

Klonidin N (Omega)-Nitro-L-Arjinin aracılı hipertansiyon gelişimini önler

Clonidine prevents development of hypertension in N (Omega)-Nitro-L-Arginine-treated rats

Süleyman Oktar, Selçuk İlhan, Hakkı Engin Aksulu

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

ÖZET

Amaç: Kronik nitrik oksit sentaz (NOS) inhibisyonu aracılı hipertansiyona artmış sempatoadrenerjik aktivitenin katkısı bilinmekle birlikte yeterince açık değildir. Bu model hipertansiyona sempatik aktivitenin katkısını belirlemek için bu çalışmada uzun süreli N (omega)-nitro-L-arjinin (L-NNA) uygulamasıyla gelişen hipertansiyonda sempatolitik bir ajan olan klonidinin kan basıncı ve vasküler alfa-adrenerjik reseptörler üzerine etkileri incelendi.

Yöntemler: Altmış iki Wistar sıçanlar randomize bir şekilde 8 gruba ayrıldı: Tüm gruplara L-NNA ve/veya klonidin iki farklı konsantrasyonda içme suyuyla 10 gün süreyle uygulandı. L-NNA15 ve L-NNA45 grupları sırasıyla 15 ve 45mg/100ml konsantrasyonda L-NNA aldı. KLO150 ve KLO225 gruplarına sırasıyla 150 ve 225µg/100ml konsantrasyonda klonidin uygulandı. Kan basıncı ve kalp hızı "tail-cuff" yöntemi, plazma NOx düzeyleri spektrofotometre ile tespit edildi. α-adrenerjik reseptör yanıtları aorta halkalarında "in vitro" şartlarda değerlendirildi.

Bulgular: Klonidin L-NNA uygulaması ile oluşan hipertansiyonun gelişimini doz bağımlı olarak önlerken kalp hızında meydana gelen anlamlı düşüşü etkilemedi. Tek başına klonidin uygulanan normotansif sıçanların kan basıncı ve kalp hızında bir değişiklik olmadı. Plazma NOx seviyesi L-NNA15 grubunda arttı (0.62±0.11 µmol/L, p=0.003), diğer gruplarda ise değişmedi. Aorta halkalarının "in vitro" deneylerde L-NNA45 grubunda hem fenilefrine (-7.33±0.11, p=0.001) hem de klonidine (-7.60 ± 0.27 µmol/L, p=0.003), L-NNA15 grubunda ise fenilefrine duyarlılığının arttığı tespit edildi (-6.94±0.13 µmol/L, p=0.002). KLO150 grubunda aorta halkalarının klonidine (-7.20 ± 0.10 µmol/L, p=0.009), KLO225 grubunda ise fenilefrine duyarlılığı arttı (7.93±0.16 µmol/L, p<0.001).

Sonuç: Bu bulgular NOS inhibisyonu aracılı hipertansiyonun gelişiminden sorumlu mekanizmalardan birinin sempatik sinir sistemi aktivasyonu olduğu görüşünü desteklemekte ve uzun süreli L-NNA uygulaması ile oluşan kalp hızı düşüşünün gelişen hipertansiyondan bağımsız olabileceğine işaret etmektedir. Sonuç olarak santral etkili bir antihipertansif ilaç olan klonidinin uzun süreli NOS inhibisyonu aracılı hipertansiyonun gelişimini doz bağımlı olarak önlediği bu çalışmada ilk kez gösterilmiştir. (*Anadolu Kardiyol Derg 2008; 8: 104-10*)

Anahtar kelimeler: Hipertansiyon, nitrik oksit, klonidin, sempatik aktivite, alfa adrenerjik reseptörler

ABSTRACT

Objective: Although there are some evidences on the contribution of increased sympathoadrenergic activity on long-term nitric oxide synthase (NOS) inhibition induced hypertension, the contribution of sympathetic activity to the development of this model of hypertension are not sufficiently studied. The aim of the present study is to investigate the effects of clonidine on blood pressure and vascular alpha-adrenergic receptors in the long-term N (omega)-nitro-L-arginine (L-NNA) treated rats.

Methods: Sixty two Wistar rats were randomly divided into 8 groups. All groups were administrated L-NNA and/or clonidine in two different concentrations for ten days. L-NNA was administrated in concentrations of 15 and 45 mg/100ml to L-NNA15 and L-NNA45 groups, respectively. Clonidine was also administrated in concentrations of 150 and 225 µg/100ml to KLO150 and KLO225 groups, respectively. Blood pressure and heart rates were measured with tail-cuff method and plasma NOx levels with spectrophotometer. The α-adrenoreceptors responses were evaluated in thoracic aorta rings in "in vitro" conditions.

Results: Clonidine prevented the L-NNA induced hypertension dose-dependently, but did not effect the heart rates decreased by L-NNA. The heart rates and blood pressure of normotensive rats were not changed by clonidine alone. Plasma NOx levels increased in L-NNA15 group (0.62±0.11 µmol/L, p=0.003) but did not change in other groups. The sensitivity of aorta to phenylephrine (-7.33±0.11 µmol/L, p=0.001) and clonidine (-7.60±0.27 µmol/L, p=0.003) in L-NNA45 group and phenylephrine (-6.94±0.13 µmol/L, p=0.002) in L-NNA15 group increased. The sensitivity of aorta to phenylephrine (7.93±0.16 µmol/L, p=0.001) in KLO225 group and to clonidine (-7.20±0.10 µmol/L, p=0.009) in KLO150 group increased.

Conclusion: This study supports the idea suggesting that sympathetic nervous system activation is partly responsible for the development of the long-term NOS inhibition induced hypertension. In conclusion, it was shown for the first time that clonidine prevents the development of long-term NOS inhibition induced hypertension dose-dependently. (*Anadolu Kardiyol Derg 2008; 8: 104-10*)

Key words: Hypertension, nitric oxide, clonidine, sympathetic activity, alpha adrenergic receptors

Giriş

Kronik nitrik oksit sentaz (NOS) inhibisyonu aracılı hipertansiyon modeli esansiyel hipertansiyon araştırmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Kronik NOS inhibisyonu aracılı hipertansiyona total periferik direnç artışının, artmış renal sodyum tutulumunun, sempatik sistem aktivasyonunun ve çeşitli endojen vazodilatör maddelerin katkısı olduğu ileri sürülmektedir (1, 2). Nitrik oksit sentaz inhibisyonu aracılı hipertansiyonda artmış vasküler α -adrenerjik reseptör duyarlılığının katkısına da işaret edilmektedir (3-5). Bu model hipertansiyonun gelişmesinde, sempatik sistem aktivasyonu üzerinde yoğun olarak çalışılmasına rağmen, özellikle plazma veya idrar katekolamin düzeylerinin arttığını (6), değişmediğini (7) veya azaldığını bildiren çelişkili sonuçlar mevcuttur (7, 8). Nitrik oksit sentaz inhibisyonu sonucu kan basıncında meydana gelen artışın sempatolitik bir ilaç olan fentolamin infüzyonu ve bir gangliyon blokörü olan pentolinium ile dikkate değer bir şekilde önlenmesi sempatik aktivite artışının bu model hipertansiyonda rol alan mekanizmaların önemlilerinden birisi olduğu izlenimini vermektedir: Bu antihipertansif maddeler aynı zamanda normotansif sıçanların bazal kan basıncını da düşürdüklerinden, antihipertansif tesirlerinin artmış bir sempatik aktiviteyi önlemelerinden kaynaklandığına dair yaklaşım yeterince ikna edici görünmemektedir (9, 10). Antihipertansif tesirin doz-bağımlı olması ve kontrol deneklerinde hipotansiyon oluşturmaması önemlidir. Bu model hipertansiyonun gelişimi birçok ilaç tarafından önlenmektedir (11-14). Bu model hipertansiyonun gelişmesinde, sempatik sinir sistemi aktivasyonunun katkısını değerlendirmek için, sempatik nöronal ateşleme üzerine direkt etkili bir antihipertansif ilacın etkinliği anlam ifade edecektir. Klonidin hem spontan hipertansif sıçanlarda, hem de diğer hipertansiyon modellerinde yapılan birçok çalışmada kan basıncını önemli derecede önlediği gösterilmiştir (15-18). Santral ve periferik sempatik sinir sistemi aktivitesini azaltarak kan basıncını düşürdüğü iyi bilinen klonidin, NOS inhibisyonu aracılı hipertansiyon üzerine etkileri bilinmemektedir (19). Bu çalışmada; uzun süreli N (omega)-nitro-L-arjinin (L-NNA) uygulamasıyla gelişen hipertansiyonda klonidin kan basıncı ve vasküler alfa-adrenerjik reseptörler üzerine etkilerini inceleyerek kronik NOS inhibisyonu aracılı hipertansiyon gelişimine sempatik sistemin katkısını belirlemek amaçlanmıştır.

Yöntemler

Denekler

Deneylerde yaklaşık 300g ağırlığında 62 adet erkek Wistar türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar dörtlü gruplar halinde özel kafeslere alınarak, standart şartlarda (12 saat günışığı, 12 saat karanlık, havalandırılmı, sabit ısı odalarda) bakıma alındılar. Yaklaşık 4 hafta sonra deneysel çalışmalara başlandı. Sıçanların beslenmesinde 8 mm'lik standart sıçan pellet yemi kullanıldı. Hayvanlar için içme suyu olarak musluk suyu verildi. Hayvanların istedikleri kadar yem yemelerine ve su içmelerine izin verildi. Deneklerin ağırlık artışları deney başlangıcında ve bitiminde elektronik tartı (Chyo MP-300 electronic balance, Chyo Balance Corp, Kyoto, Japan) ile ölçüldü.

Bu çalışmanın tüm prosedürleri ve çalışma protokolü üniversitemizin Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesine uygun olarak yapıldı.

Deneyel protokol

Yedi grupta 8 denek ve bir grupta 6 denek olacak şekilde toplam 8 grup oluşturuldu; Kontrol grubu (n=8): Sıçanlara deney süresince herhangi bir işlem yapılmadı. L-NNA₁₅ (n=8): Sıçanlara 10 gün süreyle içme suyunda 15mg/100ml L-NNA uygulandı. L-NNA₄₅ (n=8): Sıçanlara 10 gün süreyle içme suyunda 45mg/100ml L-NNA uygulandı. L-NNA₁₅+KLO₁₅₀ (n=8): Sıçanlara 10 gün süreyle içme suyunda 15mg/100ml L-NNA+150µg/100ml klonidin birlikte uygulandı. L-NNA₄₅+KLO₁₅₀ (n=8): Sıçanlara 10 gün süreyle içme suyunda 45mg/100ml L-NNA+150µg/100ml klonidin birlikte uygulandı. L-NNA₄₅+KLO₂₂₅ (n=8): Sıçanlara 10 gün süreyle içme suyunda 45mg/100ml L-NNA+225µg/100ml klonidin birlikte uygulandı. KLO₁₅₀ (n=8): Sıçanlara 10 gün süreyle içme suyunda 150µg/100ml klonidin uygulandı. KLO₂₂₅ (n=6): Sıçanlara 10 gün süreyle içme suyunda 225µg/100ml klonidin uygulandı. Grupların oluşturulması sırasında sıçanlar rastgele seçildi. Günlük olarak her gün tüm grupların tükettikleri içme suyu miktarları ölçüldü. Kontrol grubunun ilaçsız, diğer grupların ilaçlı içme suları her gün yenilenerek tazelenildi. Uygulanan konsantrasyonlara göre sıçanlara verilen günlük L-NNA ve klonidin miktarları hesaplandı.

Kan basıncı ve kalp hızı ölçümü

Sıçanların sistolik kan basıncı ve kalp hızı ölçümleri anestezi uygulanmadan kuyruktan indirekt "tail-cuff" yöntemi ile yapıldı (MAY BPHR 9610-PC Tail-Cuff Indirect Blood Pressure Recorder. Commat Ltd., Ankara, Türkiye). Sıçanların kan basıncı ve kalp hızı ölçümleri L-NNA uygulamaya başlamadan önce (0.gün) ve L-NNA uygulamaya başladıktan sonra 5. ve 10. günlerde ölçüldü. Her bir denek tek başına olarak muhafaza edici bir kutuya kondu ve sonra deneğin kuyruğuna tail-cuff cihazının cuff ve sensörü yerleştirildi. Sıçanların kuyrukları düzenli sinyal sesi ve pulse (atım) alana kadar 37-38 Co de 10-20 dakika süreyle ısıtıldı (MAY TWC 02 Tail Warming Controller. Commat Ltd., Ankara, Türkiye). Ölçümler sessiz ve sakin laboratuvar ortamında deneğin rahat ve sakin olduğu, düzenli sinyal sesinin alındığı anda yapıldı ve değerler bilgisayara kaydedildi. Sıçanlardan en az beşer ölçüm alınıp herbir sıçan için bu değerlerin ortalamaları hesaplandı.

Cerrahi uygulamalar

Deney sonunda denekler 1,2 g/kg i.p. üretan anestezisi ile uyutuldu. Hayvanlar tam olarak anesteziyeye girdikten sonra sırt üstü yatırılarak hızlı bir şekilde karın ve göğüs boşluğu orta hatan açıldı. Plazma NOx ölçümü için kalpten yaklaşık 2 ml kan örneği EDTA'lı tüplere alındı. Torasik aorta diafragmanın üzerinden başlayarak arkus aortaya kadar diseke edilerek hızlı bir şekilde çıkarıldı.

İzometrik ölçümler

Torasik aorta çıkarıldıktan sonra soğuk Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu içine alınarak çevre bağ ve destek dokularından dikkatlice temizlendi. Torasik aorta temizlendikten sonra abdominal aortaya yakın uçtan yaklaşık 4 mm boyunda halka halinde kesildi. Torasik aortadan elde edilen 4 mm boyundaki halkalar, lümeninden birbirine paralel iki paslanmaz çengel geçirilerek içerisinde 37°C'de ısıtılmış ve %95 O₂+%5 CO₂ karışımı ile gazlandırılan Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu bulunan 20 ml'lik izole organ banyosuna asıldı. Alt çengel izole organ banyosunun tutma kısmına tutturuldu, üst çengel ise izometrik kasılma cevaplarını kaydetmek için transdüsere (Grass FT 0.03 Force-Displacement Transducer) bağlandı. Kayıtlar poligraf ile yapıldı (Grass Model

79 Polygraph). Krebs-Ringer bikarbonat solusyonu pH=7.4 olacak şekilde (mmol/L) 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 10.1 Dekstroz, 2.5 CaCl₂·2H₂O, 1.2 MgSO₄·7H₂O içermektedir. İzole organ banyosuna asılan torasik aorta halkaları 2 gramlık optimal istirahat gerimi altında 1 saat boyunca dengelendi. İzole organ banyosunda metabolik son ürünlerin birikimini önlemek için banyodaki Krebs-Ringer bikarbonat solusyonu yaklaşık 15 dakika arayla tazeleni.

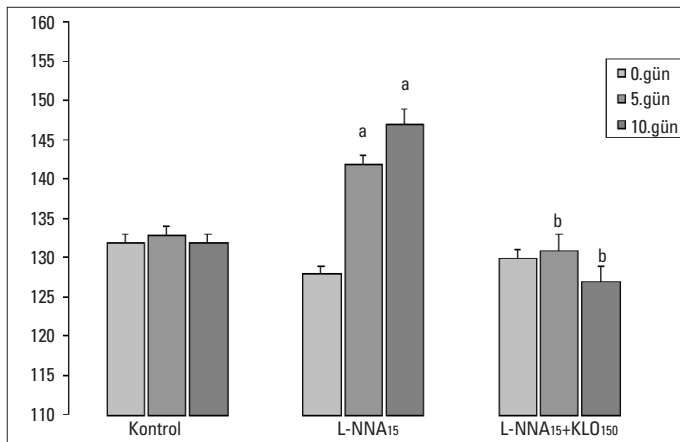
Sıçan torasik aorta halkaları dengelendikten sonra, tek doz fenilefrinle (10⁻⁷M) ön kasılma uygulanmış preparatlar asetilkolinle (10⁻⁶M) test edilerek endotel tabakasının sağlamlığı teyit edildi. Test işlemini takiben yıkama yapıp preparat dengelendikten sonra klonidin artan konsantrasyonlarda (10⁻⁹-10⁻⁵ M) banyoya uygulanarak konsantrasyon cevap eğrileri elde edildi. Yıkama yapıldı ve preparatlar dengelendikten sonra fenilefrin artan konsantrasyonlarda (10⁻⁹-10⁻⁴ M) banyoya uygulanarak konsantrasyon cevap eğrileri elde edildi.

Plazma NO_x ölçümü

Sıçanlardan alınan kan örneklerinin plazma NO_x konsantrasyonları daha önce laboratuvarımızda çalışılan Cortas ve Wakid'in bildirdiği yöntemle tespit edildi (20, 21). Kısaca özetlenirse, alınan kanlar EDTA'lı tüplere konularak 5000g'de santrifüj edildi. Plazmalar ayrılarak ölçüm yapılabilecek kadar -20 °C saklandı. Ölçümlerde kullanılan tüm çözeltiler titizlikle hazırlandı. Ölçüm sırasında plazmalardan 250 µl alınarak üzerine 1ml çinko sülfat çözeltisi eklenip vortekslendikten sonra 1,250 µl sodyum hidroksit çözeltisi ilave edildi. 3500g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra üstteki çözelti kısmı alınarak üzerine 2 ml distile su 1 ml glisin tamponu eklenerek yıkanmış kadmiyum granüllerinin üzerine eklendi. Doksan dakika boyunca karanlıkta inkübe edildikten sonra 2 ml indirgenmiş çözelti alınarak üzerine 1 ml sülfanilamid 1ml naftiletilediamin çözeltisi 0.5 ml distile su ilave edildi. Örnekler 20-60 dakika bekletildikten sonra 545 nm dalgaboyunda ölçüm yapıldı.

Kullanılan kimyasallar

Fenilefrin, asetilkolin, klonidin, L-NNA, N-(1-naphthyl)-etilen-diamin dihidroklorid, glisin hidroklorid, üretan (Sigma Aldrich Inc.St. Louis, MO, USA), sülfirikasit, hidroklorik asit, bakır sülfat pentahidrat, sodyum nitrit, sodyum hidroksit, sülfanil amid



Şekil 1. On gün boyunca düşük doz L-NNA ve/veya klonidin uygulanan sıçanların sistolik kan basıncı değerleri.

^aKontrol grubuna göre anlamlı olarak farklıdır (p<0.001).

^bL-NNA15 grubuna göre anlamlı olarak farklıdır (p<0.001).

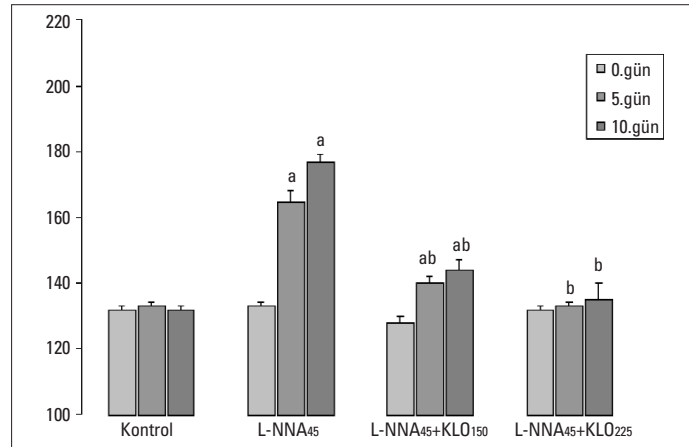
(Merck. KgaA, Germany), granül kadmiyum (Fluka Chemie, Steinheim, Switzerland), çinko sülfat heptahidrat (Carlo Erba, Milano, Italy) satın alındı.

İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler ortalama ± standart hata olarak belirlendi. EC₅₀ değerleri "Origin 5.0" istatistik programı ile değerlendirildi. Elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyleri "SPSS for Windows version 12" (Chicago, IL, USA) istatistik programı kullanılarak belirlendi. Kan basıncı verileri Student t testi, kalp hızı verileri ise nonparametrik Wilcoxon testi ile, *in vitro* veriler ve plazma NO_x düzeyi sonuçları da tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc Bonferroni testi ile değerlendirildi. p<0.05 değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

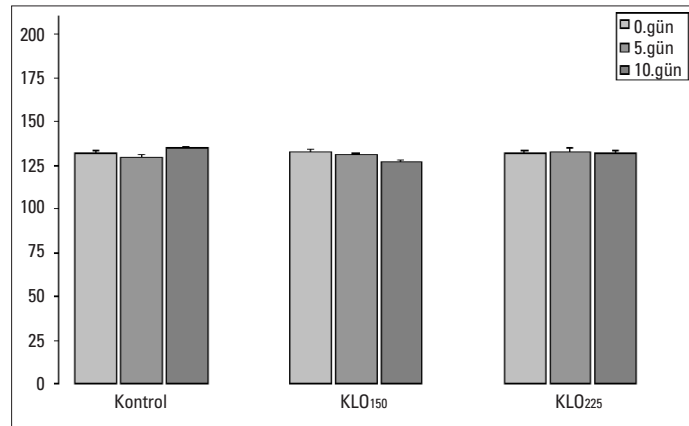
Hem düşük, hem de yüksek doz L-NNA alan sıçanlarda sistolik kan basıncı 5. ve 10. günlerde başlangıca göre progresif olarak arttı (Şekil 1, 2). Bununla birlikte beklediği gibi L-NNA₄₅ grubunda kan basıncındaki artış daha fazla oldu. L-NNA ile birlikte klonidin verildiğinde kan basıncı klonidin dozuna bağımlı olarak düştü. Tek başına klonidin uygulamasında ise her iki dozda da kan basın-



Şekil 2. On gün boyunca yüksek doz L-NNA ve/veya klonidin uygulanan sıçanların sistolik kan basıncı değerleri.

^aKontrol grubuna göre anlamlı olarak farklıdır (p<0.001).

^bL-NNA45 grubuna göre anlamlı olarak farklıdır (p<0.001).



Şekil 3. On gün boyunca düşük veya yüksek doz klonidin uygulanan sıçanların sistolik kan basıncı değerleri.

Gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur.

cında bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 3). Tek başına hem düşük, hem de yüksek doz L-NNA verilen grupların kalp hızında doz bağımlı olmayan, benzer oranda anlamlı bir düşme meydana geldi. Tek başına klonidin uygulamaları ise kalp hızını değiştirmede. Üstelik klonidin L-NNA uygulamaları sonucunda düşmüş olan kalp hızında da bir değişikliğe neden olmadı (Tablo 1).

İzole torasik aorta deneylerinde düşük doz L-NNA uygulanmış sıçanlarda fenilefrinin EC₅₀ değeri (p=0.002), yüksek doz L-NNA uygulanmış sıçanlarda ise hem fenilefrin (p=0.001), hem de klonidin (p=0,003) EC₅₀ değerleri düştü (Tablo 2). Hem düşük, hem de yüksek doz L-NNA ile birlikte düşük doz klonidin verilen gruplarda fenilefrinin EC₅₀ değerlerindeki bu azalma ortadan kalktı. Fakat yüksek doz L-NNA ve yüksek doz klonidin verilen grupta fenilefrinin EC₅₀ değeri düşük kalmaya devam etti (p=0.002). Tek başına düşük doz klonidin alan grupta klonidin EC₅₀ değerinde azalma olurken (p=0.009), yüksek doz klonidin verilen grupta ise fenilefrinin hem E_{max} (p=0.036), hem de EC₅₀ (p=0.001) değerinde bir azalma tespit edildi. Tüm gruplarda, KLO₂₂₅ grubu hariç, fenilefrinin ve klonidin E_{max} değerlerinde bir değişiklik olmadı. Sadece düşük doz L-NNA alan grupta plazma NO_x değerlerinde bir artma olurken diğer gruplarda ise herhangi bir değişiklik tespit edilmedi (Tablo 3).

Tartışma

Bu çalışmada klonidin L-NNA uygulaması ile oluşan hipertansiyonun gelişimini doz bağımlı olarak önlerken kalp hızında meydana gelen anlamlı düşüşü etkilemedi. Tek başına klonidin uygulanan normotansif sıçanların kan basıncı ve kalp hızında ise bir

değişiklik meydana gelmedi. Plazma NO_x seviyesi L-NNA₁₅ grubunda arttı, diğer gruplarda ise değişmedi. Aorta halkalarının "in vitro" deneylerde L-NNA₄₅ grubunda hem fenilefrine, hem de klonidine, L-NNA₁₅ grubunda ise yalnızca fenilefrine duyarlılığının arttığı belirlendi. KLO₁₅₀ grubunda aorta halkalarının klonidine, KLO₂₂₅ grubunda ise fenilefrine duyarlılığı arttı. Bu sonuçlar, klonidin L-NNA uygulamasıyla meydana gelen hipertansiyon gelişimini doz bağımlı bir şekilde önlemesi ve normotansif kontrol sıçanların kan basınçlarında bir değişiklik yapmaması, L-NNA uygulamasıyla gelişen hipertansiyondan sorumlu mekanizmalardan birisinin sempatik aktivite artışı olduğuna işaret etmektedir.

İzole torasik aortada, in vivo düşük doz klonidin uygulaması klonidin duyarlılığında bir artış yaparken, yüksek doz klonidin uygulaması fenilefrin duyarlılığında bir artışa ve fenilefrinin maksimum kasılma yanıtında bir azalmaya neden olmuştur. Klonidin parsiyel α₁-adrenerjik reseptör agonisti özelliği gösterdiği ve bu etkisinin doz bağımlı ortaya çıktığını ileri süren çalışmalar vardır (22). Bu çalışmada da yüksek doz klonidin uygulanan sıçanlarda maksimum fenilefrin yanıtının anlamlı olarak azalması parsiyel agonistik etkiyi düşündürmektedir. Düşük doz ve yüksek doz klonidin verilen sıçanlarda fenilefrinin EC₅₀ değerinde farklılığın nedeni yeterince açık olmamakla birlikte, fenilefrin duyarlılığındaki artışın klonidin sempatolitik etkinliğinin bir sonucu olabileceğine önceki çalışmalarda işaret edilmiştir (23-25). Klonidin tek başına normotansif kontrol grubu sıçanlarda hipotansiyon oluşturmaması, alfa-adrenerjik reseptör duyarlılıklarındaki bu değişikliklerden kaynaklanıyor olabilir.

On gün süreyle L-NNA uygulaması E_{max} değişikliği yapmaksızın α₁- ve α₂- adrenerjik reseptörlerde duyarlık artışı meydana

Tablo 1. Tüm grupların kalp hızı (vuru/dak) değerleri

Gruplar	0. Gün	10.gün	p 0.-10.gün
Kontrol n=8	317±5 316 (300-340)	315±5 315 (296-348)	AD
L-NNA ₁₅ n=8	328±8 325 (292-356)	281±6* 258 (252-306)	<0.01
L-NNA ₄₅ n=8	334±7 340 (304-372)	299±9 274 (268-352)	<0.05
L-NNA ₁₅ +KLO ₁₅₀ n=8	316±8 314 (284-350)	268±5* 280 (252-284)	<0.01
L-NNA ₄₅ +KLO ₁₅₀ n=8	332±6 334 (308-356)	280±4* 262 (262-294)	<0.001
L-NNA ₄₅ +KLO ₂₂₅ n=8	323±7 328 (288-352)	292±6 298 (272-360)	<0.01
KLO ₁₅₀ n=8	335±6 340 (304-360)	328±10 317 (300-372)	AD
KLO ₂₂₅ n=6	330±8 339 (300-368)	327±4 315 (300-368)	AD

Değerler Ortalama±Standart Hata ve Medyan (Maksimum-Minimum) olarak gösterilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar için nonparametrik Wilcoxon testi kullanılmıştır.

n: Her bir gruptaki sıçan sayısını göstermektedir.

*- p<0.01- Kontrole göre anlamlı olarak farklıdır.

AD- anlamlı değil, KLO- klonidin, L-NNA -N (omega)-nitro-L-arjinin

Gruplar: Kontrol, 10 gün boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı. L-NNA₁₅, 10 gün boyunca yaklaşık 15mg/100ml konsantrasyonunda L-NNA verildi. L-NNA₄₅, 10 gün boyunca yaklaşık 45mg/100ml konsantrasyonunda L-NNA verildi. L-NNA₁₅+KLO₁₅₀, 10 gün boyunca yaklaşık 15mg/100ml L-NNA+150µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi. L-NNA₄₅+KLO₁₅₀, 10 gün boyunca yaklaşık 45mg/100ml L-NNA+150 µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi. L-NNA₄₅+KLO₂₂₅, 10 gün boyunca yaklaşık 45mg/100 ml L-NNA + 225µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi. KLO₁₅₀, 10 gün boyunca yaklaşık 150µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi. KLO₂₂₅, 10 gün boyunca yaklaşık 225µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi

getirmektedir. Düşük doz L-NNA alan grupta torasik aortada α 1-adrenerjik reseptör duyarlılığı artarken, yüksek doz L-NNA alan grupta ise hem α 1-adrenerjik reseptör, hem de α 2-adrenerjik reseptör duyarlılığında artış tespit edilmiştir. Yüksek doz L-NNA uygulaması ile α 1-adrenerjik reseptöre ilaveten α 2-adrenerjik reseptöre de bir duyarlılık artışı söz konusudur. Bulgularımız yüksek doz NOS inhibitörü uygulanan (L-NAME 60 mg/kg/gün, 14 gün) sıçanların endoteliumu tahrip edilmiş torasik aorta halkalarında α 2-adrenerjik reseptör duyarlılığında bir artışın olduğunu gösteren çalışmayla uyumludur (3). Bu veriler NOS inhibisyonu aracılı hipertansiyondan vasküler yataklardaki vazokonstriksiyon artışının sorumlu olabileceği görüşünü de desteklemektedir (26).

Mevcut çalışmada L-NNA uygulanmasıyla gelişen hipertansiyonda kalp hızı anlamlı olarak düşmektedir. NOS inhibisyonu sonucu kalp hızında genellikle düşme meydana geldiği bildirilmektedir (27-30). Ancak klonidin uygulamasıyla kan basıncı normale dönmesine rağmen kalp hızı düşük kalmaya devam etmiştir. Kalp hızını kontrol eden sistemlerin kan basıncını düzenleyen sistemlere göre klonidine daha az duyarlı olduğuna işaret eden çalışmalar bu sonucu destekler niteliktedir (31, 32). Kalp hızının ve kan basıncının düzenlenmesinin kısmen birbirinden bağımsız olması da söz konusudur (22). Gerçekten de önceki çalışmamızda L-NNA dozu sıçanlara kademeli bir şekilde artırılarak uygulandığında kan basıncının yükselmesine rağmen kalp hızında bir düşüşün olmadığı gösterildi (33).

Bu çalışmada düşük doz L-NNA alan grupta plazma NOx seviyesi artarken, yüksek doz L-NNA alan grupta ise herhangi bir

değişiklik görülmemiştir. Yüksek doz L-NNA uygulamasıyla plazma NOx seviyesinin değişmemesinin nedeni yeterince açık değildir. Plazma NOx düzeyi ölçümünün NO aktivitesini yeterince yansıtmaması olasılığı söz konusu olabilir. Ancak bizim bulgularımızı destekleyen daha önceki çalışmalarda L-NNA benzeri non-spesifik bir NOS inhibitörü olan L-NAME sıçanlara yüksek dozlarda uygulandığında plazma NOx düzeylerinde bir değişiklik meydana gelmediği gösterilmiştir (34, 35). Düşük doz kronik L-NNA uygulamasıyla hipertansiyon oluşturulan sıçanların plazma NOx seviyesindeki artış, Moncada'nın "düşük doz NOS inhibitörü uygulandığında plazma NOx seviyesinin yükselmesinin nedeni artmış vazokonstriktör etkinliği kompanse etmek amacıyla daha fazla NO üretilmesidir" yorumuyla uyumludur (36).

Günümüzde klonidin kan basıncı ve damarlara etkileri üzerine çok sayıda mekanizma ileri sürülmüştür. Klonidin damarlarda NO-cGMP yolağının ve bazı potasyum kanal tiplerinin aktivitesini artırdığı, hatta prostaglandin salınımını etkileyerek vazodilatör etki gösterdiği bildirilmektedir (37, 38). Klonidin damarlar üzerindeki gevşetici etkisinin hem endotel bağımlı, hem de bağımsız mekanizmalarla meydana geldiğine işaret edilmektedir (39). Ayrıca uzun süreli klonidin uygulaması noradrenalin dışında dopamin, serotonin ve GABA nörotransmitter salınımında değişikliklere neden olabilmekte (40) ve klonidin, azalmış olan GABA sentezini artırarak hipertansiyonu geri döndürebilmektedir (41). Bu nedenle, klonidin L-NNA aracılı hipertansiyon gelişimini önlemede bu olumlu etkilerinin de olası katkıları dışlanamaz.

Tablo 2. Tüm gruplar için izole torasik aorta halkalarının EC₅₀ ve E_{max} değerleri

Gruplar	Fenilefrin		p** Fenilefrin EC ₅₀	Klonidin		p** Klonidin EC ₅₀
	E _{max} , g	EC ₅₀ (log)		E _{max} , g	EC ₅₀ (log)	
Kontrol n=6	1.54±0.08	-6.37±0.13		0.47±0.09	-6.40±0.15	
L-NNA ₁₅ n=8	1.31±0.13	-6.94±0.13	0.002	0.64±0.09	-6.79±0.15	AD
L-NNA ₄₅ n=5	1.46±0.18	-7.33±0.11	0.001	0.97±0.27	-7.60±0.27	0.003
L-NNA ₁₅ +KLO ₁₅₀ n=8	1.52±0.11	-6.54±0.22	AD	0.76±0.11	-6.35±0.13	AD
L-NNA ₄₅ +KLO ₁₅₀ n=7	1.46±0.18	-6.86±0.52	AD	Belirlenemedi	Belirlenemedi	-
L-NNA ₄₅ +KLO ₂₂₅ n=6	1.63±0.27	-7.33±0.24	0.001	0.78±0.13	-6.95±0.39	AD
KLO ₁₅₀ n=4	1.54±0.17	-6.98±0.11	AD	0.79±0.19	-7.20±0.10	0.009
KLO ₂₂₅ n=4	1.21±0.09	-7.93±0.16	0.001	0.21±0.04	-6.47±0.21	AD
F*	0.57	1.06		2.39	1.76	
p*	0.77	0.41		0.05	0.13	

Değerler Ortalama±Standart Hata olarak gösterilmiştir

*- one-way ANOVA testi F ve p değerleri

** - kontrol grubu ile karşılaştırmalar için post-hoc Bonferroni testi

AD - anlamlı değil, KLO - klonidin, L-NNA -N (omega)-nitro-L-arjinin

Gruplar: Kontrol, 10 gün boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı. L-NNA₁₅, 10 gün boyunca yaklaşık 15mg/100ml konsantrasyonunda L-NNA verildi. L-NNA₄₅, 10 gün boyunca yaklaşık 45mg/100ml konsantrasyonunda L-NNA verildi. L-NNA₁₅+KLO₁₅₀, 10 gün boyunca yaklaşık 15mg/100ml L-NNA+150µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi. L-NNA₄₅+KLO₁₅₀, 10 gün boyunca yaklaşık 45mg/100ml L-NNA + 150µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi. L-NNA₄₅+KLO₂₂₅, 10 gün boyunca yaklaşık 45mg/100 ml L-NNA + 225µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi. KLO₁₅₀, 10 gün boyunca yaklaşık 150µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi. KLO₂₂₅, 10 gün boyunca yaklaşık 225µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi

Tablo 3. Tüm grupların plazma NOx değerleri

Gruplar	Plazma NOx, µmol/L	p**
Kontrol n=7	0.25 ± 0.01	
L-NNA ₁₅ n=5	0.62 ± 0.11	0.003
L-NNA ₄₅ n=8	0.26 ± 0.03	AD
L-NNA ₁₅ +KLO ₁₅₀ n=8	0.45 ± 0.10	AD
L-NNA ₄₅ +KLO ₁₅₀ n=8	0.21 ± 0.01	AD
L-NNA ₄₅ +KLO ₂₂₅ n=8	0.22 ± 0.02	AD
KLO ₁₅₀ n=8	0.25 ± 0.01	AD
KLO ₂₂₅ n=6	0.34 ± 0.08	AD
F*	4.92	
p*	<0.05	

Değerler Ortalama±Standart Hata olarak gösterilmiştir.
* - one-way ANOVA testi F ve p değerleri
** - kontrol grubu ile karşılaştırmalar için post-hoc Bonferroni testi
AD- anlamlı değil, KLO- klonidin, L-NNA -N (omega)-nitro-L-arjinin, NOx- Nitrit/Nitrat
Gruplar: Kontrol, 10 gün boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı. L-NNA₁₅, 10 gün boyunca yaklaşık 15mg/100ml konsantrasyonunda L-NNA verildi. LNNA₄₅, 10 gün boyunca yaklaşık 45mg/100ml konsantrasyonunda L-NNA verildi. LNNA₁₅+KLO₁₅₀, 10 gün boyunca yaklaşık 15mg/100ml L-NNA+150µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi. LNNA₄₅+KLO₁₅₀, 10 gün boyunca yaklaşık 45mg/100ml L-NNA+150 µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi. LNNA₄₅+KLO₂₂₅, 10 gün boyunca yaklaşık 45mg/100 ml L-NNA + 225µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi. KLO₁₅₀, 10 gün boyunca yaklaşık 150µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi. KLO₂₂₅, 10 gün boyunca yaklaşık 225µg/100ml konsantrasyonunda klonidin verildi

Sonuçlar

Bu bulgular NOS inhibisyonu aracılı hipertansiyonun gelişiminden sorumlu mekanizmalardan birinin sempatik sinir sistemi aktivasyonu olduğu görüşünü desteklemekte ve uzun süreli L-NNA uygulaması ile oluşan kalp hızı düşüşünün gelişen hipertansiyondan bağımsız olabileceğine işaret etmektedir. Sonuç olarak klonidin uzun süreli NOS inhibisyonu aracılı hipertansiyonun gelişimini doz bağımlı olarak önlediği bu çalışmada ilk kez gösterilmiştir.

Kaynaklar

- Vapaatalo H, Mervaala E, Nurminen ML. Role of endothelium and nitric oxide in experimental hypertension. *Physiol Res* 2000; 49: 1-10.
- Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 1998; 32: 958-64.
- Kanagy NL. Increased vascular responsiveness to alpha 2-adrenergic stimulation during NOS inhibition-induced hypertension. *Am J Physiol* 1997; 273: H2756-64.
- Tuğrul İ. Sıçanlarda uzun süreli nitrik oksid sentaz (NOS) ve siklooksijenaz (COX) enzimlerinin birlikte inhibisyonu (ko-inhibisyon) sonucu kan basıncı ve alfa adrenerjik agonistlere karşı gelişen vasküler cevaplar. Elazığ, Fırat Üniv (Tez). 2002
- Mendizabal VE, Feleder EC, Adler-Graschinsky E. Effects of the chronic in vivo administration of L-NAME on the contractile responses of the rat perfused mesenteric bed. *J Auton Pharmacol* 1999; 19: 241-8.

- Yuasa S, Li X, Hitomi H, Hashimoto M, Fujioka H, Kiyomoto H, et al. Sodium sensitivity and sympathetic nervous system in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27: 18-24.
- Liu Y, Tsuchihashi T, Kagiya S, Matsumura K, Abe I, Fujishima M. Central and peripheral mechanisms involved in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *J Hypertens* 1998; 16: 1165-73.
- Aksulu HE, Bingol I, Karataş F, Sağmanlıgil H, Üstündag B. Changes in plasma angiotensin-converting enzyme activity and noradrenaline responses to long-term nitric oxide inhibition vary depending on their basal values in chickens. *Physiol Res* 2000; 49: 175-82.
- Zanchi A, Schaad NC, Osterheld MC, Grouzmann E, Nussberger J, Brunner HR, et al. Effects of chronic NO synthase inhibition in rats on renin-angiotensin system and sympathetic nervous system. *Am J Physiol* 1995; 268: H2267-73.
- Moriguchi S, Ohzuru N, Koga N, Honda K, Saito R, Takano Y, et al. Central administration of a nitric oxide synthase inhibitor causes pressor responses via the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system in Wistar rats. *Neurosci Lett* 1998; 245: 109-12.
- Deniz E, Şahna E, Aksulu HE. Nitric oxide synthase inhibition in rats: melatonin reduces blood pressure and ischemia/reperfusion-induced infarct size. *Scand Cardiovasc J* 2006; 40: 248-52.
- Takase H, Moreau P, Kung CF, Nava E, Luscher TF. Antihypertensive therapy prevents endothelial dysfunction in chronic nitric oxide deficiency. Effect of verapamil and trandolapril. *Hypertension* 1996; 27: 25-31.
- Kato M, Matsumoto A, Nakajima T, Hirose K, Iwasawa K, Takenaka K, et al. Amlodipine increases nitric oxide production in exhaled air during exercise in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 2004; 17: 729-33.
- Giles TD. Aspects of nitric oxide in health and disease: a focus on hypertension and cardiovascular disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2006; 8: 2-16.
- Smith LJ, Sussman AM, Serra M, Buccafusco JJ. Long term treatment with clonidine during the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1985; 47: 457-60.
- Ishii R, Naruse T, Tagawa T, Yamahata T, Dote S, Hamada K, et al. Antihypertensive effects of a new transdermal delivery system for clonidine (M-5041T) in spontaneously hypertensive rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1994; 327: 294-308.
- Jin HK, Yang RH, Wyss JM, Chen YF, Oparil S. Intrahypothalamic clonidine infusion prevents NaCl-sensitive hypertension. *Hypertension* 1991; 18: 224-9.
- Thomas L, Gasser B, Bousquet P, Monassier L. Hemodynamic and cardiac anti-hypertrophic actions of clonidine in Goldblatt one-kidney, one-clip rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41: 203-9.
- DeQuattro V, Li D. Sympatholytic therapy in primary hypertension: a user friendly role for the future. *J Hum Hypertens* 2002; 16 Suppl 1: S118-23.
- Yılmaz E. Sıçanlarda plazma nitrik oksit düzeylerinin ölçümü: Elektrokimyasal ve spektrofotometrik yöntemlerin karşılaştırılması. Elazığ, Fırat Üniversitesi, 2004.
- Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440-3.
- Pompermayer K, Salgado MC, Feldman J, Bousquet P. Cardiovascular effects of clonidine-like drugs in pithed rabbits. *Hypertension* 1999; 34: 1012-5.
- Guthrie GP Jr, Kotchen TA. Effects of prazosin and clonidine on sympathetic and baroreflex function in patients with essential hypertension. *J Clin Pharmacol* 1983; 23: 348-54.
- Davies IB, Sudera D, Sever PS. Endogenous agonist regulation of alpha-adrenoceptors in man. *Clin Sci (Lond)* 1981; 61 Suppl 7: 207s-10s.

25. Parlow JL, Sagnard P, Begou G, Viale JP, Quintin L. The effects of clonidine on sensitivity to phenylephrine and nitroprusside in patients with essential hypertension recovering from surgery. *Anesth Analg* 1999; 88: 1239-43.
26. Ramchandra R, Barrett CJ, Malpas SC. Nitric oxide and sympathetic nerve activity in the control of blood pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32: 440-6.
27. Dananberg J, Sider RS, Grekin RJ. Sustained hypertension induced by orally administered nitro-L-arginine. *Hypertension* 1993; 21: 359-63.
28. Hu L, Manning RD Jr, Brands MW. Long-term cardiovascular role of nitric oxide in conscious rats. *Hypertension* 1994; 23: 185-94.
29. Loichot C, Cazaubon C, Grima M, De Jong W, Nisato D, Imbs JL, et al. Vasopressin does not effect hypertension caused by long-term nitric oxide inhibition. *Hypertension* 2000; 35: 602-8.
30. Matsuoka H, Nishida H, Nomura G, Van Vliet BN, Toshima H. Hypertension induced by nitric oxide synthesis inhibition is renal nerve dependent. *Hypertension* 1994; 23: 971-5.
31. Jarrott B, Lewis SJ, Doyle AE, Louis WJ. Effects of continuous infusions (10 days) and cessation of infusions of clonidine and rilmenidine (S 3341) on cardiovascular and behavioral parameters of spontaneously hypertensive rats. *Am J Cardiol* 1988; 61: 39D-44D.
32. Kooner JS, Birch R, Frankel HL, Peart WS, Mathias CJ. Hemodynamic and neurohormonal effects of clonidine in patients with preganglionic and postganglionic sympathetic lesions. Evidence for a central sympatholytic action. *Circulation* 1991; 84: 75-83.
33. Oktar S YE, Şahna E, Aksulu HE. NOS Inhibisyonu Aracılı Hipertansiyon: Sıçanlarda Sabit ve Kademeli doz L-NNA Uygulamalarının Karşılaştırılması. *Firat Tıp Dergisi* 2007; 12: 251-5.
34. Eum HA, Yeom DH, Lee SM. Role of nitric oxide in the inhibition of liver cytochrome P450 during sepsis. *Nitric Oxide* 2006; 15: 423-31.
35. Chan CY, Huang SW, Wang TF, Lu RH, Lee FY, Chang FY, et al. Lack of detrimental effects of nitric oxide inhibition in bile duct-ligated rats with hepatic encephalopathy. *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 122-8.
36. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med* 1999; 92: 164-9.
37. Pimentel AM, Costa CA, Carvalho LC, Brandao RM, Rangel BM, Tano T, et al. The role of NO-cGMP pathway and potassium channels on the relaxation induced by clonidine in the rat mesenteric arterial bed. *Vascul Pharmacol* 2007; 46: 353-9.
38. Hermann D, Schlereth T, Vogt T, Birklein F. Clonidine induces nitric oxide- and prostaglandin-mediated vasodilation in healthy human skin. *J Appl Physiol* 2005; 99: 2266-70.
39. Molin JC, Bendhack LM. Clonidine induces rat aorta relaxation by nitric oxide-dependent and-independent mechanisms. *Vascul Pharmacol* 2004; 42: 1-6.
40. Iwasaki E, Takasugi Y, Koga Y. [Alteration of neurotransmitters in the cerebrospinal fluid in SHRSP rats due to long-term administration of clonidine]. *Masui* 2006; 55: 330-7.
41. Gozlińska B, Czyżewska-Szafran H. Clonidine action in spontaneously hypertensive rats (SHR) depends on the GABAergic system function. *Amino Acids* 1999; 17: 131-8.