

Sıçan Uterusunda Purinerjik P₂ Reseptörler

PURINERGIC P₂ RECEPTORS IN THE RAT UTERUS

Selma ALAKUŞ, Yüksel KESİM, Süleyman ÇELİK, Mehmet KURT

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji ABD, Samsun

ÖZET

Amaç: İzole sıçan uterusunda purinerjik P₂ reseptörü ve purinerjik uyarı hakkında fikir edinmektir.

Çalışmanın Yapıldığı Yer: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD

Materyal ve Metod: Deneylerde 20 dişi sıçanın her iki kornusu kullanıldı, izole organ banyosuna tesbit edilen her iki prepereta agonist olarak ATP (1-100 uM) verilerek doz-cevap eğrisi elde edildi. Antagonist suramin (1-100 uM), ATP'den 5 dakika önce verildi. Ayrıca preparatlar, paralel platin elektrotlarla (30 volt; 1 m sec; 4-8 Hz de 10 s) devamlı elektriksel uyarılara maruz bırakılıp bu duruma suraminin etkisi incelendi. Diğer taraftan izole sıçan uterusunda asetilkolin (1 pM)'in kasıcı ve adrenalin (10 xM)'in gevşetici etkisi, suramin (100 pM) mevcudiyetinde incelendi.

Bulgular: A TP'nin izole sıçan uterusunda meydana getirdiği kontraksiyon, purinerjik P₂ reseptör antagonisti suramin tarafından inhibe edildi. Suramin, sıçan uterusunun elektrik/uyarılar cevabını azalttı. Diğer taraftan suramin, sıçan uterusunda asetilkolinin kasıcı ve noradrenalinin gevşetici etkisini değiştirdi.

Sonuç: İzole sıçan uterusunda P₂ reseptör antagonisti suraminin 70 uM ve üzeri konsantrasyonlarda ATP'nin kasıcı etkisini non kompetitif olarak antagonize etmesi bu organda purinerjik P₂ reseptörlerinin var olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sıçan, Uterus, Purinerjik reseptör, Suramin

T Klin Jinekoloj Obst 1994, 4:264-267

Purinerjik sistem hipotezi, Burnstock (1) tarafından 1972'de ortaya atıldıktan sonra, bu non-adrenerjik non-

Geliş Tarihi: 13.07.1993

Kabul Tarihi: 18.11.1994

Yazışma Adresi: Yüksel KESİM

Ondokuz Mayıs Üniv. Tıp Fak. Farmakoloji
ABD Öğretim Üyesi 55139 SAMSUN

Araştırma XI. Ulusal Farmakoloji Kongresinde tebliğ edilmiştir. 4-8 Kasım 1992, Dedeman Oteli/Nevşehir

264

SUMMARY

Objective: The present study was designed to provide some information about purinerjik P₂ - purinoceptors and purinerjik nerves in the rat uterus.

Institution: Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Ondokuz Mayıs, Samsun

Materials and Methods: Female rats (n=20) were used.

The both uterine horn was removed and suspended in a organ bath. Concentration-response curves for ATP (1-100 uM) as agonist was obtained. Suramin (1-100 uM) was added at least 5 min before the ATP were applied into the bath as antagonist. Electrical field stimulation was applied at frequency of 4-8 Hz with a pulse width of 1 m sec until it reached maximum contraction. On the other hand, acetylcholine (10 uM) and noradrenaline (10 uM) were used as control contractile and relaxant agents in the presence of suramin (100 pM) respectively.

Results: In isolated rat uterus, ATP caused contraction depended contractions. Suramin, a P₂-purinoceptor antagonists, antagonised contractile responses to ATP and decreased responses to electrical stimulation. Suramin did not effect contractile responses to acetylcholine or relaxant responses to noradrenaline in isolated rat uterus.

Conclusion: Suramin at concentrations above 10 pM caused a non-competitive antagonism of responses to ATP in isolated rat uterus. Thus, suramin blocked actions of ATP mediated via P₂-purinoceptors. Therefore purinerjik P₂ receptors may be present in the rat uterus.

Key Words: Rat, Uterus, Purinerjik receptors, Suramin

Anatolian J Gynecol Obst 1994, 4:264-267

kolinerjik sistem, bir çok araştırmacının ilgi odağı haline gelmiştir. Purinerjik sinirler periferde uterus dahil çeşitli bölgelerde ve santral sinir sisteminde bulunurlar (2). Purinerjik sinir uçlarından salınan purin bileşiklerinin (adenozin ve ATP)(3) iç organların çalışmasına katkıda bulunduğu sanılmaktadır (4).

Çalışmamızda, izole sıçan uterusunda purinerjik uyarı ve purinerjik reseptörlerden birisi hakkında fikir edinmeyi amaçladık. Bu maksatla, purinoreseptör çalışmalarında tercih edilen bir ilaç olan suramin ve onun

T Klin Jinekoloj Obst 1994, 4

Yir çok dokuda etkisini antagonize ettiği ATP'nin (5,6) jterusa etkisini iziedik.

MATERYAL VE METOO

Çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalında yapıldı. Deneylerde, ağırlıkları 116-241 gr arasında değişen toplam 20 sıçanın her iki kornusu kullanıldı. Sıçanlara, deneye başlamadan 24 saat önce estradiol benzoat (0.5 mg/kg) verildi. Servikal darbe ile öldürülen sıçanların uterus konularından alınan 1.5 cm'lik şeritler, içinde kreps solüsyonu (NaCl 6.9 gr NaHCO₃ 2.9 gr; KCl 0.35 gr; CaCl₂ 0.28 gr; MgSO₄ 0.14 gr; KH₂ PO₄ 0.1 gr; Glukoz 1.09 gr) bulunan 60 ml'lik izole organ banyosu rezervuarlarına tespit edildi. Banyo ısı, 29-31 °C de sabit tutulup %95 Oz+%5 CO₂ karışımı ile sürekli temasta bırakılıp pH 7-7.5 da muhafaza edildi. Preparatların stabil hale gelmesi için 30 dakika beklendi. Cevaplar. 1 g gerilim altında osilograftan kayıt edildi.

Taşiflaksiden kaçınmak için agonist (ATP) uygulamaları arasında 30 dakikalık ara bırakıldı, ilaç uygulamaları arasında doku 10 kez yıkandı. Suramin çalışmalarında solüsyona nonspesifik peptidaz inhibitörü Basitiasin (2000 mi"") ilave edildi. Böylece suraminin peptid bağlarının parçalanması önlenildi. Antagonist (suramin) ATP'den 5 dakika önce verildi. Elektriksel uyarılar paralel platin elektrotlarla 30 volt 1 msec 4-8 Hz'de 10 sn devamlı yapıldı. Platin elektrotlardan birisi doku diğeri sıvı ile temasdaydı.

Değerlendirme, uterus hareketinin amplitüdü ve bazı durumlarda hem amplitüd hem de frekansı üzerinden yapıldı. Suramin (1-10-100 pM ve 1 uM) mevcudiyetinde I. grupta ATP'ye II. grupta elektriksel uyarılara cevaplar tayin edildi. III. grupta izole sıçan uterusunda asetilkolin'in (10 uM) kasıcı ve noradrenalin'in (10 uM) gevşetici etkisi, suramin (100 uM) mevcudiyetinde izlendi. Sonuçlar student t testi (paired t testi)'ne göre istatistiksel analize tabi tutuldu.

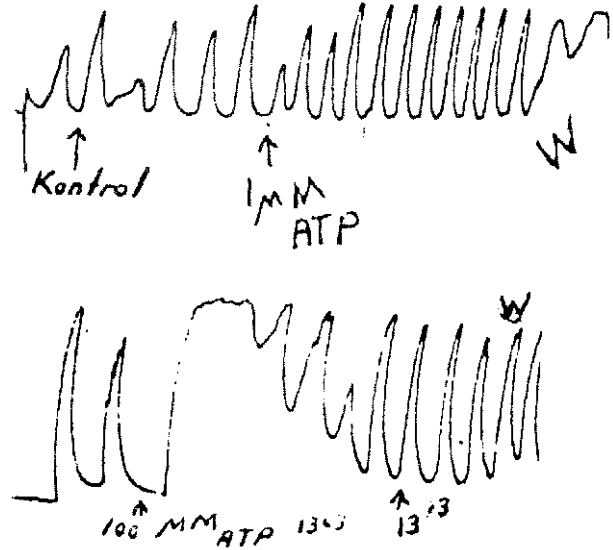
BULGULAR

ATP (1 uM-100 uM) konsantrasyona bağlı olarak izole sıçan uterus şeritlerinde kontraksiyona sebep oldu (Şekil 1,2) (Tablo 1). 100 uM ATP ile maximum cevap elde edildi. ATP'nin log-doza cevap eğrisi suramin yokluğunda ve mevcudiyetinde incelendiğinde suramin (100 pM ve 1 uM)'in ATP'nin etkisini nonkompetitif olarak antagonize ettiği gözlemlendi (Şekil 3,4) (Tablo 1).

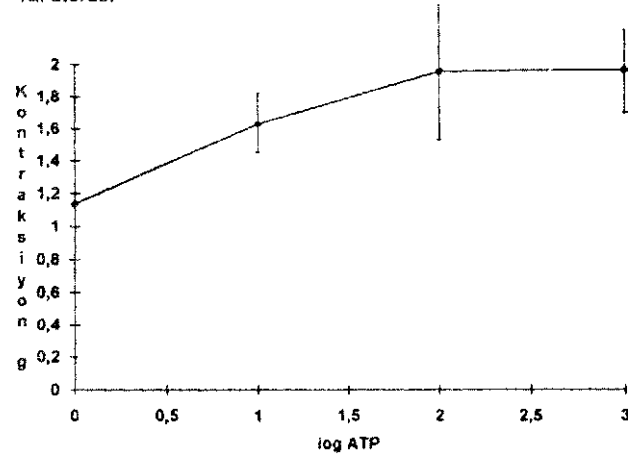
4 ve 8 Hz'lik elektriksel uyarılar da, suramin (1-10-100 uM ve 1 mM) mevcudiyetinde inhibisyon meydana getirdi (Tablo 2). Diğer taraftan suramin (100 uM) mevcudiyetinde sıçan uterusunda asetilkolin (10 uM)'in kasıcı etkisi (Şekil 5) ve noradrenalin (10 uM)'in gevşetici etkisi değişmedi (Şekil 6).

TARTIŞMA

Çalışmamızda P₂ purinoreseptör agonisti ATP (1 pM - 100 uM) konsantrasyona bağlı olarak izole sıçan



Şekil 1. ATP'nin (1-100 µM) izole sıçan uterusuna kasıcı etkisi. Figure 1. The contractive effect of ATP (1-100 µM) on isolated rat uterus.



Şekil 2. İzole sıçan uterusunda ATP'nin log-doza cevap eğrisi. Figure 2. Log-dose response curve of ATP on isolated rat uterus.

uterus şeritlerinde spontan hareketlerin amplitüd ve frekansını artırdı. 1972 yılında Burnstock ATP'nin uterus düz kasını pek çok türde kastığını, sıçan uterusunda bu etkinin oldukça güçlü olduğunu bildirmiştir (1). ATP'nin kasıcı etkisinin P_{2X} reseptörleri aracılığı ile olması mümkündür. Düz kaslarda P₂-purinoreseptör çalışmalarında P₂ reseptörlerinin P_{2X} alt tipinin aktivasyonunda kontraksiyon, P_{2Y} alt tipinin aktivasyonunda ise relaksasyon meydana geldiği bildirilmiştir (7). Örneğin Kobay vas deferens (6,8,9) sıçan ve kobay mesanesi (9,10), tavşan izole mezenterik arteri (11), tavşan kulak arteri (12), perfüze pankreas damar yatağı (13), sıçan aorta ve femoral arteri (12,14)'nde P_{2X} purinoreseptör alt tipinin aktivasyonu kontraksiyon aracılığı etmiştir. İnsan uterus membranında P₂ purinoreseptörlerin bulunduğu radyoligand bağlama yöntemi ile gösterilmiştir (15).

Tablo 1. İzole sıçan uterusunda ATP kontraksiyonları üzerine suramin'in etkisi.
Table 1. The effect of suramine on ATP contractions in isolated rat uterus.

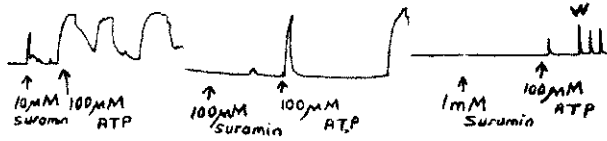
ATP (mM) Kontrol	Suramin + ATP				
	1 »JM	10 μ M	100 μ M	1mM	
1 (n-11)	1.14±0.21	1.06±0.21	0"	0"	0"
10 (n-22)	1.63±0.44	1.60±0.43	0.86±0.33	0.26±0.13	0"
100 (n-14)	1.96±0.26	1.99±0.31	1.70±0.27	1.09±0.34*	0.36±0.21

* p<0.05
** p<0.001

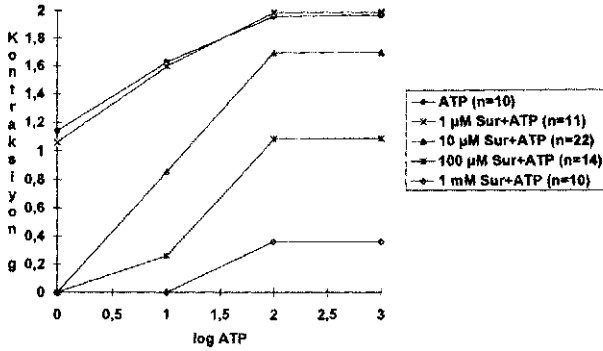
Tablo 2. İzole sıçan uterusunda elektrik uyarısının suramin tarafından inhibisyonu.
Table 2. The inhibition of electrical stimulation by suramine in isolated rat uterus.

Elektriki uyarı	Suramin + Elektriki Uyarı			
	1 μ M	10 μ M	100 μ M	1mM
4Hz (n-13)	1.19±0.11	0.75±0.14*	0.54±0.11"	0.34±0.14"
8 Hz (n-11)	1.43±0.10	1.12±0.09*	0.96±0.16	1.09±0.15*

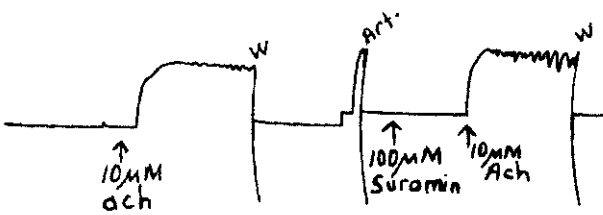
* p<0.05
** p<0.001



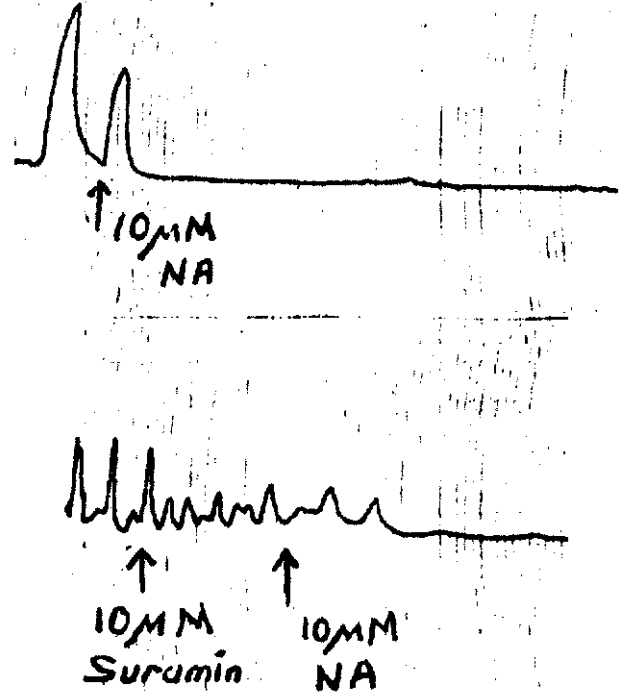
Şekil 3. 10 μ M - 100 μ M ve 1 mM suramin'in 100 μ M ATP'nin kontraksiyonuna inhibitör etkisi.
Figure 3. The inhibition effect of 10 μ M - 100 μ M and 1 mM suramine on the contraction produced by 100 μ M ATP.



Şekil 4. İzole sıçan uterusunda suramin yokluğunda ve mevcudiyetinde ATP'ye cevaplar.
Figure 4. The responses to ATP in the presence and absence of suramine in isolated rat uterus.



Şekil 5. İzole sıçan uterusunda asetilkolin (ACh)'in kontraksiyonuna suramin'in etkisi.
Figure 5. The effect of suramine on the contraction produced by acetyl choline in isolated rat uterus.



Şekil 6. İzole sıçan uterusunda noradrenalin (NA)'in relaksasyonuna suramin'in etkisi.
Figure 6. The effect of suramine on relaxation produced by noradrenaline in isolated rat uterus.

P₂ reseptör antagonisti suramin ATP'nin kontraktıl etkisini nonkompetitif olarak antagonize etti. Suramin, ATP'nin log-doğ-cevap eğrisini sağa kaydırđı ve maksimum cevapta azalma meydana getirdi. Suramin'in çeşitli dokularda ATP'nin etkisini P_{2x} reseptörleri üzerinden nonkompetitif olarak antagonize ettiği bildirilmiştir. Örneğin, fare vas deferens (5), kobay mesanesi (16), kobay tenya kolisi (17)'nde suraminin P_{2x} reseptör

törler üzerinde spesifik reversibl bir antagonist olduğu gösterilmiştir. Bizim izole sıçan uterusundaki bu çalışmamız yukarıdaki literatürler ile uyum içerisindedir. Bazı çalışmalarda suraminin P_{2y} reseptörlerini bloke ettiği bildirilmiştir (16,17). P_{2y} reseptörlerin aktivasyonu relaksasyona aracılık ederler. İzole sıçan uterusunda P₂ purino reseptör agonisti ATP; kasıcı etki meydana getirdi. Bu yüzden biz uterusunda P_{2x} reseptörlerinin varlığını kabul ederek suramin! P_{2x} reseptör antagonist olarak değerlendirdik.

Suramin, izole sıçan uterusunun elektriksel uyarılara olan cevaplarını ATP'ye paralel bir şekilde inhibe etti. Purinerjik sinirler periferde uterus dahil çeşitli dokularda ve SSS'nin çeşitli bölgelerinde bulunurlar (2). Endojen ATP ile ekzojen ATP'nin aynı reseptöre etkileri bildirilmiştir (18). Çalışmamızda izlediğimiz suraminin bu etkisi diğer araştırmacılar tarafından da desteklenmiştir. Kobay tenya kolisinde elektriksel stimülasyona karşı oluşan kontraktıl cevaplar ATP kontraksilyonları ile paralellik göstermiştir. Bu cevapları 100 uM - 1 mM suramin, konsantrasyonuna bağlı olarak inhibe etmiştir (16).

Suramin, asetilkolin ve noradrenalinin izole sıçan uterusunda oluşturdukları cevapları değiştirmedir. Suramin selektif P₂ purinoreseptör aracılı etki gösterdiği çeşitli dokularda gösterilmiştir (16,18). Örneğin fare vas deferensinde (5), suramin, noradrenalin ve karbakolun cevaplarına etkisiz kalmıştır. Buradan da ATP'nin uterusundaki kontraktıl etkisinin ko-transmitter olarak değilde direkt etki olduğu düşünülmektedir.

izole sıçan uterusunda suramin, tek başına geçici bir süre kontraktıl cevapta artış meydana getirdi. Bu etki Arilazido-amino-propionil-ATP (ANAPP₃) maddesinde de görülmüştür. Bu madde başlangıçta reseptörü aktive eden P_{2x} antagonistidir (5).

Sonuç olarak sıçan uterusunda suramin 10 mM ve üzeri konsantrasyonlarda P_{2x} reseptörü antagonist olduğu kanısına varıldı. Purinerjik sistemi etkileyen ilaçların ileride kullanılması tedaviye yeni yaklaşımları sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Burnstock G. Purinergic nerves, *Pharmacol Rev* 1972; 24:509-81.
2. Koşay S. Purinerjik sistem ve metoklopramid, *Ege Üniv. Tıp Fak. Dergisi* 1978; 17(4):705-22.
3. Burnstock G. Neurol nomenclature, *Nature London* 1971; 229:282-3.
4. Williams M. Purinoceptor in mammalian tissues: Pharmacology and functional significance, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1987; 27:315-45.
5. Dunn PM, Blakeley AGH. Suramin A reversible P₂ purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens. *Br J Pharmacol* 1988; 93:243-5.
6. Burnstock G, Cusack NJ, Meldrum L. Studies on the stereoselectivity of the P₂ purinoceptor on the guinea-pig vas deferens, *Br J Pharmacol* 1985; 84:431-4.
7. Burnstock G. Neurotransmitter and trophic factors in the autonomic nervous system. *J Physiol London* 1981; 313:1-35.
8. Fedan JS, Hogaboom GK, West Fall DP, O'Donnel JP. Comparison of contractions of the smooth muscle of the guinea-pig vas deferens induced by ATP and related nucleotides, *Eur J Pharmacol* 1982; 81:193-204.
9. Burnstoc G, Cusacks NJ, Hilss JM, Mocken Z'e, I, Meghji P. Studies on the stereoselectivity of the P₂-purinoceptor, *Br J Pharmacol* 1983; 79:907-13.
10. Brown C, Burnstock G, Cocks T. Effects of adenosine 5'Triphosphate (ATP) and p-y methylene ATP on the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* 1979; 65:97-102.
11. Burnstock G, Warland JI Jennifer. Pharmacological study of the rabbit saphenous artery in vitro: a vessel with a large purinergic contractile response to sympathetic nerve stimulation. *Br J Pharmacol* 1987; 90:111-20.
12. Kennedy C, Burnstock G. Evidence for two types of P₂purinoceptor in longitudinal muscle of the rabbit portal vein. *Eur J Pharmacol* 1985(b); 111:49-56.
13. Chapal, Jeannie and Mode-Madeleine Loubatieres-Mariani: Evidence for purinerjik receptors on vascular smooth muscle in rat pancreas, *Eur J Pharmacol* 1983; 87:423-30.
14. White TD, Chaudhry A, Vohra MM, Webbi D, Lessie AR. Characteristics of P₂ (nucleotide) receptors mediating contraction and relaxation of rat aortics strips: Possible physiological relevance, *Eur J Pharmacol* 1985; 118:37-44.
15. Ronca TS, Galbani P, Gambacciani M. Some properties of a purinergic receptor solubilized from uterus membranes, *Febs Lett* 1984; 172(2):335-8.
16. Hoyle CHV, Kinight GE, Burnstock G. Suramin antagonizes responses to P₂-purinoceptor agonists and purinergic nerve stimulation in the guinea-pig urinary bladder and taenia coli. *Br J Pharmacol* 1990; 99:617-21.
17. Den Hertog A, Nelemans A, Van Dear Akker J. The inhibitory action of suramin on the P₂ purinoceptor response in smooth muscle cells of guinea-pig teania caeci, *Br J Pharmacol* 1989; 166:513-34.
18. Kasakov L, burnstock G. The use of the slowly degradable analog p-T methylene ATP, to produce non-adrenergic, non-cholinergic responses of the guinea-pig urinary bladder. *Eur J Pharmacol* 1983; 86:2912-294.