolludo A, Frazziano G, Cobeño L, Moreno L, Lodi F, Villamor E et al. Role of reactive oxygen species in Kv channel inhibition and vasoconstriction induced by TP receptor activation in rat pulmonary arteries. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1091:41-51.
16. Yang ZW, Zheng T, Wang J, Zhang A, Altura BT, Altura BM. Hydrogen peroxide induces contraction and raises [Ca²⁺]_i in canine cerebral arterial smooth muscle: participation of cellular signaling pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999;360:646-53.
17. Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44:200-8.
18. Krippeit-Drews P, Haberland C, Fingerle J, Drews G, Lang F. Effects H₂O₂ on membrane potential and [Ca²⁺]_i of cultured rat arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;209:139-45.
19. Fujimoto S, Asano T, Sakai M, Sakurai K, Takagi D, Yoshimoto N, et al. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced relaxation in rabbit mesenteric small artery. *Eur J Pharmacol* 2001;412:291-300