

# Elektriksel Olarak Uyarılan Sıçan İleum Kasılma Yanıtları Üzerine Histamin H<sub>3</sub> Reseptörleri ve Nitrik Oksitin Rolü

Aşkın HEKİMOĞLU<sup>1</sup>, Ramazan ÇİÇEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

## Özet

Çalışmanın amacı, histamin reseptörlerinin ileum düz kas kasılmaları üzerine olan etkilerini ve bu etkiler üzerinde nitrik oksitin olası rolünü gözlemlemektir. İzole edilen sıçan ileum preparatları organ banyosuna asılarak ortama histamin agonist ve antagonistleri ilave edildi ve doku örneklerinin elektriksel alan stimülasyonuna verdikleri kasılma yanıtları incelendi. NO donörü Derivative 28'in kobaylarda H<sub>3</sub> antagonistik etkisinin bulunması nedeniyle H<sub>3</sub> reseptörleri ile NO arasında herhangi bir etkileşimin bulunup bulunmadığı incelendi. Histamin H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> reseptörlerinden biri bloke edildikten sonra elektriksel stimülasyona verilen kasılma yanıtlarının ne yönde değişeceğini gözlemlemek amacıyla diğer reseptörlerin biri veya her ikisi bloke edilerek kasılma yanıtlarındaki farklılıklar izlendi. Histamin reseptörlerini bloke etmek amacıyla H<sub>1</sub> reseptör blokleri olarak pirilamin (10<sup>-6</sup> M), H<sub>2</sub> reseptör blokleri olarak famotidin (10<sup>-6</sup> M) ve H<sub>3</sub> reseptör blokleri olarak tiyoperamid (10<sup>-5</sup> M) ve bunların çeşitli kombinasyonları kullanıldı. Tüm gruplarda H<sub>3</sub> reseptör agonisti (R)-α-metilhistaminin 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> ve 10<sup>-5</sup> molar derişimlerinin etkileri kümülatif olarak incelendi. Nitrik oksit ile olası bir etkileşimin gözlenmesi amacıyla farklı serilerde ortamda nitrik oksit prekürsörü L-arjinin (10<sup>-4</sup> M) ve nitrik oksit sentaz inhibitörü L-nitro-arjinin-metil ester (10<sup>-4</sup> M) bulunduğu halde aynı prosedür tekrarlandı. Histamin H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> ve H<sub>3</sub> reseptörlerinin sırasıyla pirilamin (10<sup>-6</sup> M) ve famotidin (10<sup>-6</sup> M) tarafından ayrı ayrı bloke edilmesi sonucu elektriksel alan stimülasyonuna verilen kasılma yanıtları düşerken H<sub>3</sub> reseptör antagonisti tiyoperamid (10<sup>-5</sup> M), kasılma yanıtlarını artırdı. Selektif H<sub>3</sub> agonisti (R)-α-metilhistaminin kontraktıl yanıtlarda belirgin bir azalmaya neden olması ve bu etkilerin selektif H<sub>3</sub> reseptör antagonisti tiyoperamid tarafından artırılmış olması nedeniyle histamin H<sub>3</sub> reseptörünün muhtemelen H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> reseptörlerine zıt yönde etki ettiği ve kontraktıl yanıtların inhibisyonuna aracılık ettiği gözlenmiştir. Ortama farklı serilerde nitrik oksit prekürsörü L-arjinin (10<sup>-4</sup> M) ve nitrik oksit sentaz inhibitörü NG-nitro-L-arjinin metil ester (10<sup>-4</sup> M) ilave edilmesi sonucunda anlamlı bir farklılık ile karşılaşılmadı. Nitrik oksitin sıçan ileum preparatlarında histamin reseptörlerinin kontraktıl aktivitesi üzerine herhangi bir etki etmediği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Histamin H<sub>3</sub> Reseptör, Nitrik Oksit, (R)-α-Metilhistamin, Kasılma, Elektriksel Alan Stimülasyonu

Cerrahpaşa Tıp Derg 2006; 37: 81 - 87

## The Effects of Histamine H<sub>3</sub> Receptors and Nitric Oxide on Electrically Stimulated Rat Ileum Contractile Responses

### Abstract

The aim of the study is to determine the effects of histamine receptors on the ileum smooth muscle contractions and the role of nitric oxide on these effects. Isolated rat ileum preparations were mounted on organ bath and histamine receptor agonist and antagonists were added to the bath solution, then the electrical field stimulation-induced contractile responses were evaluated. Since NO donor Derivative 28 has H<sub>3</sub> antagonistic effect we investigated any interaction between H<sub>3</sub> receptors and NO. After blocking one of the histamine receptors H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> and H<sub>3</sub>; contractile responses were observed. Then, other two receptors were blocked one by one or combination of them, to observe the changes on the contractile responses given to the electrical stimulation. To block histamine receptors; pirilamine (10<sup>-6</sup> M) as H<sub>1</sub> receptor blocker, famotidine (10<sup>-6</sup> M) as H<sub>2</sub> receptor blocker and thioperamide (10<sup>-5</sup> M) as H<sub>3</sub> receptor blocker and various combination of them were used. All groups were treated with H<sub>3</sub> receptor antagonist thioperamide (10<sup>-5</sup> M) and agonist (R)-α-methylhistamine on 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> ve 10<sup>-5</sup> molar concentrations cumulatively, to observe its mediator effects on contractile responses. To view any possible interaction between histamine H<sub>3</sub> receptors and nitric oxide, in the presence of nitric oxide precursore L-arginine (10<sup>-4</sup> M) and nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester or combination of them the same procedures were carried out. While H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptor blockers decreased the contractile responses given to the electrical field stimulation, H<sub>3</sub> receptor blocker increased the responses. Possibly, H<sub>3</sub> receptors act contrary to H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors and mediates inhibition on rat ileum smooth muscle contractility. Selective H<sub>3</sub> agonist (R)-α-methylhistamine caused a significant inhibition on the contractile responses where these effects were abolished by selective H<sub>3</sub> receptor antagonist thioperamide. In different series nitric oxide precursore L-arginine (10<sup>-4</sup> M) and nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester (10<sup>-4</sup> M) were added to the bath solution but no significant differences observed in the contractile responses. In conclusion it was observed that nitric oxide has no effect on histamine receptor mediated contractile activity in rat ileum.

**KeyWords:** Histamine H<sub>3</sub> Receptor, Nitric Oxide, (R)-α-Methylhistamine, Contractility, Electrical Field Stimulation

Cerrahpaşa J Med 2006; 37: 81 - 87

Histamin farmakolojik etkilerini H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> ve H<sub>4</sub> reseptörleri ile göstermektedir [1,2]. Histamin H<sub>3</sub> reseptörleri ilk olarak 1983'de tanımlanmış ve santral, ve periferik sinir uçlarından nörotransmitter salınımının H<sub>3</sub> reseptörler

tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir [3].

Bu reseptör tiplerinin enterik sinir sisteminin kolinerjik sinir uçlarında asetilkolin (ACh) salınımında düşüşe neden olduğu gösterilmiştir [4,5]. H<sub>3</sub> reseptörleri başlıca santral histaminerjik nöronal yollarda rol oynadığı santral sinir sistemine yerleşmiştir [6]. Beyinde yapılan fonksiyon çalışmalarında inhibitör H<sub>3</sub> reseptörlerinin noradrenerjik [7], serotonerjik [8], dopaminerjik [9], peptiderjik [10] ve non-ad-

**Alındığı Tarih:** 27 Eylül 2006

**Yazışma Adresi (Address):** Dr. Aşkın HEKİMOĞLU

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

Diyarbakır

**E-posta:** askinh@dicle.edu.tr

renerjik non-kolinerjik (NANC) [11] sinir uçlarında da bulunduğu gösterilmiştir. H<sub>3</sub> reseptörlerinin nitrik oksit (NO) donörü olduğunu işaret eden çalışmalar da mevcuttur [12].

H<sub>3</sub> reseptörleri nörotransmisyonu azaltıcı yönde bir fonksiyonla myenterik pleksusun kolinerjik ve non-adrenerjik non-kolinerjik nöronlarında bulunur [13]. Yapılan çalışmalarda düz kaslarda çeşitli kontraktıl ajanları modifiye edememesi nedeniyle H<sub>3</sub> reseptörlerinin nöronal seviyede buldukları iddia edilmişse de, daha sonra yapılan çalışmalar H<sub>3</sub> reseptörlerinin hava yolları epitelyumunda ve düz kaslarda presinaptik olarak bulunabileceği gösterilmiştir [14-16].

Histamin H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> reseptör antagonistleri sıçan ileumunda elektriksel stimülasyonla uyarılan atropine dirençli longitudinal kas kasılmalarını inhibe eder. Bu inhibitör etki H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> reseptörlerinin dışındaki reseptörler aracılığı ile gerçekleştirilir. Histamin benzer koşullarda eksojen bradikinin tarafından oluşturulan kasılmaları inhibe etmediğinden bu inhibitör etkinin direkt olarak değil, enterik nöronlar aracılığı ile gerçekleştiği düşünülmektedir [17].

Histamin H<sub>3</sub> reseptörleri orijinal olarak sıçan serebral korteksinde histamin içeren sinir terminallerinde inhibitör otoreseptörler olarak tanımlanmıştır [3].

Ancak hem santral [8] hem de periferik dokularda [12] H<sub>3</sub> stimülasyon ile çeşitli nörotransmitterlerin salıverilmesinin inhibe edildiği gösterildikten sonra, kobay gastrointestinal sisteminde H<sub>3</sub> ligandlarının bağlanma bölgeleri tesbit edilmiştir [13].

NO non-adrenerjik/non-kolinerjik sistemin önemli bir mediyatörüdür [18]. Post-sinaptik olarak sentez edilip salınan NO pre-sinaptik uçtan girerek guanilat siklazı (GC) aktive eder, siklik guanozin monofosfat (cGMP) artar, bu da transmitter salınımını artırır [19]. NO'ye dayalı kas gevşemesi yapan en iyi NO donörü Derivative 28'in kobaylarda H<sub>3</sub> antagonistik etkisinin bulunması [12] nedeniyle H<sub>3</sub> reseptörleri ile NO arasında herhangi bir etkileşimin bulunup bulunmadığını incelemek amacıyla ortamda nitrik oksit prekürsörü L-arjinin (L-Arg) ve Nitrik oksit sentaz inhibitörü NG-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) bulunduğu halde histamin H<sub>3</sub> reseptör agonisti (R)- $\alpha$ -metilhistaminin (RAMH) elektriksel alan stimülasyonu (EFS) ile uyarılan kasılma yanıtları üzerine olası etkileri incelenmiştir.

Amacımız sıçan ileum düz kasında kasılma yanıtlarına histamin H<sub>3</sub> reseptörlerinin muhtemel etkilerini ve bu etkiler üzerinde nitrik oksidin herhangi bir rolünün bulunup bulunmadığının incelenmesidir.

## YÖNTEM ve GEREÇLER

Çalışmamızda Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezinden (DÜSAM) Dicle Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulunun 1573 numaralı etik kurul raporu ile onaylanarak temin edilen her iki cinsten eşit sayıda olacak şekilde toplam 60 adet erişkin Wistar Albino sıçan (250-300 g) kullanıldı.

Deneylerimizde anestezi madde olarak eter tatbik edildi. Anestezi edilen sıçanlar eksanguinasyon ile sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen sıçanların karın boşlukları longitudinal abdominal insizyon ile açılarak belirlenen ileum, çekum ile birleştiği bölgeden kesilerek bir hemostatik klemp ile tespit edildi ve tek darbe ile süratle çekilerek ileumun mezenterden ayrılması sağlandı. Takriben 40 cm uzunluğunda kesilen barsak parçası içinde 37 °C'a kadar ısıtılmış tirod solüsyonu bulunan bir kaba kondu. İleumun distal ve proksimal bölgeleri işaretlendi. Burada ucunda özel bir aplikatörü bulunan bir enjektör yardımı ile doku zedelenmeden, tirod solüsyonu ile ileum içeriği yıkandı. Dokunun her iki ucundan 10'ar cm kesilerek atıldı ve kalan kısım Magnus Yöntemine [20] göre 2-3 cm'lik tüp şeritler şeklinde kesildi. Her bir strip ayrı bir deneysel protokol için kullanıldı. Doku şeritleri stripleri aynı gün içinde kullanıldı; hemen kullanılamayan stripler tirod solüsyonu içinde +4 °C'da saklandı.

Histamin H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> reseptörleri sırasıyla pirlamin (10<sup>-6</sup> M) ve famotidin (10<sup>-6</sup> M) ile ayrı ayrı ve birlikte bloke edildikten sonra elektriksel stimülasyona verilen kasılma yanıtları gözlemlendi ve yine ayrı ayrı ve her iki reseptör birlikte bloke edildikten sonra H<sub>3</sub> reseptörlerinin kasılma yanıtlarını ne yönde değiştireceğinin gözlenmesi amacıyla ortama H<sub>3</sub> reseptör blokleri olarak tiyoperamid (10<sup>-5</sup> M) uygulandı. Tüm gruplarda H<sub>3</sub> reseptör agonisti (R)- $\alpha$ -metilhistaminin 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> ve 10<sup>-5</sup> molar derişimlerinin etkileri kümülatif olarak incelendi. Nitrik oksit ile olası bir etkileşimin gözlenmesi amacıyla farklı serilerde ortamda nitrik oksit prekürsörü L-arjinin (10<sup>-4</sup> M) ve nitrik oksit sentaz inhibitörü L-nitro-arjinin-metil ester (10<sup>-4</sup> M) bulunduğu halde aynı prosedür tekrarlandı.

Her grupta her iki cinsten sıçan preparatı eşit şekilde kullanılmıştır. Her bir sıçandan hazırlanan preparatların her birine farklı prosedür uygulandı ve gün içinde kullanım sıralarının homojenize edilmesi amacıyla prosedürlerin sıralamaları düzenli bir şekilde değiştirildi.

Deney süresince hayvan hakları ile ilgili olarak Amerika Birleşik Devletleri Sağlık Enstitüleri (NIH) tarafından belirlenen kriterlere özenle uyuldu.

Deneyde kullanılan Tirod Solüsyonunun bileşimi: NaCl 139.2 mmol/l, KCl 2.7 mmol/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 mmol/l, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mmol/l NaHCO<sub>3</sub> 11.9 mmol/l, MgCl<sub>2</sub> 0.49 mmol/l, Glukoz 5.5 mmol/l.

Deney süresince sempatik sistem veya prostaglandin kaynaklı yanıtların sataşmasını önlemek amacıyla tirod solüsyonu bileşimine 10<sup>-5</sup> M propranolol ve 10<sup>-5</sup> M indometasin ilave edildi.

Deneyde kullanılan ajanlarda solvent olarak distile su kullanıldı. Dokular 10 ml tirod solüsyonu içeren organ banyosuna asıldı. İleum şeritlerine 0.75 g gerilim uygulandı [21]. Doku örnekleri iki adet platin tel elektrod arasına yerleştirildi ve elektrodların dokuya direkt olarak temas etmesi sağlandı. Banyo solüsyonu 37 °C ısıda tutuldu ve ortam havası ile sürekli olarak havalandırıldı [22]. İlaç

uygulanmasından önce 15'er dakikada bir yıkanarak dokular 45 dakika dinlendirilerek banyo ortamına adapte olmaları sağlandı. Bir manivela aracılığıyla izotonik kasılmalar isli kağıda kaydedildi. Ortama çeşitli agonist veya antagonist maddeler ilave edilerek doku örneklerinin elektriksel stimülasyona verdikleri yanıtlar incelendi. Elektriksel alan stimülasyonu kare dalga, 75 mA, 1ms, 25 Hz, 15 sn şeklinde uygulandı. Her bir uyarıdan sonra üç dakika dinlendirilen doku şeritlerine her seride üç uyarı uygulandı ve bu uyarılara verilen yanıtların ortalamaları elde edildi.

**Kullanılan İlaçlar:** Heksametonyum (Sigma Co.), Atropin (Sigma Co.), Propranolol (Sigma Co.), Indometasin (Sigma Co.), Pirilamin (Sigma Co.), Ranitidin (Sigma Co.) Famotidin (Mustafa Nevzat İlaç San.), R-(a)-Metilhistamin (Sigma Co.) Tiyoperamid (Sigma Co.), L-Arginin (Sigma Co.), N-omega-Nitro-L-Arginine Metil Ester Hydrochloride (L-NAME) (Sigma Co.).

Tüm ilaçlar için deneyler öncesinde 1 mM'lık stok solüsyonlar hazırlandı. Kullanılmayan stok solüsyonlar derin dondurucuda muhafaza edilirken, bunlardan hazırlanan dilüe solüsyonlar buzdolabında +4 °C'de saklandı. Stok solüsyonlar ve bunlardan hazırlanan konsantrasyonlar tüpleriyle birlikte haftada bir yenilendi. Solvent olarak kullanılan distile su temininde AutostillTM, Jencons Scientific Lim., Cherrycourt Way Industrial Estate cihazı kullanıldı.

#### Gruplar:

1. grup: a) EFS + Heksametonyum ( $3 \times 10^{-4}$  M) + Atropin ( $3 \times 10^{-6}$  M)
2. grup: a) EFS + Pirilamin ( $10^{-6}$  M)
  - b) EFS + Famotidin ( $10^{-6}$  M)
  - c) EFS + Pirilamin ( $10^{-6}$  M) + Famotidin ( $10^{-6}$  M)
3. grup: a) Pirilamin ( $10^{-6}$  M) + Tiyoperamid ( $10^{-5}$  M)
  - b) Famotidin ( $10^{-6}$  M) + Tiyoperamid ( $10^{-5}$  M)
  - c) Pirilamin ( $10^{-6}$  M) + Famotidin ( $10^{-6}$  M) + Tiyoperamid ( $10^{-5}$  M)
4. grup: a) Pirilamin ( $10^{-6}$  M) + RAMH ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) derişimlerinin etkileri kümülatif olarak incelendi.
  - b) Famotidin ( $10^{-6}$  M) + RAMH ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) derişimlerinin etkileri kümülatif olarak incelendi.
  - c) Pirilamin ( $10^{-6}$  M) +Famotidin ( $10^{-6}$  M) + RAMH ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) derişimlerinin etkileri kümülatif olarak incelendi.
5. grup: a) Pirilamin ( $10^{-6}$  M) + Famotidin ( $10^{-6}$  M) + L-Arginin ( $10^{-4}$  M) + RAMH ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) derişimlerinin etkileri kümülatif olarak incelendi.
  - b) Pirilamin ( $10^{-6}$  M) + Famotidin ( $10^{-6}$  M) + L-NAME ( $10^{-4}$  M) + RAMH ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) derişimlerinin etkileri kümülatif olarak incelendi.
  - c) Pirilamin ( $10^{-6}$  M) + Famotidin ( $10^{-6}$  M) + L-Arg ( $10^{-4}$  M) + L-NAME ( $10^{-4}$  M) + RAMH ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) derişimlerinin etkileri kümülatif olarak incelendi.

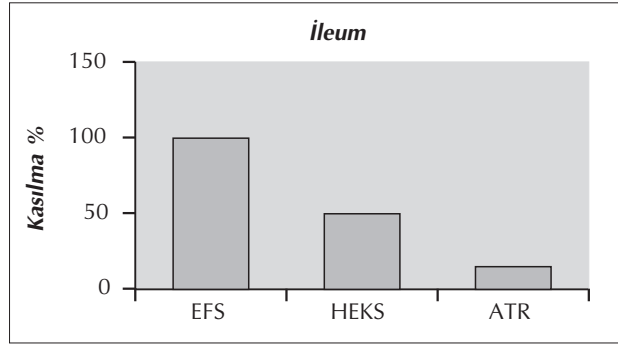
Elektriksel alan stimülasyonu ile elde edilen kasılma yanıtları üzerine RAMH inhibitör etki gücünü göstermek amacıyla  $IC_{50}$  değerleri lineer regresyon kullanılarak saptandı.

Verilerin değerlendirilmesinde eşleştirilmiş Student t-testi veya Kruskal Wallis testi kullanıldı;  $p < 0.05$  ise gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu kabul edildi.

#### BULGULAR

1) Heksametonyum  $3 \times 10^{-4}$  M, referans yanıt olarak kabul ettiğimiz, elektriksel alan stimülasyonuna verdiği yanıtları  $\% 39.7 \pm 9,1$ 'e ( $p < 0.05$ ), aynı dokuda ortama  $3 \times 10^{-6}$  M atropin ilave edilmesi kasılma yanıtlarının sonra  $\% 17.8 \pm 1.7$ 'e kadar düşmesine neden oldu ( $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ) (Tablo 1).

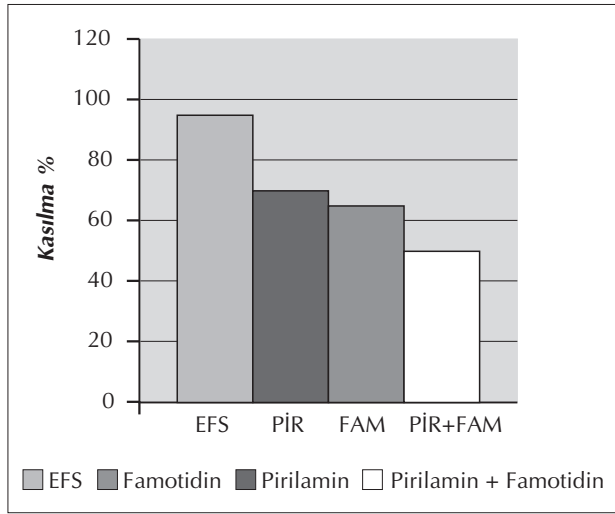
**Tablo 1.** Heksametonyum ( $3 \times 10^{-4}$  M) + Atropin ( $3 \times 10^{-6}$  M) grubu ( $n = 6$ ).



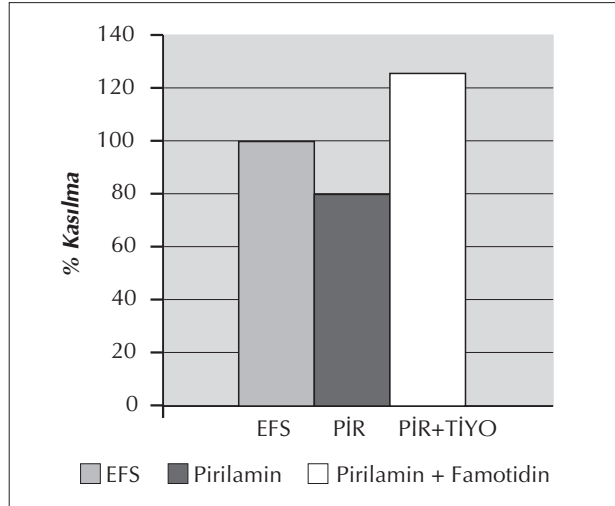
2) Histamin  $H_1$  ve  $H_2$  reseptör blokörleri  $10^{-6}$  M pirilamin ve  $10^{-6}$  M famotidin farklı gruplarda elektriksel alan stimülasyonuna verilen kasılma yanıtlarını belirgin olarak düşürmüş ve her ikisinin kombinasyonu kasılma yanıtlarındaki bu inhibisyonu anlamlı olarak artırmıştır. Elektriksel alan stimülasyonunun  $\% 100$  olarak kabul edildiği durumda histamin  $H_1$  reseptör blokleri  $10^{-6}$  M pirilamin kasılma yanıtlarını  $\% 80.2$ 'ye,  $10^{-6}$  M famotidin  $\% 77.8$ 'e ve kombinasyonları  $\% 63.5$ 'e düşürmüştür. Bu farklar EFS'ye verilen yanıtlara göre anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Pirilamin  $10^{-6}$  M ve famotidin  $10^{-6}$  M grupları arasında bir farklılık gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ). Pirilamin  $10^{-6}$  M + famotidin  $10^{-6}$  M grubu ise bu ajanların ayrı ayrı uygulandıkları gruplara göre inhibisyonu anlamlı olacak şekilde potansiyelize etmiştir ( $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ) (Tablo 2).

3) a) Histamin  $H_1$  reseptör blokleri olan  $10^{-6}$  M pirilaminin elektriksel alan stimülasyonu sonucu oluşan kasılma yanıtlarını  $\% 80.2 \pm 6.1$  düzeyine düşürmüş ( $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ), farklı seride ortama  $10^{-5}$  M tiyoperamid ilave edilmesi ile yanıtlar  $\% 127.3 \pm 3.8$  olarak gerçekleşmiştir ( $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ). Gruplar arasındaki fark anlamlı olarak kaydedildi ( $p < 0.05$ ) (Tablo 3A).

**Tablo 2.** Prilamin  $10^{-6}$  M ve famotidinin  $10^{-6}$  M ayrı ayrı ve birlikte uygulanmaları durumunda elektriksel olarak uyarılan kasılma yanıtları üzerine inhibitör etkileri (n = 6).



**Tablo 3A** Prilamin  $10^{-6}$  M ve Pirlamin  $10^{-6}$  M + tiyoperamid  $10^{-5}$  M grupları (n = 6).

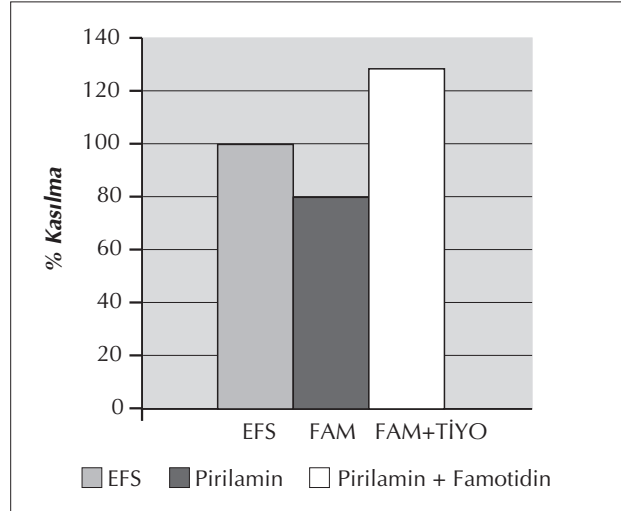


**b)** Uygulanan  $10^{-6}$  M famotidinden sonra kasılma yanıtlarının referans yanıtlar olarak kabul edilen elektriksel alan stimülasyonu yanıtlarının %  $77.8 \pm 5.4$ 'ü olarak gerçekleştiği saptandı ( $p < 0.05$ ) ( $n=6$ ), farklı seride ise benzer ortam üzerine  $10^{-5}$  M tiyoperamid uygulanmasından sonra yanıtlar %  $130 \pm 12.8$  olarak gerçekleşti ( $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ) (Tablo 3B).

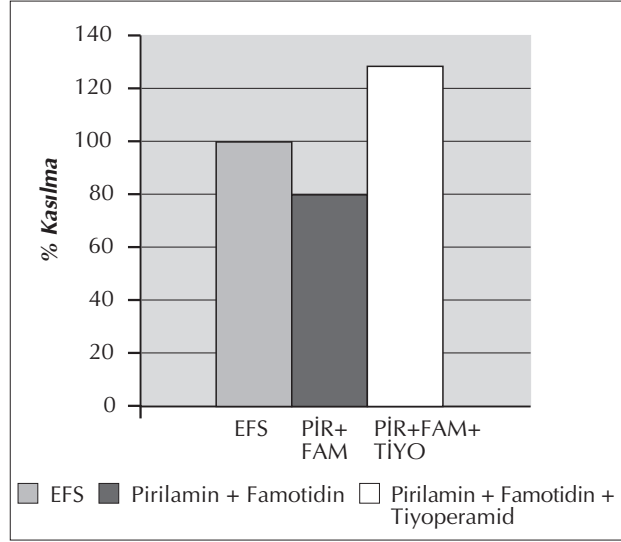
**c)** Elektriksel alan stimülasyonu sonucu oluşan kasılma yanıtları üzerine  $10^{-6}$  M pirlamin +  $10^{-6}$  M famotidin uygulanmasından sonra elektriksel alan stimülasyonu ile referans yanıtın %  $63.5 \pm 3.8$ 'i kadar bir kasılma yanıtı elde edildi ( $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ), farklı seride benzer ortama  $10^{-5}$  M tiyoperamid ilavesi ile kasılma yanıtları %  $135.0 \pm 9.5$  olarak elde edildi ( $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ). Gruplar arasında belirgin farklılık kaydedildi ( $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ) (Tablo 3C).

**4. a)**  $10^{-6}$  M pirlamin uygulandığında oluşan kasılma yanıtları

**Tablo 3B** Famotidin  $10^{-6}$  M ve Famotidin  $10^{-6}$  M + tiyoperamid  $10^{-5}$  M grubu (n = 6).



**Tablo 3C** Pirlamin  $10^{-6}$  M, Famotidin  $10^{-6}$  M ve Pirlamin  $10^{-6}$  M + Famotidin  $10^{-6}$  M + Tiyoperamid  $10^{-5}$  M grubu (n = 6).



ları RAMH'in artan konsantrasyonlarında kademeli olarak inhibisyona uğramıştır. RAMH'in ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) artan derişimlerinin kümülatif olarak ilave edilmesi ile  $10^{-8}$  derişiminde elde edilen kasılma yanıtları %  $71.0 \pm 5.0$ ,  $10^{-7}$  derişimde %  $59.0 \pm 6.3$ ,  $10^{-6}$  derişimde %  $51.2 \pm 4.7$  ve  $10^{-5}$  derişimde ise %  $48.2 \pm 4.2$ 'e düşmüştür ( $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ) (Tablo 4).

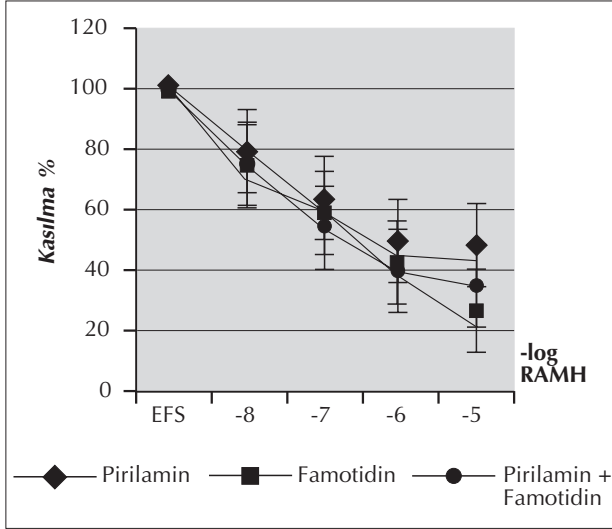
İleum preparatlarında  $10^{-6}$  M famotidinin varlığında oluşan kasılma yanıtları RAMH farklı konsantrasyonlarda kümülatif olarak incelendiğinde yanıtlarda kademeli olarak bir düşüş saptanmıştır. RAMH'in  $10^{-8}$  derişiminde elde edilen kasılma yanıtları %  $74.5 \pm 6.9$ ,  $10^{-7}$  derişimde %  $55.5 \pm 7.8$ ,  $10^{-6}$  derişimde %  $39.7 \pm 3.9$ ,  $10^{-5}$  derişimde ise %  $25.2 \pm 2.7$  olarak değişmiştir ( $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ) (Tablo 4).

**c)** İleum preparatlarında  $10^{-6}$  M pirlamin +  $10^{-6}$  M famotidin kombinasyonunda oluşan referans yanıt RAMH

farklı derişimlerinde tarafından kademeli bir şekilde inhibisyona uğradı. RAMH'in  $10^{-8}$  derişiminde elde edilen kasılma yanıtları  $\% 71.3 \pm 2.8$ ,  $10^{-7}$  derişimde  $\% 48.7 \pm 3.1$ ,  $10^{-6}$  derişimde  $\% 42.0 \pm 4.8$ ,  $10^{-5}$  derişimde ise  $\% 34.7 \pm 3.5$  olarak değişmiştir ( $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ) (Tablo 4).

**5. a)** Ortamda  $10^{-6}$  M pirilamin +  $10^{-6}$  M famotidin varlığında elde edilen kontraktıl yanıtlar ortama  $10^{-4}$  M L-Arginin

**Tablo 4A** Pirilamin  $10^{-6}$  M, ve RAMH ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) grubu ( $n = 6$ ), Famotidin  $10^{-6}$  M ve RAMH ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) grubu ( $n = 6$ ), Pirilamin  $10^{-6}$  M + Famotidin  $10^{-6}$  M ve RAMH ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) grubu ( $n = 6$ ).



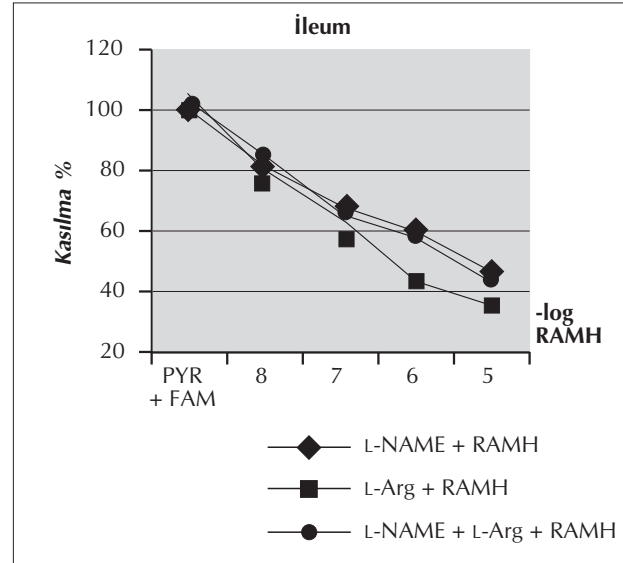
ilavesinden sonra RAMH kümülatif olarak artan derişimleri ile aşamalı olarak inhibisyona uğramıştır. RAMH'in  $10^{-8}$  derişiminde elde edilen kasılma yanıtları  $\% 72.0 \pm 1.7$ ,  $10^{-7}$  derişimde  $\% 53.8 \pm 4.2$ ,  $10^{-6}$  derişimde  $\% 43.0 \pm 3.7$ ,  $10^{-5}$  derişimde ise  $\% 35.0 \pm 3.8$  olarak değişmiştir ( $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ) (Tablo 5).

**b)** Ortamda  $10^{-6}$  M pirilamin +  $10^{-6}$  M famotidin +  $10^{-4}$  M L-NAME bulunduğunda elde edilen kasılma yanıtlarının RAMH kümülatif olarak artan derişimleri ile kademeli bir inhibisyona uğradığı saptanmıştır. RAMH'in  $10^{-8}$  derişiminde elde edilen kasılma yanıtı  $\% 83.7 \pm 1.6$ ,  $10^{-7}$  derişimde  $\% 65.8 \pm 2.5$ ,  $10^{-6}$  derişimde  $\% 57.3 \pm 3.3$ ,  $10^{-5}$  derişimde ise  $\% 49.0 \pm 4.0$  olarak değişmiştir ( $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ) (Tablo 5).

**c)** Ortama  $10^{-6}$  M pirilamin +  $10^{-6}$  M famotidin +  $10^{-4}$  M L-Arginin +  $10^{-4}$  M L-NAME ilave edildikten sonra kasılma yanıtları RAMH'in artan derişimlerinde kademeli bir inhibisyona uğramıştır. RAMH'in  $10^{-8}$  derişiminde elde edilen kasılma yanıtı  $\% 79.3 \pm 3.7$ ,  $10^{-7}$  derişimde  $\% 70.3 \pm 4.6$ ,  $10^{-6}$  derişimde  $\% 61.3 \pm 3.0$ ,  $10^{-5}$  derişimde ise  $\% 52.8 \pm 3.5$  olarak kaydedilmiştir ( $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ) (Tablo 5).

Sıçan ileum preparatlarında EFS ile indüklenen kasılma yanıtlarını azaltan RAMH  $IC_{50}$  değerleri açısından gruplar arasında fark saptanmadı. ( $p > 0.05$ ) (Tablo 6).

**Tablo 5A** Pirilamin  $10^{-6}$  M, + Famotidin  $10^{-6}$  M + L-Arg  $10^{-4}$  M + RAMH ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) grubu ( $n = 6$ ), Pirilamin  $10^{-6}$  M ve Famotidin  $10^{-6}$  M + L-NAME  $10^{-4}$  M RAMH ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) grubu ( $n = 6$ ), Pirilamin  $10^{-6}$  M + Famotidin  $10^{-6}$  M + L-Arg  $10^{-4}$  M + L-NAME  $10^{-4}$  M + RAMH ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) grubu ( $n = 6$ ).



**Tablo 6. I.** RAMH grupları  $IC_{50}$  değerleri

GRUPLAR	RAMH $IC_{50}$
PİR + FAM + RAMH	-5.571
PİR + FAM + L-Arg + RAMH	-5.259
PİR + FAM + L-NAME + RAMH	-5.421
PİR + FAM + L-Arg + L-NAME + RAMH	-5.696

## TARTIŞMA

Çalışmada histamin reseptörlerinin sıçan ileum düz kasında elektriksel olarak uyarılmış kasılma yanıtları üzerine olan etkileri ve nitrik oksit ile etkileşiminin incelenmesi amaçlanmıştır.

İlk olarak kasılma yanıtlarının doğasının tanımlanabilmesi amacıyla bir gangliyon blokörü olan heksametyonyum ile gangliyon blokajı ve parasempatik sinir stimülasyonunun yaptığı etkiyi antagonize eden antimuskarinik etkili atropin kullanılmıştır. Heksametyonyum elektriksel uyarı sonucu oluşan kasılma yanıtlarında azalmaya neden olmuştur, ortama ilave edilen atropin kasılma yanıtlarında daha fazla bir düşüş oluşturmuştur. Bu bulgu yanıtların muhtemelen ağırlıklı olarak muskarinik nitelikte olduğunu göstermektedir. Gangliyonların ve muskarinik reseptörlerin bloke edilmesine rağmen antagonize edilemeyen küçük bir kasılma yanıtının varlığını sürdürmesi bu kasılmanın non-adrenerjik non-kolinergik eksitator bir yanıt olabileceğini veya direkt olarak düz kas hücrelerinin elektriksel stimülasyonuna bağlı bir yanıt olabileceği kanısına varıldı. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda ileumunun longitu-

dinal düz kasına elektriksel alan stimülasyonu uygulandığında da nöronal asetilkolin salıverilmesine bağlı olarak kasılma yanıtları saptanmıştır [23]. İnce barsak segmentlerinin fizyolojik solüsyon içinde inkübe edildiği zaman sinir pleksuslarının parasempatik sinir uçlarından asetilkolin salgılandığı ve bu salınımın elektriksel stimülasyon sonucu arttığı ve bu artışın adrenerjik ve kolinerjik reseptörler tarafından modüle edildiği belirlenmiştir [24,25].

Salverilen histamin asetilkolin ile indüklenen kontraktıl yanıtları potansiyelize eder. Histaminin bu katkısı H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> reseptörlerinin agonistleri tarafından taklid edilirken antagonistleri tarafından bloke edilir [26].

H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> reseptörlerinin kobay gastrointestinal sisteminde de bulunduğu ve eksitator yanıtla aracılık ettiği bildirilmiştir [27-29]. Histamin H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> reseptörleri ayrı ayrı bloke edildiğinde kasılma yanıtlarında beklenildiği gibi düşüş saptandı. H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> reseptörlerini aynı dokuda bloke edildiğinde ise kasılma yanıtlarındaki inhibisyon arttı. Bu sonuca göre H<sub>2</sub> reseptörlerinin kasılma yanıtı üzerinde H<sub>1</sub> reseptörlerine göre daha ağırlıklı bir etkisinin bulunabileceği kanısına varılmasına neden oldu.

Coruzzi ve ark. [30], kobay duodenumunda H<sub>2</sub> agonistleri tarafından oluşturulan ancak H<sub>2</sub> reseptör blokerleri ile bloke edilemeyen kasılma yanıtlarının anormal reseptörlere veya non-spesifik mekanizmalara dayandırılmayacağı, bunun üçüncü ve yeni bir histamin reseptör tipinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Bertaccini ve Zappia [31] ise kobay gastrointestinal sisteminde üçüncü bir histamin reseptör alttipini tanımlamışlardır. H<sub>3</sub> reseptörleri olarak tanımlanan bu reseptörlerin kobay beyin ve periferel dokularının pre-sinaptik sinir terminallerinde bulunduğu, histamin ve diğer nörotransmitterlerin sentez ve salıverilmesini negatif olarak kontrol ettiği gösterilmiştir [32].

Histamin H<sub>3</sub> reseptörlerinin sıçan ileumunda kolinerjik sinir aracılı kontraksiyonlar üzerine herhangi bir etkisinin bulunmadığı ve henüz H<sub>3</sub> reseptör mRNA'sının bu bölgede tesbit edilemediği ifade edilmekte olmasına rağmen çalışmamızda histamin H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> reseptörleri ayrı dokularda veya her ikisi aynı dokuda bloke edildiği halde tiyoperamidin kasılma yanıtlarını artırdığı görülmüştür [33].

Histamin H<sub>1</sub> ve/veya H<sub>2</sub> reseptör blokasyonunun kasılma yanıtlarını azaltması nedeniyle tiyoperamidin etkisinin belirgin olarak görüldüğü; H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> reseptörler kapalı iken H<sub>3</sub> reseptör blokajının muhtemelen kolinerjik deşarja bağlı kasılma yanıtlarını artırdığı kanısına varıldı.

Histamin H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> reseptörleri ayrı dokularda veya her ikisi aynı dokuda bloke edilerek H<sub>3</sub> reseptör agonisti bir bileşik olan RAMH (10<sup>-8</sup>-10<sup>-5</sup>) molar derişimlerinin etkileri kümülatif olarak incelendi. RAMH artan derişimlerinde kasılma yanıtları üzerinde kademeli bir azalma gösterdi.

Ortama L-Arg veya L-NAME veya her ikisinin ilave edilmesi durumunda EFS yanıtlarında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak yapılan çalışmalarda nitrik oksitin histamin H<sub>2</sub> reseptör mRNA'sının "down" regülasyonunu indüklemesine aracılık ettiği gösterilmiştir [34].

Ayrıca nitrik oksit sentaz inhibitörü NG-monometil-

L-arjininin kobay ileumunun nörojenik gevşeme yanıtları üzerine olan etkilerinin L-arjinin tarafından kısmen geri çevrildiği ancak diğer nitrik oksit sentaz inhibitörleri L-NAME ve NG-nitro-L-arjininin etkilerini bozmadığı ve L-arjininin kendi başına nörojenik yanıtları değiştiremediği gösterilmiştir [36].

**Sonuç olarak**, selektif H<sub>3</sub> agonisti RAMH kontraktıl yanıtlarda belirgin bir azalmaya neden olması ve bu etkilerin yine selektif H<sub>3</sub> reseptör antagonisti tiyoperamid tarafından artırılmış olması nedeniyle histamin H<sub>3</sub> reseptörünün sıçan ileum düz kasında H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> reseptörlerine zıt yönde etki ettiği ve kas kontraksiyonunun inhibisyonuna aracılık ettiği kanısına varılmıştır. Ortama farklı serilerde NO prekürsörü L-Arg (10<sup>-4</sup> M) ve NO sentaz inhibitörü L-NAME (10<sup>-4</sup> M) ilave edilmesi sonucunda anlamlı bir farklılık ile karşılaşılmadı. Bu durumda nitrik oksidin muhtemelen histamin reseptörlerini ileum düz kas kasılmaları yönünden etkilemediği sonucuna varıldı.

### TEŞEKKÜR

Çalışmamızın istatistiksel değerlendirmeleri aşamasında değerli katkılarını esirgemeyen, Prof. Dr. Yusuf Çelik'e teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

1. Zhang M, Venable JD, Thurnmond RL. The histamine H<sub>4</sub> receptor in autoimmune disease. *Expert Opin Invest Drugs* 2006; 15: 1443-1452.
2. de Esch IJ, Thurmond RL, Jongejan A, et al. The histamine H<sub>4</sub> receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 462-469.
3. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H<sub>3</sub>) of histamine receptor. *Nature* 1983; 327: 117-123.
4. Leurs R, Brozius MM, Smit MJ, et al. Effects of histamine H<sub>1</sub>- H<sub>2</sub>- and H<sub>3</sub>- receptor selective drugs on the mechanical activity of guinea-pig small and large intestine. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 179-185.
5. Barajas-Lopez C, Peres AL and Espinosa-Luna R. Cellular mechanism underlying adenosine actions on cholinergic transmission in enteric neurons. *Am J Physiol* 1996; 271: 264-275.
6. Hill SJ, Ganellin CR, and Timmerman H, et al. Classification of histamine receptors. *Pharmacological Reviews* 1997; 49: 253-278.
7. Hatta E, Yasuda K, Levi R. Activation of histamine H<sub>3</sub> receptors inhibits carrier-mediated norepinephrine release in a human mode of protracted myocardial ischemia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997; 283: 494-500.
8. Schlicker E, Betz R, Gothert M. Histamine H<sub>3</sub> receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 1988; 337: 588-590.

9. Schlicker E, Fink K, Detzner M, et al. Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H<sub>3</sub> receptors. *J Neural Transmission* 1993; 93: 1-10.
10. Dimitriadou V, Rouleau A, Trung Tuong MD, et al. Functional relationships between sensory nerve fibers and mast cells of dura mater in normal and inflammatory conditions. *Neuroscience* 1997; 77: 829-839.
11. Schlicker E, Malinowska B, Kathmann M, et al. Modulation of neurotransmitter release via histamine H<sub>3</sub> heteroreceptors. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 1994; 8: 128-137.
12. Massimo Bertinaria. H<sub>3</sub> receptor ligands: new imidazole H<sub>3</sub>-antagonists endowed with NO-donor properties. *Il Farmaco* 2003; 58: 279-283.
13. Hew RWS and Hodgkinson CR. Characterization of histamine H<sub>3</sub>-receptors in guinea pig ileum with H<sub>3</sub>-selective ligands. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 621-624.
14. EA-Kim L, Javellaud J and Oudart N. Endothelium-dependent relaxation of rabbit middle cerebral artery to a histamine H<sub>3</sub> agonist is reduced by inhibitors of nitric oxide and prostacyclin synthesis. *Br J Pharmacol* 1992; 105:103-106.
15. Martinez AC, Novella S, Raposo R, et al. Histamine receptors in isolated bovine oviductal arteries. *Eur J Pharmacol* 1997; 326: 163-173.
16. Oike M, Kitamura K and Kuriyama H. Histamine H<sub>3</sub>-receptor activation augments voltage-dependent Ca<sub>2+</sub> current via GTP hydrolysis in rabbit saphenous artery. *J Physiol* 1992; 448:133-152.
17. Ambache N and Aboo Zar M. An inhibitory action of histamine on the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 1970; 38: 229-240.
18. Sung TS, La JH, Kim TW, et al. Alteration of nitrergic neuromuscular transmission as a result of acute experimental colitis in rat. *J Vet Sci* 2006; 7: 143-150.
19. Thatcher GR, Nicolescu AC, Bennett M, et al. Nitrates and NO release: contemporary aspects in biological and medicinal chemistry. *Free Radic Biol Med*, 2004; 37: 1122-1143.
20. Osinsky MA, Bass P. Chronic denervation of rat jejunum results in cholinergic supersensitivity due to reduction of cholinesterase activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 266: 1684-1690.
21. Tuladhar BR, Costall B and Naylor RJ. Modulation of 5-HT<sub>4</sub> receptor function in the rat isolated ileum by fluoxetine: the involvement of endogenous 5 hydroxytryptamine. *British J Pharmacology* 2002; 136:150-156.
22. Ogata N, Shibata T. Antidiarrheal Activity of Wood Creosote: Inhibition of Muscle Contraction and Enterotoxin-Induced Fluid Secretion in Rabbit Small Intestine. *Pharmacology* 2001; 62:181-187.
23. Kayaalp SO. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, 10. baskı, 2002: 979-980.
24. Kayaalp SO. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, 10. baskı, 2002: 549-553.
25. Franco R, Costa M and Furness JB. Evidence for the release of endogenous substance P from intestinal nerves. *Naunyn-Schiedeberg's Arch Pharmacol* 1979; 306:195-201.
26. Bertaccini G and Coruzzi G. An update on histamine H<sub>3</sub> receptors and gastrointestinal functions. *Dig Dis Sci* 1995; 40:2052-2063.
27. Patel NM, Goyal RK and Verma SC. Histaminergic H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> excitatory receptors in the guinea pig uterus and taenia coli. *Can J Physiol Pharmacol* 1980; 58: 1500-1503.
28. Barker LA and Ebersole BJ. Histamine H<sub>2</sub> receptors on guinea pig ileum myenteric plexus neurons mediate the release of contractile agents. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 221: 69-75.
29. Bertaccini G. Amines: Histamine in mediators and drugs in gastrointestinal motility, ed. By G. Bertaccini, *Handbook Experimental Pharmacology*; 1982: 59: 201-218.
30. Coruzzi G, Poli E and Bertaccini G. Histamine receptors in isolated guinea pig duodenal muscle: H<sub>3</sub> receptors inhibit cholinergic neurotransmission. *J Pharmacol Exp. Ther* 1991; 258: 325-331.
31. Bertaccini G, Zappia L. Histamine receptors in the guinea pig duodenum. *J Pharmacol* 1981;33:590-593.
32. Ishikawa S and Sperelakis N. A novel class (H<sub>3</sub>) of histamine receptors on perivascular nerve terminals. *Nature* 1987; 327: 158-160.
33. Hemedah M, Loiacono R, Coupard IM, et al. Lack of evidence for histamine H<sub>3</sub> receptor function in rat ileum and human colon. *Naunyn Schiemdebergs Arch Pharmacol* 2001; 363: 133-138.
34. Schaefer U, Schneider A, Rudroff C, et al. Nitric oxide mediates histamine induced down-regulation of H<sub>2</sub> receptor mRNA and internalization of the receptor protein (R1). *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1968-1981.
35. Osthaus LE and Galligan JJ. Antagonists of nitric oxide synthesis inhibit nerve-mediated relaxations of longitudinal muscle in guinea pig ileum. *Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1992; 260: 140-145.