

ADJUVANLA ARTRİT OLUŞTURULMUŞ SIÇAN MODELİNDE İZOLE AORT PREPARATININ REAKTİF YANITLARI VE ALLOPÜRİNOL'ÜN GEVŞEME YANITLARINA ETKİSİ

REACTIVE RESPONSES OF ISOLATED AORTA PREPERATIONS AND THE RELAXING EFFECT OF ALLOPURİNOL IN ADJUVANT INDUCED ARTHRITIS MODEL IN RATS.

Funda F. BÖLÜKBAŞI HATİP*, İzzettin HATİP-AL-KHATİB*, Sibel ÜLKER**, İsmet DÖKMECİ***

*Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD., Denizli.

**Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD., İzmir.

***Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD., Edirne.

Özet

Bu çalışmada sıçan adjuvant artrit modelinde, izole torasik aorta yanıtlarındaki değişiklikler ve allopürinolün gevşeme yanıtları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla intradermal Freund's complet adjuvant verilmeden önce ve verildikten sonraki 6. (primer evre) ve 15. günde (sekonder evre) artrit bulgularını değerlendirmek amacı ile skorlama yapıldı. Artritin her iki evresinde, aort halkalarında kasılma ve gevşeme yanıtları elde edildi. Sekonder evredeki fenilefrin kontraktıl yanıtlarının kontrol ve primer evre artrite göre anlamlı olarak arttığı görüldü. Asetilkolin gevşeme yanıtlarının tüm artritlik sıçanlarda azalmış olması endoteliumda belirgin bir bozulmayı göstermektedir. Endotelli preparatlarda sodyum nitroprusid yanıtları açısından gruplar arasında farklılık bulunmadı. Allopürinol tek başına verildiğinde torasik oart preparatlarında gevşeme yanıtı oluştu. Sekonder evre artrit grubunda endotelli ve endotelsiz preparatlardaki allopürinol gevşeme yanıtı, kontrol ve primer evre artritlik Anahtar kelimeler: Turbo spin eko (TSE), restore, MR görüntüleme, spinal kanal gruba göre anlamlı olarak azalmıştı. Endotelli preparatlardan elde edilen asetilkolin gevşeme yanıtlarının, allopürinol varlığında kontrol ve primer evre artritlik grupta azaldığı ve fakat sekonder evre artritlik grupta değişmediği görüldü. Ortamdaki L-NAME varlığı allopürinolün asetilkolin gevşetici yanıtları üzerindeki etkilerini değiştirmektedir. Sonuç olarak, inflamatuvar artritlerde allopürinolün etkisi kısmen ksantin oksidaz ve kısmen nitrik oksid üzerinden olmaktadır. (Pam Tıp Derg 2009;2(3):107-17).

Anahtar sözcükler: Adjuvant artrit, İzole aorta, Allopürinol, Nitrik oksid, Asetilkolin

Abstract

In this study, we investigated the alteration of isolated aorta responses and the relevant relaxing effects of allopurinol in primary and secondary phases of rat's adjuvant arthritis model. The arthritis was evaluated by scoring prior to and 6 (primary phase) and 15 days (secondary phase) after induction of arthritis by intradermal Freund's complete adjuvant. Moreover, the relaxation and contraction responses of thoracic aorta rings were also recorded in both phases of arthritis. The contractile response to phenylephrine in secondary phase was higher than the control and primary phase. The reduction of the relaxing effect of acetylcholine in all arthritis groups indicates profound endothelial disturbance. No difference was found among the groups with regard to the effects of sodium nitroprusside in the aorta with intact endothelium. Allopurinol alone relaxed the aortic preparation. However, the effect of allopurinol in secondary phase aorts, both with and without endothelium, was decreased compared to that obtained in control and primary phase. The relaxing effect of acetylcholine in presence of allopurinol in aortic preparation with intact endothelium was decreased in control and primary phase, but the effect was not changed in secondary phase. L-NAME altered the effect of allopurinol on acetylcholine. In conclusion, the effect of allopurinol in inflammatory arthritis is partly via an effect on xanthine oxidase and partly on nitric oxide. (Pam Med J 2009;2(3):107-17).

Key words: Adjuvant arthritis, Isolated aorta, Allopurinol, Nitric oxide, Acetylcholine

Funda F. BÖLÜKBAŞI HATİP
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Denizli.
e-mail: fundabolukbasi@yahoo.com

Giriş

Vasküler doku inflamatuvar olaylarda önemli bir rol oynamaktadır ve romatoid artrit eklemler dışı bulgularından biri vaskülitir [1]. Romatoid artritte inflamasyonla birlikte oluşan erken vasküler hasar sonrası [2] endotelial fonksiyonda azalma görülmektedir [3]. Endotel, vazodilatör ve vazokonstriktör nitelikte çeşitli vazomotor ajanların açığa çıkışını sağlayarak, vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

DeneySEL artrit modellerinde artrit şiddetine bağlı olarak vasküler reaktivitede değişiklikler söz konusu olup, fenilefrin gibi kontraktil ajanlara artmış yanıt söz konusudur [4].

Romatoid artritli hastalardan elde edilen plazma örneklerinde ksantin oksidaz (XO) seviyelerinin arttığı gösterilmiştir [5]. XO çeşitli tipteki iskemik olaylar, doku ve vasküler hasarlarda, inflamatuvar olaylarda ve kronik kalp yetmezliğinde önemlidir [6]. XO, pürin yıkım yolağında sitozolik bir enzim olup oksidatif hidrosilasyon sonucu superoksit anyon ya da hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen radikallerinin (ROS) ortaya çıkışına neden olmaktadır, hipoksantini ksantine ve ksantini ürik aside dönüştürmektedir [7]. ROS'lar hücre içi sinyal iletim yollarını etkileyerek ya da hücreSEL yapılarDA direkt hasar oluşturarak vasküler fonksiyonları etkileyebilirler [8]. Vasküler dokuda serbest oksijen radikalleri major kaynakları arasında NADPH oksidaz, siklooksijenaz, XO, nitrik oksit sentaz ve mitokondrial elektron transport sistemi sayılabilir [9]. XO ve NADPH oksidaz yolağı vasküler oksidatif strese neden olan iki ana sistemdir. ROS'un açığa çıkışı sonucu NO bağımlı relaksasyonda azalma görülmektedir.

Artritte oluşan vasküler hasar sonrası endotelial zedelenme sonucu ACh relaksan yanıtında azalma olduğu ve bu azalmada ortaya çıkan patolojide asıl olarak rolü olabileceği düşünülen ROS'ların, hastalığın şiddeti arttıkça aşırı NO yıkımına neden olabileceği öne sürülmüştür [4]. ROS'ların direkt kontraktil etkilerinde farklı sinyal iletim mekanizmaları; mitojen aktive protein kinaz, Rho kinaz gibi ya da endotelden salınan NO ve kalsiyum kanal aktivasyonu rol oynayabilir [10].

Allopürinol XO'nun güçlü bir inhibitörüdür ve uzun yıllardır gut hastalığı ve hiperürisemi ile giden durumların tedavisinde kullanılmaktadır. Allopürinol ve aktif metaboliti olan oksipürinolün, XO'nun önemli rolü olduğu gösterilen vasküler hasar ya da inflamatuvar hastalıklarda yeri olabileceğini düşündürmektedir. Allopürinol ve metabolitlerinin bu etkisi XO inhibisyonuna bağlı ya da bağımsız olabilir. Yapılan bu

çalışmalar doğrultusunda in vitro izole organ banyosunda, sıçan adjuvant artrit modelinde XO inhibisyonunun vasküler reaktivitedeki değişikliklere etkisi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan PAUH-DEK-2008/020 sayı ile 04.06.2008 tarihinde onay almış ve çalışma İyi Laboratuvar Uygulamaları kılavuzuna göre yapılmıştır.

Deney hayvanları

Deneyde 170-220g ağırlığında toplam 45 adet erkek Wistar sıçan kullanıldı. Hayvanlar eşit şekilde 3 gruba ayrıldı. Her kafeste 5 sıçan bulunacak şekilde kafeslere alındı. Beslenmeleri serbest bırakıldı. Oda ısısında, %50 ±5 nem oranında ve 12 saat karanlık/aydınlık ortamda tutuldular.

Deneyde kullanılan gereçler

İzole organ banyoları izometrik ölçümleri için transdüserlere (MAY-COM FDT 10-A) bağlandı. Polywin 95 programı ve 4 kanallı veri elde etme sistemi (TDA 94) kullanılarak ölçümler bilgisayarda görüntülenerek kaydedildi.

Adjuvant artrit indüksiyonu :

Adjuvant artrit sıçanların sağ arka pençe palmar yüzeylerine intradermal 0.1 mL mineral yağ içinde 0.6mg ısıda öldürülmüş *Mycobacterium tuberculosis*, içeren Freund's Complet Adjuvant (FCA) mL hacminde tek enjeksiyon şeklinde verilerek yapıldı. Kontrol gruba ise serum fizyolojik verildi. Artrit bulgularını değerlendirmek amacı ile FCA enjeksiyonundan önce ve sonra ölçümler yapıldı ve sıçanlar 6. (primer evre) ve 15. günde (sekonder evre) sakrifiye edilerek torasik aort halkaları izole organ banyosuna asıldı. Ağırlık FCA enjeksiyonundan önce ve sonra ölçülerek % değişim olarak verildi. Pençe şişliği mikrometre ile mm cinsinden her gün alınarak kaydedildi. Artrit için skorlamada aşağıdaki kriterler kullanıldı [11]: Kilo kaybı; yok (0), %5'in altında (1), %5'in üstünde (2); pençede kızarıklık: yok(0), var (1); pençede şişlik: yok(0), %45'in altında (1), %45'in üstünde (2); kuyrukta nodül: yok (0), hafif (1), şiddetli (2); defomite: yok (0), yalnızca tek ekstremitede (1), birden fazla ekstremitede(2). Artrit yukarıdaki skorlamaya göre Grade 0: 0-1, Grade 1: 2-4, Grade 2: 5-7, Grade 3: 8-10 olarak derecelendirildi.

Deney protokolü

Deney hayvanları 3 gruba ayrıldı. Grup I: Kontrol; 0.1 mL serum fizyolojik intradermal sağ arka

pençeye uygulandı. Grup II: Primer evre artritlik grup; Grup III: Sekonder evre artritlik grup;

İzole aort preparatının hazırlanması

Tüm sıçanlar eter anestezisi altında göğüs boşluğu sternum her iki yanından açılarak torasik aortaya ulaşıldı. Aorta, arkus aortanın hemen altından kesilerek, çevre yağ ve bağ dokusu temizlenerek 3-4 mm uzunluğunda transvers halkalar hazırlandı. Preparat hazırlanması sırasında endotel tabakasının zarar görmemesi için gerekli özen gösterildi. Endotelsiz preparatlarda, endotel intimal yüzeyi forseps ile dikkatlice sürtülerek endotel tabakası zedelendi. Endotel tabakasının yokluğu ACh (1 μ M) 'e verilen relaksan yanıtın %80 ve üzerinde azalması olarak değerlendirildi.

Torasik aort halkaları 30mL Krebs-Henseleit solüsyonu içeren organ banyolarına asıldı. Krebs-Henseleit solüsyonu(mM): NaCl 118.30, KCL 4.70, KH₂PO₄ 1.22, MgSO₄ 1.20, CaCl₂ 2.50, NaHCO₃ 25.00, glukoz 11.10 içermekte olup, pH 7.42'e ayarlandı. İzole organ banyoları %95 O₂ ve %5 CO₂ karışımı ile gazlandırıldı. Her halkanın içersinden iki adet paslanmaz çelik klips geçirilerek, klipslerden biri organ banyosunun altına diğeri transdüserle bağlanarak izometrik kuvvet ölçümleri Polywin 95 ve 4 kanallı transdüser veri elde etme sistemi (TDA 94) yardımı ile bilgisayara aktarıldı.

Aort preparatlarına giderek artan gerim uygulandı, ve en son 2g gerim altında 90 dk. beklendikten sonra çalışmaya alındı. 30mL'lik izole organ banyolarına artan konsantrasyonlarda (0.003-30 μ M) fenilefrin verilerek endotelli preparatlarda kontraktıl yanıtlar ve kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrileri elde edildi. Daha sonra tüm preparatlar submaksimal dozda fenilefrin ile prekontrakte edildikten sonra ortama artan dozlarda kümülatif olarak ACh (0.003-30 μ M), sodyum nitroprusid (0.001-30 μ M) ve allopürinol (0.1 μ M-3mM) eklenerek konsantrasyon-yanıt eğrileri elde edildi. Allopürinolün, ACh endotel bağımlı gevşemeler üzerine olan etkisini gösterebilmek amacı ile submaksimal dozda ile prekontrakte edilen izole organ banyolarına aynı anda final molar konsantrasyonu 10⁻⁴ M olacak şekilde allopürinol veya L-NAME (10 μ M) eklenerek ACh gevşeme yanıtları kaydedildi.

Veri analizi

Sonuçlar ortalama ve standart hata olarak NCSS(4.21, Dr.Jerry L.Hintze 1986) programında hesaplandı. İzole aort preparatlarından elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerine ait

değerler transdüser veri elde etme sistemi ile software programında basit algoritm ile non-linear regresyon yolu ile fit edilerek EC₅₀ ve E_{max} hesaplandı. Kontraktıl yanıtlar maksimal kontraksiyonun yüzdesi olarak tanımlanırken, gevşeme yanıtları fenilefrin kontraksiyonundan sonra elde edilen % değişiklik olarak hesaplandı. Konsantrasyon-yanıt eğrileri tekrarlayan veriler için ANOVA yöntemi ile karşılaştırıldı. E_{max} değerlerindeki değişiklikler unpaired t-test kullanılarak hesaplandı. p< 0.05 değeri anlamlı olarak kabul edildi.

İlaçlar

Fenilefrin hidroklorid, asetilkolin hidroklorid, sodyum nitroprusid ve L-NAME Sigma Chemical Co.(St.Louis.Mo., USA) ve KCL Merck (Darmstadt, Germany), Allopürinol, RBI (USA) firmalarından sağlandı. Allopürinol 0.25N sodyum hidrokisit içinde çözündürülerek pH 9.5 olacak şekilde ayarlandı. Her çalışma öncesi allopürinol taze olarak hazırlandı. Diğeri ilaçların stok solüsyonları distile suda hazırlandı ve konsantrasyonları izole organ banyosu içindeki final molar konsantrasyon olarak tanımlandı.

Bulgular

Klinik bulgular

0.1 mL FCA sağ arka pençeye verildikten sonra primer ve sekonder artrit bulguları değerlendirildi. Primer evrede artritlik skorlama değeri 2.38 \pm 0.46 ve sekonder evrede 5.0 \pm 0.32 olarak bulundu.

FCA inokülasyonu ile artrit her iki evresinde anlamlı şekilde vücut ağırlığında azalma olurken, kontrol sıçanlarda ise kilo alımı gözlemlendi (p< 0.05). Pençe kalınlığında her grupta giderek artan bir artış gözlemlendi (Tablo 1). Sekonder evre artritte bu artış kontrole göre anlamlı olup, artritlik skorlarla birlikte değerlendirildiğinde şiddetli sistemik bir inflamasyonu göstermektedir.

İzole aort yanıtları

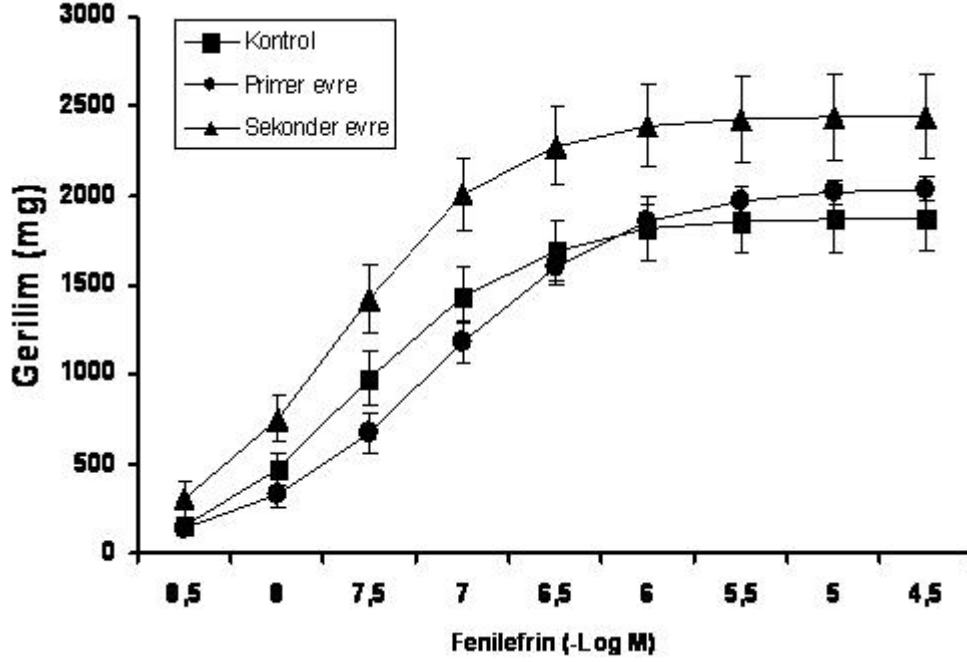
Kontraktıl yanıtlar

Fenilefrin (0.003-30 μ M) kontrol ve artritlik sıçanlarda kasılma yanıtı oluşturdu. Fenilefrin kontraktıl yanıtları artritlik sekonder evresinde kontrol ve primer evre ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış bulundu (Şekil 1). Fenilefrin'in maksimum kasıcı etkisi primer ve sekonder evrede artmıştır. Fakat potansi gösteren pD2 değeri gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir (Tablo 2). Dolayısı ile fenilefrin'e olan sensitivitede değişiklik söz konusu değildir. Bu sonuçlar Ülker ve ark.'nın [9] yaptığı çalışma ile uyumludur.

Tablo 1-Her üç grupta pençe kalınlığı ve ağırlık değişimi başlangıç değerlere göre % değişim olarak verilmiştir.

	Pençe kalınlığı	Ağırlık değişimi
Kontrol	3.55±1.74	+4.14±1.73
Primer evre artrit	4.05±1.72	-1.84±1.24*
Sekonder evre artrit	11.76±3.92*	-8.58±2.07*

Değerler ortalama ve standart hata olarak verilmiştir. *p<0.05 kontrole göre anlamlı olarak kabul edilmiştir.

**Şekil 1-** Fenilefrin kümülatif kontraktıl yanıtları. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel önem *p<0.05 kontrol ve primer evreye göre.**Tablo 2-** Artritli ratlarda fenilefrin'in kasıcı etkilerinin değişikliği

	E _{max}	pD ₂
Kontrol	1880.61±190	7.56±0,11
Primer Evre	2049.27±98*	7.2± 0,11
Sekonder Evre	2445.66±236#	7.8±0.00

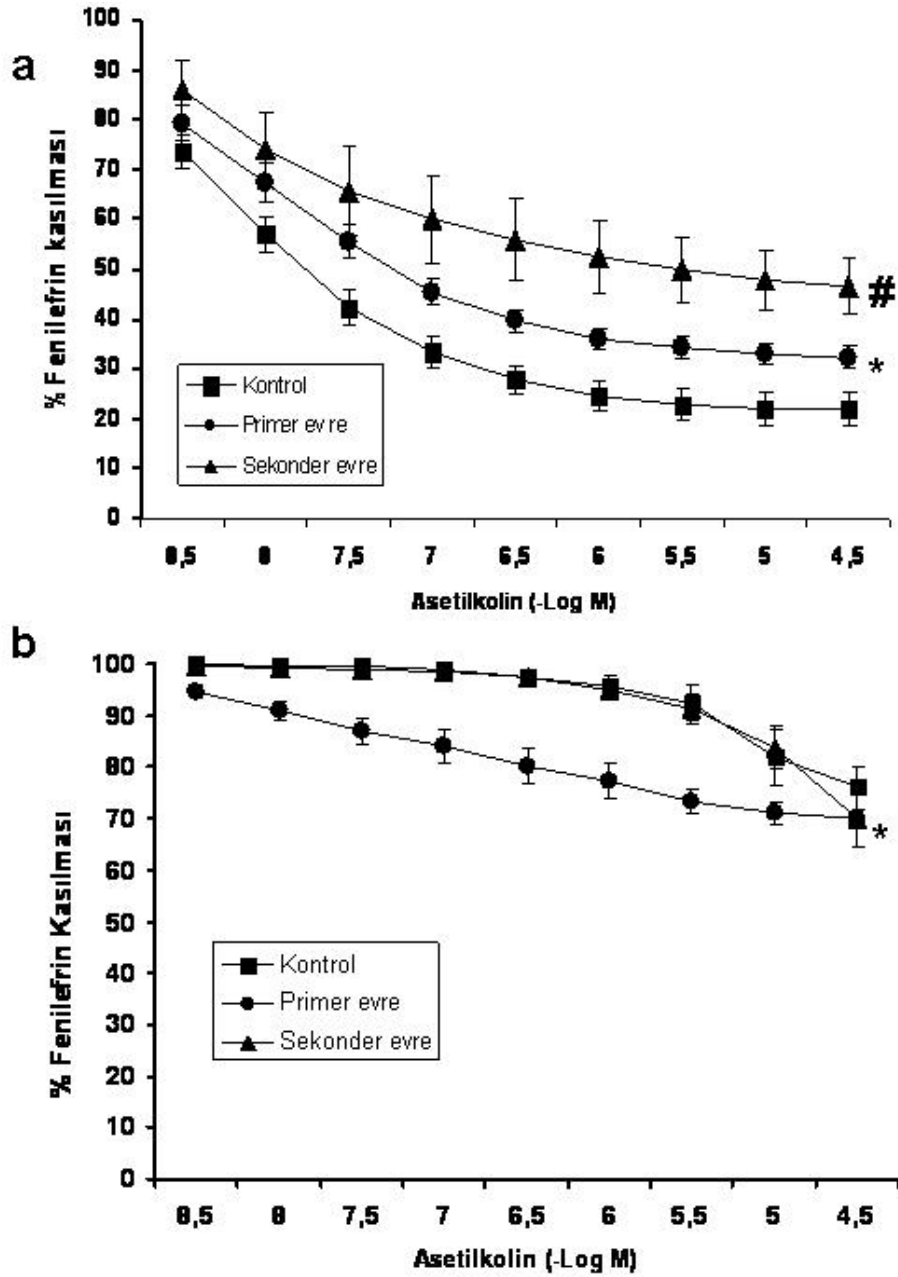
Değerler ortalama ve standart hata olarak verilmiştir. *p<0.04 kontrole göre, #p< 0.02 primer evreye göre anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Gevşetici yanıtlar

Gevşetici yanıtlar izole organ banyolarında paralel olarak, her 3 grupta endoteli intakt ve endoteli zedelenmiş torasik aort preparatlarında çalışıldı.

ACh yanıtları: Fenilefrin ile submaksimal dozda prekontrakte edilen endoteli intakt preparatlarda ACh'nin gevşetici etkisi primer ve

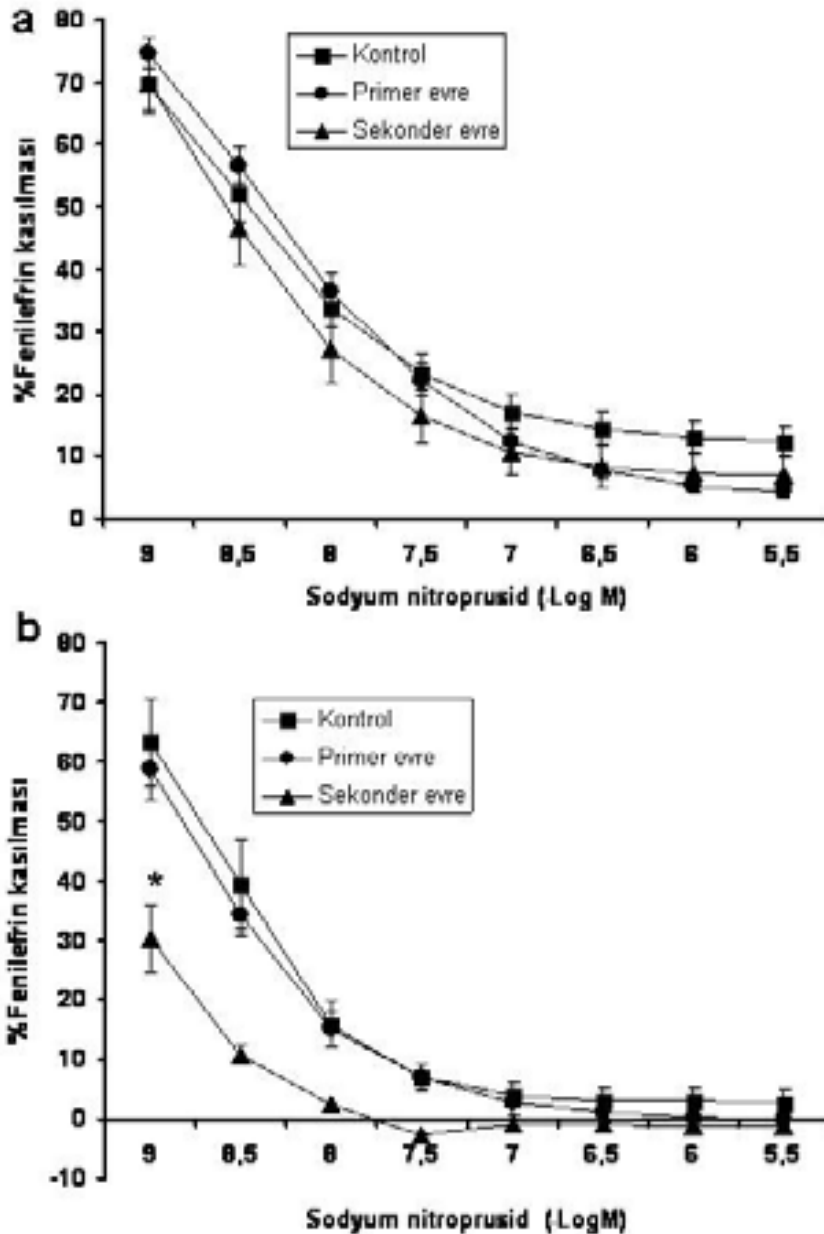
sekonder evre artritlerde azalmıştı. Ancak sekonder evrede bu azalma primer evreye göre anlamlı olarak (p<0.05) daha fazlaydı (Şekil 2a). Endoteli mekanik olarak zedelenmiş aorta preparatlarında ACh gevşeme yanıtları her 3 grupta azaldı. Primer evrede maksimum %30'luk bir gevşeme diğer iki gruba göre anlamlı (p<0.05) bulundu (Şekil 2b).



Şekil 2- Submaksimal fenilefrin ile prekontrakte edilen endotelli(a) ve endoteli mekanik olarak hasarlanmış (b) aorta preparatlarında ACh gevşeme yanıtları. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel önem (a): * $p < 0.05$ kontrole göre, # $p < 0.05$ primer evreye göre. (b): * $p < 0.05$ kontrol ve sekonder evreye göre.

Sodyum nitroprusid yanıtları: Endotelli preparatlarda her 3 grupta sodyum nitroprusid yanıtları açısından fark bulunmamıştır. Her 3 grupta da sodyum nitroprusid %80 üzerinde gevşeme yanıtı oluşturmuştur (Şekil 3a). Öte

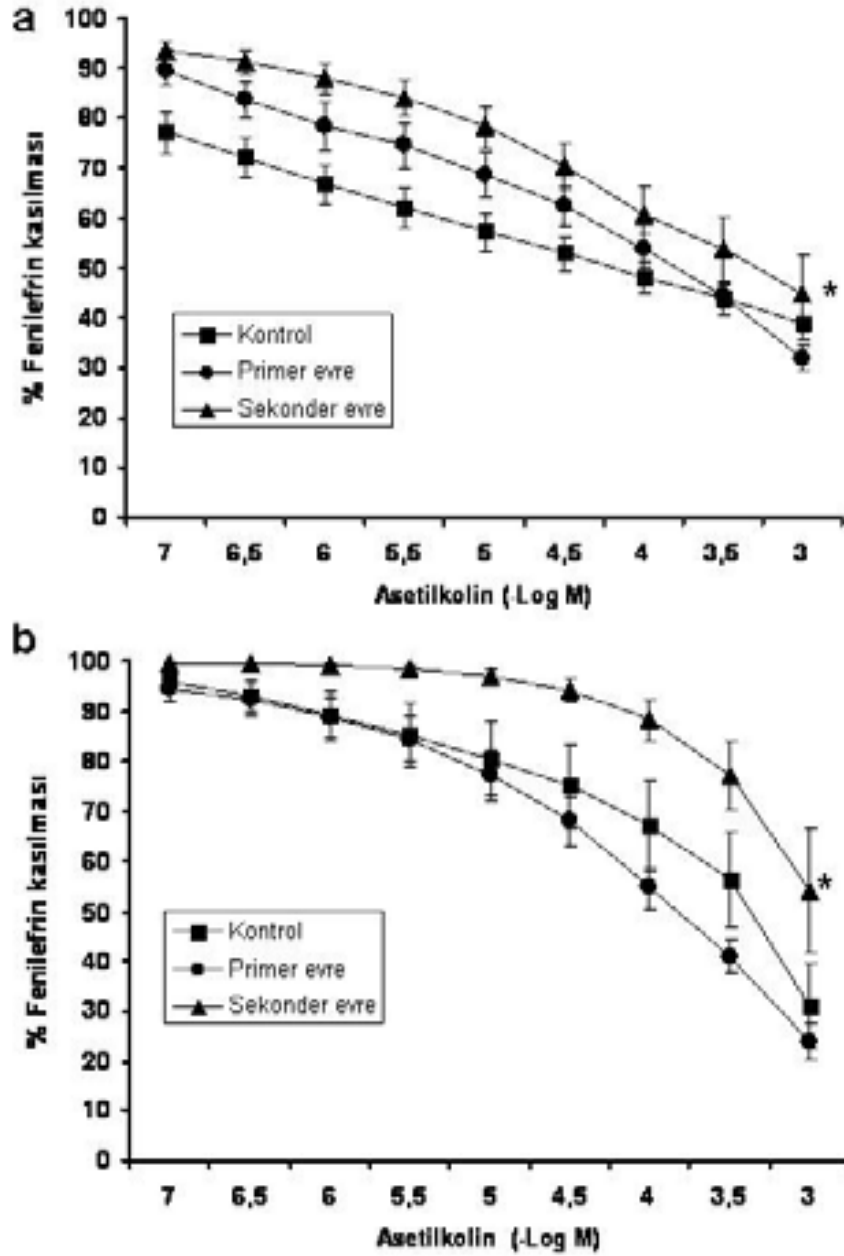
yandan endoteli mekanik olarak hasarlanmış preparatlarda sekonder evrede sodyum nitroprusid gevşeme yanıtı diğer iki gruba göre anlamlı olarak ($p<0.05$) $0.001-3 \mu\text{M}$ konsantrasyon aralığında artmış bulundu (Şekil 3b).



Şekil 3- Submaksimal fenilefrin ile prekontrakte edilen endotelli(a) ve endoteli mekanik olarak hasarlanmış (b) aorta preparatlarında sodyum nitroprusid gevşeme yanıtları. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel önem * $p<0.05$ kontrol ve primer evreye göre.

Allopürinol yanıtları: Allopürinol her 3 grupta endotelli preparatlarda gevşeme yanıtı oluşturmuştur. Primer ve sekonder evre artritte allopürinolün etkisinde bir azalma gözlenmiştir. Ancak sekonder evredeki azalma kontrole göre anlamlı ($p<0.05$) olarak daha fazlaydı (Şekil 4a). Öte yandan endoteli me-

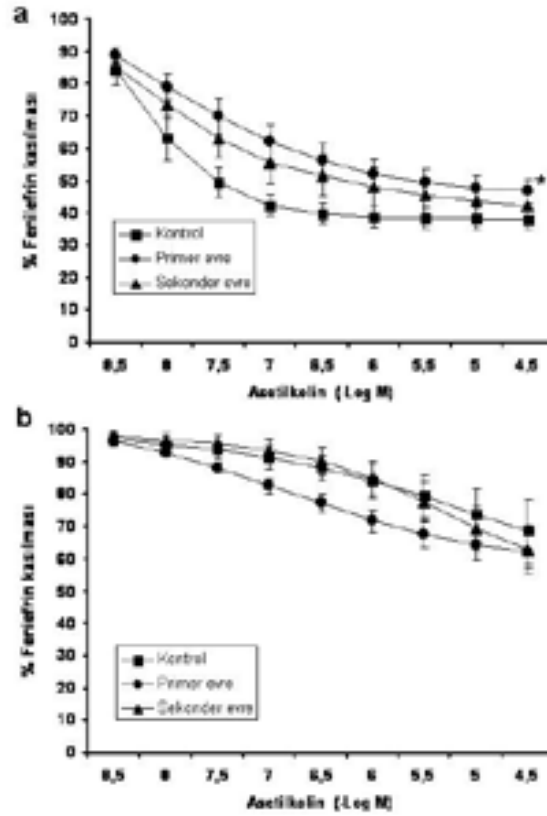
kanik olarak hasarlanmış preparatlarda tüm gruplarda gevşeme yanıtı elde edilmesine karşın, bu yanıt kontrol ve primer evrede allopürinol maksimum konsantrasyonunda endotelli preparatlara göre %8 oranında daha fazlaydı (Şekil 4b).



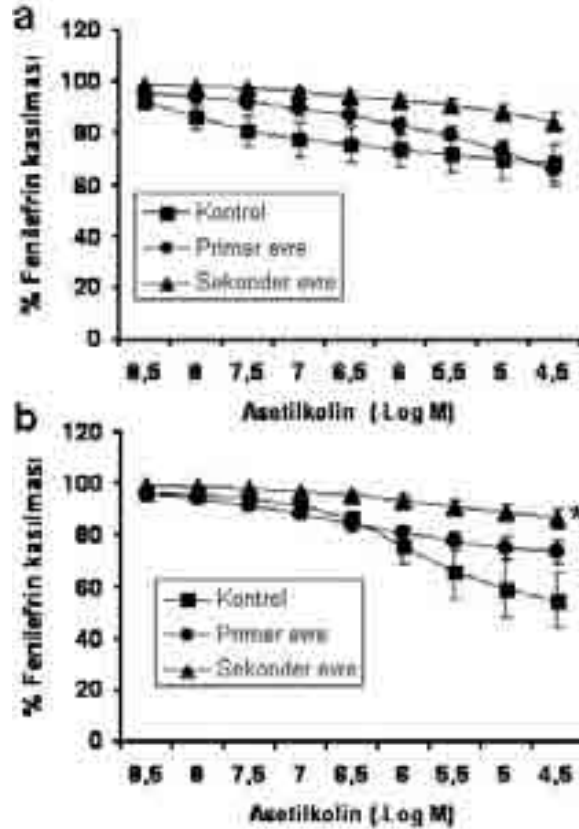
Şekil 4- Submaksimal fenilefrin ile prekontrakte edilen endotelli(a) ve endoteli mekanik olarak hasarlanmış (b) aorta preparatlarında Allopürinol gevşeme yanıtları. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel önem (a): * $p < 0.05$ kontrole göre, (b): * $p < 0.05$ kontrol ve primer evreye göre.

Allopürinol varlığında ACh gevşeme yanıtları: Endotelli preparatlarda ACh gevşeme yanıtı primer ve sekonder evrede azalmakla birlikte yalnızca primer evredeki azalma kontrole göre anlamlı ($p < 0.05$) idi. (Şekil 5a). Allopürinol varlığında ACh ile elde edilen gevşeme yanıtları, allopürinol içermeyen ortamdaki ACh yanıtları ile karşılaştırıldığında, kontrol ve primer evre artritlik grupta anlamlı olarak azalmıştı ($p < 0.05$). Sekonder evre açısından allopürinol varlığı, yokluğuna göre değişiklik oluşturmadı. Endoteli mekanik olarak hasarlanmış preparatlarda allopürinol varlığında ACh gevşeme yanıtları açısından

gruplar arasında fark bulunmamıştır (Şekil 5b). Ek olarak ortamdaki allopürinol varlığı ACh yanıtları açısından allopürinol içermeyen ortam ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark oluşturmadı. Şekil 6a' da görüldüğü gibi L-NAME ACh'nin etkisini kontrol grubunda % 47 azaltırken, primer ve sekonder artritite sırasıyla %32 ve %37 azalttı. Gruplar arası önemli bir fark saptanmamıştır. Öte yandan L-NAME allopürinolün etkisini kontrol grubunda %16 oranında azalttı. Primer evre grubunda %27 ve sekonder evre grubunda %44 oranında azalttı, $P < 0.05$ (Şekil 6b).



Şekil 5- Submaksimal fenilefrin ile prekontrakte edilen Allopürinol varlığında, ACh'nin endotelli(a) ve endoteli mekanik olarak hasarlanmış (b) aorta preparatlarında gevşeme yanıtları. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel önem (a): * $p<0.05$ kontrole göre.



Şekil 6- Submaksimal fenilefrin ile prekontrakte edilen endotelli aorta preparatlarında ortamda Allopürinol yokluğunda (a) ve varlığında (b) L-NAME 'nin (10 μ M) ACh gevşeme yanıtlarına etkisi. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel önem : * $p<0.05$ kontrole göre.

Tartışma

Adjuvant ile oluşturulan deneysel artrit modelinde, artrit süresine bağlı olarak sıçanlarda sistemik değişiklikler gözlemlendi. Paralel şekilde vasküler reaktivitedeki değişiklikler hastalığın şiddeti ile doğru orantılı idi. Özellikle sekonder evre artritte endotelial fonksiyonda bozulma ile birlikte fenilefrin'e anlamlı şekilde artmış yanıt bulundu.

Vasküler tonus üzerinde yapılan kontraktilete çalışmalarında, vasküler tonusun düz kas ve endotel hücrelerinde bulunan intrasellüler Ca^{+2} depoları tarafından düzenlendiği gösterilmiştir [12]. α -adrenerjik reseptör aracılı kasılmaya neden olan fenilefrin, sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonlarını membran depolarizasyonu sonucu direkt ya da indirekt olarak reseptör ya da voltaj aracılı Ca^{+2} kanalları açarak, fosfolipaz C aktivasyonu sonucu myosin hafif zincir kinaz aktive ederek ya da inositol-3 fosfat (IP3) üretimi ile birlikte IP3 ile indüklenen endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} açığa çıkışını sağlayarak gerçekleştirebilir. Fenilefrin yanıtlarında artrit süresine bağlı olarak giderek artan bir artış söz konusudur. KCl yanıtları ise artrit süresine bağlı olarak azalmaktadır (veri gösterilmemiştir). Artritte fenilefrin kasılma yanıtlarındaki artışın nedeni daha çok ekstrasellüler Ca^{+2} 'un hücre içerisine girmesinden çok, IP3 aracılı sitozolik Ca^{+2} açığa çıkışından olabilir zira kalsiyumsuz ortamda fenilefrin kontraktile yanıtları değişmemiştir [13]. Yine endotelial fonksiyonda artrit süresine bağlı olarak giderek artan bir bozulma ve vazodilatör yanıtta azalmanın olması fenilefrin kontraktile yanıtlarındaki artışa açıklayabilir.

Vasküler düz kas tonusunun düzenlenmesinde endotel tabakası önemli bir rol oynamaktadır. Endotel aracılı yanıtlarda bozulma ROS'ların açığa çıkışı ya da sitokin üretiminden kaynaklanabilir. Adjuvant artrit lenfositöz ve spesifik artrojenik T hücrelerinin FCA ile aktive edilmesi ile başlayan eklem inflamasyonu ve daha sonra çeşitli sitokinlerin (IL1, IL6, TNF α , IFN γ) ve NO üretiminin artışı ile devam eden immun ve inflamatuvar faza sahiptir. Söz konusu bu sitokinler NO yolağını ve diğer inflamatuvar yanıtları tetikleyebilirler [14]. Endotelden salınan çeşitli vazodilatör mediyatörler (NO, prostasiklin, endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör vd) endotel fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar.

Adjuvant artrit modelinde, ACh'nin endotel bağımlı gevşeme yanıtlarında, artrit süresine

bağlı olarak giderek artan bir azalma söz konusudur [13]. ACh gevşeme yanıtlarında vasküler endotel kaynaklı endotelial nitrik oksid sentaz (eNOS) tarafından sentezlenen NO önemlidir. Bu nedenle ACh gevşeme yanıtları endotel tabakasının zedelenip zedelenmediğini ve NO biyosentezini göstermesi açısından önemlidir. Bu doğrultuda çalışmamızda artrit süresine bağlı olarak elde edilen ACh yanıtlarında azalma, artritte endotel aracılı yanıtların bozulduğunu, endotel tabakasında bir harabiyet olabileceğini göstermektedir. ACh ayrıca hücre içi Ca^{+2} 'u artırarak eNOS akut stimülasyonuna ve NO açığa çıkışına neden olur [15]. NO inflamatuvar reaksiyonun evresine bağlı olarak çeşitli humoral ve hücresele yanıtları düzenleyebilir.

Ayrıca endotel için toksik olduğu bilinen sitokinlerin indüklenebilir nitrik oksid sentaz (iNOS) ekspresyonunu arttırdıkları ve fakat eNOS down regülasyonuna neden oldukları bilinmektedir [16]. ROS'lar hücre içi sinyal iletim yollarını etkileyerek ya da hücresele yapılarda direkt hasar oluşturarak vasküler fonksiyonları etkileyebilirler. ROS'un açığa çıkışı sonucu NO bağımlı relaksasyonda azalma görülmektedir.

ACh'nin endotel üzerine olan etkisi NOS bağımsız mekanizmalarla da olabilir. Normal koşullarda ACh yeterli NO açığa çıkışına neden olarak endotel kaynaklı kasıcı faktörlerin etkisini maskeler. Endotelde bir bozulmanın olması durumunda superoksit radikalleri, siklooksijenaz ürünleri, endotelin gibi endotel kasıcı faktörlerin belirgin etkisi ortaya çıkar. Endoteli mekanik olarak hasarlanmış preparatlarda primer evre grubunda ACh yanıtında %30 oranında bir gevşeme göz ardı edilebilir. Zira endotelli preparatlarda endotel varlığı test edilirken %70 oranından daha fazla gevşeme beklenmelidir [17]. Benzer şekilde endotelsiz preparatlardaki %30'a varan gevşemeler normal sınırlar içinde değerlendirilebilir.

Eksojen vazodilatörler etkilerini NO açığa çıkararak gösterirler. Düşük bazal NO üretimi ile etkileri daha belirginleşir, etki endotel tabakasının mekanik olarak sıyrılması ile daha da güçlenir. Nitratların etkisi endotel içermeyen vasküler yapılarda daha belirgindir [18].

Allopürinolün endotelli preparatlarda yaptığı gevşemenin, endoteli mekanik olarak hasarlanmış preparatlara göre daha fazla olması, allopürinolün etkisinin büyük oranda endotel bağımlı olabileceğini göstermektedir. Endo-

telli preparatlarda sekonder evrede gevşeme yanıtlarının kontrole göre anlamlı olarak daha az olması hem allopürinol yanıtların yüksek oranda endotel bağımlı olduğunu göstermekte hem de sekonder evre artritteki endotel hasarını desteklemektedir. Endotelli preparatlarda XO inhibisyonu ile NO aracılı vazorelaksasyonun arttığı gösterilmiştir [19].

Dolaşımdaki XO endoteldeki glikozaminoglikanlara bağlanarak, aktivitelerini sürdürürler [20]. XO'nun endotel fonksiyonları üzerinde iki ayrı etkisi bulunmaktadır: 1. superoksit üreterek NO ile etkileşime girer ve gevşemeyi azaltır, 2. antioksidan özellikteki ürati ortaya çıkararak, endotel fonksiyonunu düzeltir. Ancak üratin etkisi konusunda çelişkili veriler bulunmaktadır [21]. Allopürinolün çalışmamızda ortaya çıkardığı etkiler XO inhibisyonu ve NO-aracılı olabilir. Çalışmamızda Allopürinol, ACh'nin gevşetici etkisini azaltabildiği için, bu etkide diğer mekanizmaların allopürinolün etkinliğinde yer aldığı ileri sürülebilir. Endotel kökenli vazorelaksan faktörlerin salınımı ve sentezi için gerekli basamak sitozolik Ca^{+2} artışıdır. Allopürinol henüz bilinmeyen mekanizmalarla hücre içine Ca^{+2} girişini ya da intrasellüler depolardan Ca^{+2} açığa çıkışını bloke ederek indirekt olarak ACh gevşeme yanıtlarında azalmaya neden olabilir [22]. Bu çalışmada L-NAME'in allopürinolün etkisini kontrol grubunda %16 oranında azaltması, allopürinolün gevşetici etkisinde normalde NO aracılı etkinin çok az sorumlu olduğunu gösterir. Ancak elde edilen sonuçlara göre, artritte özellikle sekonder evrede allopürinolün etkisinde NO aracılı gevşeme daha önemli olabilir.

Sonuç olarak allopürinolün yüksek oranda etkisinin endotel üzerinden olduğu ve fakat endotelsiz preparatlarda da gevşemeye neden olduğu gösterilmiştir. Allopürinolün ACh gevşetici etkisini azaltması ve L-NAME ile inhibe edilen gevşetici yanıtların bir miktar allopürinol ile geriye döndürülmesi, allopürinolün etkisinin yalnızca XO sistemi üzerinden olmayıp, NO-aracılı da olduğunu göstermektedir.

Dip not: Bu çalışmada kullanılan Freund's complet adjuvantı sağlayan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD'nden Prof. Dr.Mehmet Melli ve çalışma süresince görüş ve desteklerini gösteren Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD'nden Yrd.Doç. Dr. Ayşe Erol ve emekli öğretim üyesi Prof. Dr.Akgün Evinç'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Snowden N, Kay RA. Immunology of systemic rheumatoid disease. Br Med Bull 1995; 51:437-448.
2. Kaplan MJ, McCune WJ. New evidence for vascular disease in patients with early rheumatoid arthritis. Lancet 2003;361:1068-69.
3. Hurlimann D, Forster A, Noll G et al. Anti-tumor necrosis factor α treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. Circulation 2002; 106:2184-87.
4. Ülker S, Önal A, Bölükbaşı Hatip F, et al. Effect of nabumetone treatment on vascular responses of the thoracic aorta in rat experimental arthritis. Pharmacology 2000; 60: 136-42.
5. Miesel R, Zuber M, Sanocka D, Graetz R, Kroeger H. Effects of allopurinol on in vivo suppression of arthritis in mice and ex vivo modulation of phagocytic production of oxygen radicals in whole plasma blood. Inflammation 1994;18: 597-612.
6. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. Pharmacol Rev 2006, 58:87-114.
7. Borges F, Fernandes E, Roleira F. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. Curr Med Chem 2002; 9:195-217.
8. Szasz T, Thompson JM, Watts SW. A comparison of reactive oxygen species metabolism in the rat aorta and vena cava: focus on xanthine oxidase. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008; 295: H1341-H1350.
9. Kim Y.K, Lee M, Son SM, et al. Vascular NADH oxidase is involved in impaired endothelium-dependent vasodilatation in OLETF rats, a model of type 2 diabetes. Diabetes 2002; 51:522-27.
10. Ardanaz P, Pacano PJ. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. Exp Biol Med 2006;231(3):237-251.
11. Melli M, Yazıcı H, Uçar A, Türker K. Inhibitory effect of allopurinol on adjuvant arthritis in rats. Agents Actions 1994; 42:56-9.
12. Daniel EE, Van-Breemen C, Schilling WP, Kwan CY. Regulation of vascular tone: cross-talk between sarcoplasmic reticulum and plasmalemma. Can J Physiol Pharmacol 1995; 73:551-7.
13. Demirci B, Uysal A, Ülker S. Alterations in the vascular reactivity of aorta in the early and late phase of adjuvant-induced arthritis in rat. Vascular Disease Prevention 2007; 4:11-19.
14. Cannon GW, Openshaw SJ, Hibbs JB, Hoidal JR, Huechsteadt TP, Griffiths M. Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. Art Rheumatism 1996; 39:1677-1684.
15. Arnal JF, Tack I, Besombes JP, Pipy B, Negre-Salvayre A. Nitric oxide and superoxide anion production during endothelial cell proliferation. Am J Physiol 1996; 271: C1521-C1526.
16. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. 2000; 190:244-254.
17. Chang KSK, Davis RF. Propofol produces endothelium-independent vasodilatation and may act as a Ca^{+2} channel blocker. Anesth Analg 1993; 76: 24-32.
18. [18] Luscher TF. Endothelium-derived nitric-oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. Eur Heart J 1991; 12: 2-11.
19. Miyamoto Y, Akaike T, Yoshida M, Goto S, Horie H, Maeda H. Potentiation of nitric oxide-mediated vasorelaxation by xanthine oxidase inhibitors. P.S.E.B.M 2996; 211:366-73.
20. Houston M, Estevez A, Chumley P, et al. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kine-

- tic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem* 1999, 274: 4985-94.
21. Waring WS, McKnight JA, Webb DJ, Maxwell SR. Uric acid restores endothelial function in patients with type 1 diabetes and regular smokers. *Diabetes* 2006; 55: 3127-32.
 22. Vanhoutte PM. Vascular endothelium and Ca²⁺ antagonists. *J cardiovascular Pharmacol* 1998, 12:S21-S28.