

İzole Koyun Koroner Arterinde Estrojenin Etkileri

The Effects of Estrogen on Isolated Sheep Coronary Artery

Engin YILDIRIM, Kevser EROL

Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, ESKİŞEHİR

ÖZET: İnsanlarda en potent ve doğal estrojen, 17 β -estradioldür. 18 karbonlu bir steroiddir ve A halkası aromatik (fenolik) niteliktedir; 3 numaralı karbonunda bir -OH grubu ve 17 numaralı karbonunda bir β -OH grubu içerir. İki tip estrojen reseptörü tanımlanmıştır. Estrojen reseptör-alfa (ER- α) ve estrojen reseptör-beta (ER- β). Çalışmamızda izole koyun koroner arteri üzerinde estradiol propiyonat'ın gevşetici etkisini inceledik. Ayrıca bu etkinin damar endotelinin var olup olmamasına, cinsiyet farklılığına ya da uygulanan estrojenin konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterip göstermediğini araştırdık.

Çalışmada kullanılan gruplar; Grup 1: Erkek, endotelli grup, ; Grup 2: Dişi, endotelli grup, ; Grup 3: Erkek, endotelsiz grup, ; Grup 4: Dişi, endotelsiz grup.

İzole organ banyosunda koyun koroner arter halka preparatları öncelikle KCl (30mM) ile kasıldı. Kasılma sonucu plato düzeyi oluştuktan sonra estrojen kümülatif olarak (10^{-7} - 10^{-4} M) dozlarda uygulandı.

Çalışmamızda sonuç olarak, estradiol propiyonat'ın izole koyun koroner arteri üzerinde genel olarak gevşeme yapıcı etkileri olduğunu gözledik. Oluşan bu etkinin genel anlamda, endotelli gruplarda endotelsiz gruplardan ve de dişi gruplarda erkek gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğunu gözlemledik. Gerek erkek, gerek dişi endotelli gruplarda gevşeme cevaplarının doza bağlı olarak artış gösterdiğini izledik.

Anahtar Kelimeler: Estrojen, koroner arter, koyun

ABSTRACT: The most potent naturally occurring estrogen in human beings is 17 β -estradiol. It is an 18 carbon steroid, containing a phenolic A ring with a hydroxyl group at carbon 3 and a β -OH group in position 17 carbon. Two estrogen receptors have been identified. Estrogen receptor -alpha (ER- α) and estrogen receptor-beta (ER- β).

We evaluated the relaxing effect of estradiol propionate on isolated sheep coronary artery in the present study. We also studied whether the relaxing effect of estradiol was altered in the presence of endothelium or it changed in accordance to gender or the concentration of estradiol that we used.

The groups we used in this study were; Group 1: Male, with endothelium, ; Group 2: Female, with endothelium, ; Group 3: Male, with no endothelium, ; Group 4: Female, with no endothelium.

In isolated organ bath, sheep coronary arterial rings were precontracted by KCl (30 mM). After plateau contraction levels were reached with KCl, increasing concentrations of estradiol propionate (10^{-7} - 10^{-4} M) were added in a cumulative manner.

In conclusion, estradiol propionate caused a relaxation on isolated sheep coronary artery. Generally, relaxations to estrogen in both male and female with endothelium groups, were more significantly than those of groups with no endothelium. In female groups the relaxations to estrogen, were more significantly than that of male groups. And both in male and female with endothelium groups relaxations to estrogen increased dose-dependently.

Key Words: Estrogen, coronary artery, sheep

GİRİŞ ve AMAÇ

Kalp hastalıkları riski erkeklerde yaşla birlikte artarken, premenopozal kadınlarda risk düşüktür. Fakat menopozdan sonra risk kendi yaş grubundaki erkeklerle karşılaştırılabilecek kadar hızla artar (3-8). Postmenopozal dönemde estrojen replasman tedavisi alan kadınlarda kardiyovasküler mortalite,

almayan kadınlara göre %30-50 daha azdır. Bu epidemiyolojik verilere dayanarak estrojenin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olduğu söylenebilir (3,6,8-11,12). Estrojenin etki mekanizması ile ilgili yapılan araştırmalar, estrojenin kardiyovasküler koruyucu etkilerinin, lipid profilindeki antiaterojenik etkisine ve arter duvarına ve endotele olan direkt etkisine bağlı olduğunu göstermiştir (3,7,11,13,14-19).

Çalışmamızın amacı, daha önce yapılmış olan çalışmalarda çeşitli damarlar üzerinde farklı mekanizmalarla değişik etkiler oluşturduğu düşünülen estradiol propiyonat'ın, izole koyun koroner arteri üzerindeki etkilerini ve etki mekanizmalarını araş-

tırmaktı. Ayrıca bu etkiler üzerinde, endotelin var olup olmamasının, cinsiyet farklılığının ve uygulanan hormonun konsantrasyonunun farklı sonuçlara neden olup olmadığını değerlendirmekti.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada mezbahadan elde edilen 6 ay-1 yaş arasındaki Akkaraman cinsi koyunlardan elde edilen koroner arterler kullanıldı. Materyalin mezbahadan günlük olarak, modifiye Krebs' solusyonu içine konularak transportu sağlandı.

Mezbahadan alınan koyun kalbi soğuk modifiye Krebs' solusyonu (NaCl: 118.3mM, KCl: 4.7 mM, MgSO₄.7H₂O: 1.2 mM, CaCl₂: 2.5 mM, K₂HPO₄: 1.2 mM, D(+)-Glukoz monohidrat: 11.1 mM) içine konularak kısa sürede laboratuvara getirildi. Öncelikle koyun kalbi alınarak epikardiyal sol koroner arter diseke edildi ve daha sonra diseke edilen kısım bağ dokusundan temizlendi. Elde edilen materyalden 0.2- 0.3 cm boyunda halka preparatlar hazırlandı. Endotelsiz çalışılan preparatlarda endotel, tahta bir çubuk ile nazikçe damar iç kısmına sürterek uzaklaştırıldı. İki paslanmaz çelik tel birbirine paralel olacak şekilde damar iç yüzünden endotel ile temas ettirilmeden geçirildi ve 10 ml modifiye Krebs solusyonu içeren organ banyosuna asıldı. Organ banyosu 37 °C sıcaklıkta tutuldu ve % 95 O₂ ve % 5 CO₂ ile havalandırıldı. Dişi ve erkek koyunlardan elde edilen endotelli veya endotelsiz preparatlar stabilizasyonu için 1 g. gerginlikte 15 dakika aralarla yıkanarak 60 dakika bekletilerek stabilize olması sağlandı.

Preparatların stabilizasyonu sağlandıktan sonra endotelli veya endotelsiz halkalar öncelikle KCl (30 mM) ile kasıldı. KCl ile maksimum kasılma elde edildikten sonra bu değer kaydedildi ve daha sonra estrogen, 10⁻⁷- 10⁻⁴, dozları arasında kümülatif olarak uygulandı. Bir yüksek doz, bir önceki doz verilmesiyle plato oluştuktan sonra uygulandı (2.5 – 5 dakika). Ve bu konsantrasyona bağlı cevaplar kaydedildi.

Estrojen, 1/5 dimetilsulfoksit (DMSO) + 4/5 distile su karışımından oluşan solusyonda çözüldü. Her bir grup için 1/5 dimetilsulfoksit + 4/5 distile su ile kontrol çalışması yapıldı. Değerler % gevşeme olarak hesaplandı ve bu değerlerden 1/5 dimetilsulfoksit + 4/5 distile su ile elde edilen değerlerin % gevşeme değerleri çıkartıldı.

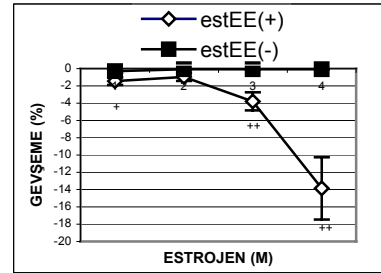
Tüm sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi. Elde edilen değerler Student's *t*-testi uygulanarak değerlendirildi. P<0.05 farklı kabul edildi.

BULGULAR

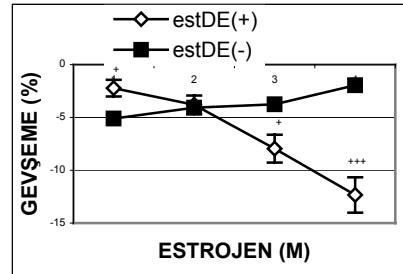
Çalışmada estradiol propiyonat'ın izole organ sisteminde 10⁻⁷-10⁻⁴ M konsantrasyonlarda KCl ile kasılma oluşturulan erkek ve dişi koyun koroner arterlerinde gerek endotelli gerekse endotelsiz preparatlar üzerindeki gevşeme yapıcı etkileri değerlendirildi.

Gevşeme cevapları değerlendirildiğinde estrogen, endotelli erkek grupta, 10⁻⁷ ve 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M konsantrasyonlarda endotelsiz erkek gruba göre anlamlı derecede gevşemeye neden olurken, dişi grupta, 10⁻⁷ M konsantrasyonda endotelsiz grupta endotelli gruba göre, 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M konsantrasyonlarda ise endotelli grupta endotelsiz gruba göre anlamlı derecede gevşemeye neden olduğu gözlemlendi (Şekil 1 ve 2).

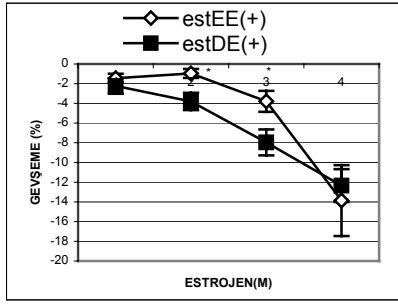
Endotelli gruplardaki gevşeme cevapları değerlendirildiğinde, estrogenin dişi grupta 10⁻⁶ ve 10⁻⁵ M konsantrasyonlarda, erkek gruba göre anlamlı derecede gevşemeye neden olduğu gözlemlenirken, endotelsiz dişi grupta 10⁻⁷, 10⁻⁶ ve 10⁻⁵ M konsantrasyonlarda, endotelsiz erkek gruba göre anlamlı derecede gevşemeye neden olduğu gözlemlendi (Şekil 3 ve 4).



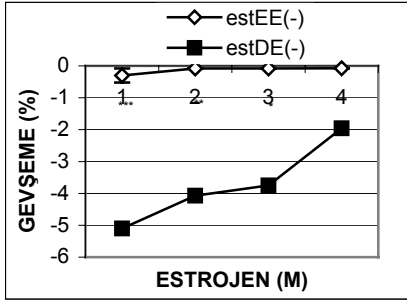
Şekil 1: İzole erkek endotelli ve endotelsiz koyun koroner arterinde estrogen ile oluşturulan gevşeme cevapları. EstEE(+): Estrojen erkek endotelli, estEE(-): Estrojen erkek endotelsiz. + p<0.05; ++ p<0.01; +++ p<0.001.



Şekil 2: İzole dişi endotelli ve endotelsiz koyun koroner arterinde estrogen ile oluşturulan gevşeme cevapları. EstDE(+): Estrojen dişi endotelli, estDE(-): Estrojen dişi endotelsiz. + p<0.05; ++ p<0.01; +++ p<0.001.



Şekil 3: İzole endotelli koyun koroner arterinde, erkek ve dişi gruplarda estrogen ile oluşturulan gevşeme cevapları. EstEE(+): Estrojen erkek endotelli, estDE(+): Estrojen dişi endotelli. * p<0.05.



Şekil 4: İzole endotelsiz koyun koroner arterinde, erkek ve dişi gruplarda estrogen ile oluşturulan gevşeme cevapları. EstEE(-): Estrojen erkek endotelsiz, estDE(-): Estrojen dişi endotelsiz. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

TARTIŞMA

Estrojenin gerek in vivo gerekse in vitro çalışmalarda kardiyovasküler sistemde iki farklı mekanizma ile etki gösterdikleri bildirilmiştir. Birinci mekanizma; vasküler endotelden nitrik oksit salgılanması (3,5-8,11,14,15,17,18,20-26). İkinci mekanizma ise vasküler düz kaslar üzerine etki gösterecek; a) Dışa yönelik potasyum akımının artması aracılığı ile oluşan vasküler düz kaslarda meydana gelen hiperpolarizasyon b) L- tipi kalsiyum kanallarından kalsiyum girişinin kompetitif inhibisyonu (3, 5-8,10,11,14,16,17,19,22,24,26).

Değişik damar preparatları üzerinde yapılan gerek in vivo gerekse in vitro çalışmalarda estrojenin gevşeme cevapları açısından endotelli ve endotelsiz damarlarda benzerlik gösterdiği, koroner arterler üzerindeki akut gevşeme yapıcı etkilerinin NO (nitrik oksit) ve endotelden bağımsız olduğu, düz kas hücre membranı üzerine direkt etkisine bağlı olarak geliştiği belirtilmektedir (5,6,10,11,16,21,26). Estrojenin direkt vasküler etki göstermesi veya indirekt olarak

endotelden NO salgılanmasına neden olması uygulanan estrojenin dozuna bağlı olarak değişmektedir (7,8,15,16,17,20,22,23). NO dokularda ve oksijenlenmiş fizyolojik sıvılarda çabuk yıkılır. Dokularda eliminasyon yarılanma ömrü 6-50 saniye arasında bulunmuştur (27).

Yapılan diğer bazı çalışmalarda ise estrojenin dişilerde erkeklere oranla gevşeme cevapları açısından daha fazla etkili olduğu bulunmuştur (8,10,13,20,28). Bunun nedenleri arasında estrojen reseptör dağılımının ve yoğunluğunun dişilerde daha fazla olması yer alır (10,28). Estrojenin etkisi açısından dişilerde reseptör dağılımı önemlidir. Uterin arterler üzerinde yapılan bir çalışma ise estrojenin etkisinin, damarın menstrüel fazın hangi döneminde alındığına bağlı olarak değiştiğini bildirmektedir (7,29). Kardiyovasküler sistem üzerinde estrojenin kısa süreli ve uzun süreli etkilerine aracılık eden farklı reseptörlerin olduğu düşünülmektedir (18,22,30). Estrojenin etkilerinin farklı cinslerde, farklı damarlarda, farklı uygulama sürelerine ve farklı konsantrasyonlara bağlı olarak değiştiğini bildiren çalışmalar da vardır (6,10,15,16,17,19). Estrojenin direkt vasküler etki göstermesi ya da indirekt olarak endotelden NO salgılanmasına neden olması estrojenin dozuna bağlı olarak değişiklik gösterir (7,8,15,16,17,20,22,23,30). İzole aortik halkalarda yüksek konsantrasyonlarda 17β-estradiol'ün aortik ve koroner düz kaslarda oluşturduğu direkt gevşeme cevaplarının NO oluşumundan bağımsız olduğu gösterilmiştir (22). İnsan koroner arter düz kas hücrelerinde estrojen reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir (31). NO gevşeme cevabından tamamen olmamakla birlikte önemli derecede sorumludur. Pek çok deneysel çalışmada endotelin uzaklaştırılması gevşeme cevaplarını azaltmasına rağmen yine de gevşeme cevabı gözlenmiştir (15-16,32). EDRF veya NO endotel ve diğer pek çok hücre tiplerinde L-arginin' den NOS (nitrik oksit sentaz) enzimi aracılığıyla sentezlenir. Endotelden NO salgılanmasına neden olan pek çok ajan aynı zamanda hem endotel hemde düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyona neden olmaktadır (26). NO sentezinin NOS yolağından başka bir yolla da sentez edilebilir (33). Minami ve Toda 5-lipooksijenazın katalizi ile de NO oluşabileceğini bildirmişlerdir (34).

Bütün bu bilgilerin ışığı altında yaptığımız çalışmanın sonuçlarını değerlendirecek olursak;

Gerek dişi gerekse erkek, endotelli izole koroner arter halkalarında estrojen uygulaması ile elde ettiğimiz gevşeme cevaplarının endotelsiz halkalardan daha fazla olduğu gözlenmiştir. Estrojenin koroner arterler üzerinde iki farklı mekanizma ile

etki göstermektedir. Endotelsiz halkalarda NO ve diğer gevşetici faktörlerin (prostasiklin, endotelden derive olan hiperpolarize edici faktör) üretimi olmayacağı için gevşeme cevapları endotelli preparatlardan daha az olmuştur. Bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla uyum göstermektedir (3,5-8,10,11,15-17,22,23,25,26).

Endotelli gruplardaki gevşeme cevapları değerlendirildiğinde, estrogenin dışı grupta 10^{-6} ve 10^{-5} M konsantrasyonlarda erkek gruba göre anlamlı derecede gevşemeye neden olduğu gözlenirken (Şekil 3), endotelsiz dışı grupta 10^{-7} , 10^{-6} ve 10^{-5} M konsantrasyonlarda endotelsiz erkek gruba göre anlamlı derecede gevşemeye neden olduğu gözlemlendi (Şekil 4).

Çalışmamızda kullanılan preparatları alırken hayvanın menstrüel siklusu göz önünde bulundurulmamıştır. Bizim elde ettiğimiz bu sonuçlar gerek estrogenin dışilerde erkeklere oranla gevşeme cevapları açısından daha fazla etkili olduğu, gerek estrogen reseptör dağılımı ve yoğunluğunun erkeklere oranlarda dışilerde daha fazla olduğu ve gerekse estrogenin etkisinin dışilerde damarın menstrüel siklusun hangi fazında alındığına bağlı olarak değiştiğini bildiren daha önceki çalışmalarla uyum göstermektedir (7,8,10,13,20,28,29).

KAYNAKLAR

1. Kayaalp S O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. II. Cilt, 9. baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti, 2000; 1379-1392.
2. Speroff L. A clinical understanding of the estrogen receptor. Ann N Y Acad Sci, 2000; 26-39.
3. Jovanovic A, Jovanovic S. Estrogen and vascular system: more questions for the future. Cardiovasc Res, 1999; 42: 9-11.
4. Stefano G B, Prevot V, Beavullian J D. Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. Circulation, 2000; 4: 1594-1597.
5. Yang S, Bae L, Zhang L. Estrogen increases eNOS and NOx release in human coronary artery endothelium. J Cardiovasc Pharmacol, 2000; 36: 242-247.
6. Otter D, Austin C. Effects of 17 β - oestradiol on rat isolated coronary and mesenteric artery tone: involvement of nitric oxide. J Pharm Pharmacol, 1998; 50: 531-538.
7. Teoh H, Leung S W S, Man R Y K. Short -term exposure to physiological levels of 17 β -estradiol enhances endothelium-independent relaxation in porcine coronary artery. Cardiovasc Res, 1999; 42: 224-231.
8. Thompson L P, Weiner C P. Long-term estradiol replacement decreases contractility of guinea pig coronary arteries to the thromboxane mimetic U46619. Circulation, 1997; 95 (3): 709-714.
9. Nagao T, Fujishima M, Vanhoutte P M. Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. Baylor College of medicine, Houston, Texas, U.S.A., Kyushu University, Fkuoka, Japan, 342P.
10. Mugge A, Riedel M, Barton M, et al. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 β -oestradiol in vitro. Cardiovasc Res, 1993; 27: 1939-1942.
11. Collins P, Shay J, Jiang C, et al. Nitric oxide accounts for dose-dependent estrogen-mediated coronary relaxation after acute estrogen withdrawal. Circulation, 1994; 90(4): 1964-1968.
12. Ganz P. Vasomotor and vascular effects of hormone replacement therapy. Am J Cardiol, 2002; 3; 90(1A):11F-16F.
13. Hayashi T, Yamada K, Esaki T. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. Biochem Biophys Res Commun, 1995; 25; 214(3): 847-855.
14. Li HF, Li W, Zheng TZ, et al. A study of the mechanisms involved in relaxation induced by 17-beta-estradiol in the isolated rabbit aorta. Arch Gynecol Obstet, 2002; 266(2):101-4.
15. Chan HY, Yao X, Tsang SY, et al. Different role of endothelium/nitric oxide in 17beta-estradiol- and progesterone-induced relaxation in rat arteries. Life Sci, 2001; 24; 69(14):1609-17.
16. Salom JB, Burguete MC, Perez-Asensio FJ, et al. Acute relaxant effects of 17-beta-estradiol through non-genomic mechanisms in rabbit carotid artery. Steroids, 2002; 67(5): 339-46.
17. Abou-Mohamed G, Elmarakby A, Carrier GO, et al. Estradiol relaxes rat aorta via endothelium-dependent and -independent mechanisms. Pharmacology, 2003; 69(1): 20-6.
18. Lau YT. Receptor-dependent and genomic-independent actions of estrogen in vascular protection. Chang Gung Med J, 2002; 25(10): 636-44.
19. Salom JB, Burguete MC, Perez-Asensio FJ, et al. Relaxant effects of 17-beta-estradiol in cerebral arteries through Ca(2+) entry inhibition. J Cereb Blood Flow Metab, 2001; 21(4): 422-9.
20. Bell D R, Rensberger H J, Koritnik D R, et al. Estrogen pretreatment directly potentiates endothelium-dependent vasorelaxation of porcine coronary arteries. Am J Physiol, 1995; 268: H377-H383.

21. Fernandez N, Sanchez M A, Martinez M A, et al. Role of nitric oxide in vascular tone and reactivity to isoproterenol and adenosine in the goat coronary circulation. *Eur J Pharmacol*, 2000; 387: 93-99.
22. Lianmin M A, Casey P R, Udho T, et al. Effect of 17- β Estradiol in the rabbit. Endothelium-Dependent and -Independent mechanisms of vascular relaxation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1997; 30: 130-135.
23. Teoh H, Quan A, Leung Susan W S, et al. Differential effects of 17 β -estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol*, 2000; 129: 1301-1308.
24. Gisclard V, Miller V M, Vanhoutte P M. Effect of 17 β -estradiol on endothelium-dependent responses in rabbit. *J Pharmacol Exp Ther*, 1987; 244 (1): 19-22.
25. Schulze S K, McGowan K A, Hubchak S C, et al. Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. *Circulation*, 1996; 94 (6): 1402-1407.
26. Kilpatrick E V, Cocks T M. Evidence of differential role of nitric oxide (NO) and hyperpolarization in endothelium-dependent relaxation of pig isolated coronary artery. *Br J Pharmacol*, 1996; 112: 557-565.
27. Kayaalp S O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. II. Cilt, 9. baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti, 2000; 1534.
28. Collins P, Rosano G M.C, Sarrel P M , et al. 17 β -estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation*, 1995; 92 (1): 24-30.
29. Nelson S H, Steinsland O S, Wang Y, et al. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ Res*, 2000; 406-411.
30. Montgomery S, Shaw L, Pantelides N, et al. Acute effects of oestrogen receptor subtype-specific agonists on vascular contractility. *Br J Pharmacol*, 2003; 139(7):1249-53.
31. Nelson S H, Steinsland O S, Wang Y, et al. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ Res*, 2000; 87: 406-411.
32. Vequaud P, Pourageaud F, Freslon J L. Role of nitric oxide and endothelium in the flow-induced dilation of rat coronary arteries under two precontraction conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1999; 26: 470-476.
33. Matsumoto T, Kinoshita M, Toda N. Mechanisms of endothelium-dependent responses to vasoactive agents in isolated porcine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993; 22: 228-234.
34. Minami Y, Toda N. Possible involvement of 5-lipoxygenase products in the generation of endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989; 250: 1055-60.

