

# Sildenafil Sitratın İzole Sıçan Aortası Üzerine Etkileri: Karşılaştırmalı İn Vitro Çalışma

Dr. Hanefi Özbek, Dr. Niyazi Güler\*, Dr. Sabahattin Aydın \*\*,  
Dr. Beyhan Eryonucu\*, Dr. Mehmet Bilge\*

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji, Kardiyoloji\* ve Üroloji\*\* Anabilim Dalları, Van

**Amaç:** Bir cGMP spesifik fosfodiesteraz tip 5 inhibitörü olan sildenafil sitrat, günümüzde erektil fonksiyon bozukluğunun oral tedavisinde kullanılmaktadır. Çalışmamızın amacı sildenafilin vasküler doku üzerindeki etkilerini araştırmak ve sodyum nitroprussid ve asetil kolin gibi bilinen vazodilatatör maddelerin etkisi ile karşılaştırmaktır.

**Yöntem:** Sıçan torasik aortası halka şeklinde kesilerek 37 °C'ye ayarlanmış Krebs solüsyonu içindeki askıya asıldı. Bir poligrafa bağlı güç başlıklı transduserler yardımıyla izometrik cevaplar kaydedildi. Artan konsantrasyonlarda asetil kolin, sodyum nitroprussid ve sildenafil uygulanarak tedrici relaksasyonlar elde edildi.

**Bulgular:** Sıçan aorta striplerinde ajanların hepsi ile doz bağımlı relaksasyonlar oluştu. Fenilefrinin oluşturduğu kontraksiyon üzerine sildenafil sitrat, asetil kolin ve sodyum nitroprusside ait gevşeme cevapları sıralandığında sodyum nitroprussid>sildenafil>asetil kolin şeklinde idi.

**Sonuç:** Regülatör mekanizmalar olmadığında sildenafil sitratın in vitro belirgin vazodilatatör etkisi vardır. (*Ana Kar Der, 2001; 1: 23,26*).

**Anahtar Kelimeler:** Sıçan aortası, sildenafil sitrat

## Giriş

Penil ereksiyon, kavernoöz korpusunun düz kas hücrelerini ve arteriyollerini içeren hemodinamik bir süreç olarak bilinmektedir. Yeterli bir cinsel ilişki için ereksiyonun olmaması veya sürdürülememesi ise erektil fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. Bir cGMP-spesifik fosfodiesteraz tip 5 enzim inhibitörü olan sildenafil sitrat, mbugün erektil fonksiyon bozukluğunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde 6 adet fosfodiesteraz enzim inhibitörü bilinmekte olup her biri dokularda farklı oranlarda dağılmaktadır (1,2). Fosfodiesteraz tip 5'in (PDE5) miyokardiyumda var olup olmadığının gösterilememesinin yanısıra, damarlardaki fonksiyonu hakkında da çok az bilgi vardır (3). Sildenafilin bilinen yan etkilerinden baş ağrısı ve flushing, orta periferik arter vazodilatasyonuna, nazal konjesyon ise oluşan lokal konjesyona bağlıdır (4). Ayrıca 100 mg sildenafil uygulanmasından 1 saat sonra kan basıncında yaklaşık 10 mmHg'lık bir azalma olduğu ve bunun 4-8 saat içinde normale döndüğü bildirilmiştir (3). Bu etkilerden damar dufvarında bulunan fosfodiesteraz tip 5 enzimi sorumlu tutulmaktadır (2). Nitratlarla birlikte alındığında ise nitrik oksit-cGMP ortak yolu üzerin-

den etki ederek daha fazla kan basıncı düşüşüne yol açabilmektedir (5).

Bu çalışmada sildenafil sitratın sıçan aortasında yaptığı relaksasyon etkisi araştırıldığı ve vazodilatatör etkisi bilinen asetil kolin ve sodyum nitroprussid ile karşılaştırıldı.

## Metod

Çalışmada inbred yetiştirilmiş, standart palet sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslenmiş, 12 saat gece ve 12 saat gündüz ritmi uygulanmış, 10 adet yetişkin Sprague-Dawley cinsi, 200,220 gram ağırlıkta erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 200 mg/kg ketaminle uyu-tuldu. Göğüs kafesi açılıp kalp ve akciğerler çıkarılarak torakal vertebra ile aynı seviyede duran torasik aorta, arcus aorta ile birlikte çıkarıldı. Aorta, üzerindeki yağ vs. Dokulardan temizlendikten sonra düz-gün kesi ile kesilerek eşit uzunlukta iki adet izole aort halkası elde edildi. Proksimalden alınan halka (sıçan aortasının kalbe yakın tarafından alınan halka) hiç zedelenmeden organ banyosuna (MAY, TDA 97, Holygraph Systems, FDT 10-A isometric transducer) asıldı (endotelli aorta). İkinci halka ise kalan aorta parçasından (distalde kalan parça) elde edildi ve bu parçanın içerisinden yüzeyi pürüzlü bir cisim geçirilip

10 kez ileri ve 10 kezi geri hareket ettirilerek endoli zedelendi (endotelsiz aorta). Endolelli ve endotelsiz aortalar ayrı ayrı banyolara zaman geçirmeksizin asıldı. Banyoda normal Krebs solüsyonu (1 litre distile su içinde; 6.9 gr NaCl , 2.0 gr D-glikoz, 0.34 gr KCl, 0.16 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 gr MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 2.1 gr NaHCO<sub>3</sub>, 0.18 gr CaCl<sub>2</sub> • 2 H<sub>2</sub>O eklenerek hazırlandı) ve yüksek K<sup>+</sup>lu (120 nanoMolar) Krebs solüsyonu (1 litre distile su içinde, 0.22 gr NaCl, 1.98 gr D-Glikoz, 8.86 gr Kl, 0.16 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 gr MgSO<sub>2</sub>O7H<sub>2</sub>O, 2.1 gr NaHCO<sub>3</sub>, 0.18 gr CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O eklenerek hazırlandı) kullanıldı. Yüksek K<sup>+</sup>lu Krebs solüsyonu, endolellisiz aorta üzerine KCl<sup>+</sup>ün etkisini ölçme sırasında sadece bu aorta üzerinde kullanıldı, diğer tüm işlemler sırasında her iki aort parçası da normal Krebs solüsyonu içinde tutuldu. İzole aort parçaları cihazca bağlı traksiyon manivelası ile 2 gramlık bir güçle gerilerek 1 saat bu şekilde bekletildi. Her 15 dakikada bir banyodaki normal Krebs solüsyonu değiştirildi. Banyo ısı 37 °C olacak şekilde sürekli irrigasyona tabi tutuldu. Ayrıca banyo sıvısı (normal Krebs solüsyonu) içine tüm çalışm aboyunca % 95 O<sub>2</sub> ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren Karbojen gazı verildi. Damar yanıtları Polwin 97 paket programı aracılığı ile bilgisayar ortamında monitörize edildi.

Endotelli aortanın bulunduğu banyoya önce do-

kuz doz  $\alpha$ 1 adrenerjik reseptör agonisti olan fenilefrin katılarak aort halkasının kasılma yanıtları elde edildi. Bu yanıtların oluşturduğu eğrinin % 80'ine denk gelen doz submaksimal kasılma dozu olarak kabul edildi. Submaksimal doz, izole organ preparatlarında büyük önem taşımaktadır. Doz aşıldığında izole organ preparatına irreversible zarar verme durumu ortaya çıkabileceğinden submaksimal doz organ için bir güvenlik sınırı oluşturmaktadır. Daha sonra banyo ortamı normal Krebs solüsyonu ile yıkanıp damar dinlendirilerek asetilkolin, sildenafil sitrat ve sodyum nitroprussid ait gevşeme yanıtları elde edildi. Bu maddeleri uygulamadan önce banyo ortamı normal Krebs solüsyonu ile yıkanıp damarların dinlendirilmesi, ardından submaksimal doz fenilefrin uygulanarak damarın gevşeme yanıtlarından önce kasılması sağlandı. Fenilefrinle prekontrakte edilen ortaya (ayrı ayrı olarak) asetil kolin, sildenafil ve sodyum nitroprussid sıra ile uygulanarak gevşeme yanıtları elde edildi (Tablo 1). Sildanfil Fako İlaçları AŞ tarafından sağlanırken (kod: 22210, kontrol no: 19081644), diğer kimyasal maddeler ticari kaynaklardan (Sigma Co., Merck Co.) elde edildi.

Endotelsiz aortaya önce fenilefrin, damar dinlendirildikten sonra da KCl (yüksek K<sup>+</sup>lu Krebs solüsyonu) uygulandı. Böylece sistemin sağlıklı çalışıp çalış-

**Tablo 1: Çalışmada endotelli aortada kullanılan ilaç konsantrasyonları (M: Molar konsantrasyon)**

Dozlar	Fenilefrin	Asetilkolin	Sildenafil	Sodyum nitroprussid
1. doz	3x10 <sup>9</sup> M	3x10 <sup>9</sup> M	3x10 <sup>9</sup> M	10 <sup>9</sup> M
2. doz	10 <sup>8</sup> M	10 <sup>8</sup> M	10 <sup>8</sup> M	3x10 <sup>9</sup> M
3. doz	3x10 <sup>8</sup> M	3x10 <sup>8</sup> M	3x10 <sup>8</sup> M	10 <sup>8</sup> M
4. doz	10 <sup>7</sup> M	10 <sup>7</sup> M	10 <sup>7</sup> M	3x10 <sup>8</sup> M
5. doz	3x10 <sup>7</sup> M	3x10 <sup>7</sup> M	3x10 <sup>7</sup> M	10 <sup>7</sup> M
6. doz	10 <sup>6</sup> M	10 <sup>6</sup> M	10 <sup>6</sup> M	3x10 <sup>7</sup> M
7. doz	3x10 <sup>6</sup> M	3x10 <sup>6</sup> M	3x10 <sup>6</sup> M	10 <sup>6</sup> M
8. doz	10 <sup>5</sup> M	10 <sup>5</sup> M	10 <sup>5</sup> M	3x10 <sup>6</sup> M
9. doz	3x10 <sup>5</sup> M	3x10 <sup>5</sup> M	3x10 <sup>5</sup> M	

**Tablo 2: Çalışmada endotelsiz aortada kullanılan ilaç konsantrasyonları (M: Molar konsantrasyon)**

Dozlar	Fenilefrin	KCl
1. doz	3x10 <sup>-9</sup> M	120 nM (yüksek K <sup>+</sup> lu Krebs solüsyonu)
2. doz	10 <sup>-8</sup> M	
3. doz	3x10 <sup>-8</sup> M	
4. doz	10 <sup>-7</sup> M	
5. doz	3x10 <sup>-7</sup> M	
6. doz	10 <sup>-6</sup> M	
7. doz	3x10 <sup>-6</sup> M	
8. doz	10 <sup>-5</sup> M	
9. doz	3x10 <sup>-5</sup> M	

madığı kontrol edildi. Bu damara başka bir uygulama yapılmadı. Endotelsiz aortaya uygulanan ilaçlar ve dozları tablo 2'de verilmiştir.

Aortada asetil kolin ile gevşeme yanıtları % 70'in altında olduğunda endotel zedelenmesi kabul edilerek damar çalışma dışı bırakılıp yeni damar hazırlandı. Sodyum nitroprussid ışıkta tepkimeye uğradığından karanlık bir ortam oluşturulduktan sonra sodyum nitroprussid ile çalışıldı.

Maksimal kontraksiyonu % 50 inhibe eden etkili ilaç dozu ED50 maksimal kontraksiyonun % 50 inhibisyonuna neden olan negatif logaritmik konsantras-

yonun ortalaması ise PD2 olarak tanımlanmaktadır. Çalışmada 10 farklı sıçan aortasından elde edilen gevşeme yanıtlarına ait ED50 PD2 değerleri Polwin 97 bilgisayar paket programında otomatik olarak hesaplanmaktadır. Bu değerlerin ortalamaları ve standart sapmaları SPSS 10.0 for Windows paket programında hesaplanıp ANOVA istatistik yöntemi ile karşılaştırıldı.  $P < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar Tablo 3'te verilmektedir.

**Tablo 3: Çalışma 3gruplarının ED50 ve PD2 değerleri**

GRUP	n	ED50	PD2
Asetilkolin	10	3.5±2.0	5.5±0.8
Sildenafil	10	3.7±1.7	7.1±1.4*
Sodyum nitroprussid	10	2.9±1.8	7.9±1.0**

• ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.001$ )

## Bulgular

Endotelsiz aorta nitrik oksit içermediğinden fenilefrin ile oluşan kasılmaya endotelli aortaya göre daha güçlü yanıt verdi. Böylece endotelli aortanın infakt olduğu test edilmiş oldu. Endotelli aortaya uygulanan asetilkolin, sildenafil ve sodyum nitroprusside ait gevşeme cevaplarının ED50 ve PD2 değerleri Tablo 3'te verilmiştir. ED50 değerleri üç grup arasında anlamlı farklılık göstermedi. PD2 değerlerine göre ise sildenafilin asetil kolinden ( $p < 0.01$ ) daha güçlü bir relaksasyon yaptığı gözlemlendi. Sodyum nitroprussid ve sildenafilin karşılaştırılmasında ise istatistiksel olarak anlamlı sonuç saptanmadı. Sodyum nitroprussidin asetil kolinden daha fazla relaksasyon ( $p < 0.001$ ) yaptığı görüldü. Relaksasyon gücüne göre sıralama sodyum nitroprussid > sildenafil > asetil kolin şeklinde idi.

## Tartışma

İstirahat kan basıncının sürdürülmesinde önemli bir komponent NO (nitrik oksit) aracılığı ile oluşan tonik vazodilatasyonun regülasyonudur. Hem sildenafil hem de NO verici ilaçlar cGMP'yi arttırarak düz kaslarda gevşeme yapmaktadırlar. İlk çalışmalar sildenafilin kan basıncında hafif bir azalma yaptığını göstermektedir (5). Sildenafil 100 mg alındığında kan basıncında yaklaşık 10.2/6.8 mmHg'lik bir düşüş yapıldığı bildirilmiştir (6). Kan basıncının 4-8 saat sonra normale döndüğü ve uygulanan dozdan bağımsız olduğu da gösterilmiştir (3). Brakiyal arter kan akımı ve venöz kompiyansı üzerine yapılan çalışmalarda sildenafilin arteriyel rezistansı düşürdüğü ve ön kol volümünü arttırdığı bildirilmektedir (3). Bu çalışmalar sonucunda, sildenafilin kan basıncında hafif bir düşme yapmasına rağmen normal ve iskemik kalp hastalığı olanlarda iyi tolere edildiği sonucuna varılmıştır

(3,4,6). PDE5 miyokardiyumda olmamakla birlikte damar yapısında bulunmaktadır. PDE5'ten başka damar yapısında PDE3 ve PDE1 bulunmakta olup bunlara sildenafilin afinitesi düşüktür (1,2). Sildenafilin vasküler etkileri potansiyalize etmesi ve vazodilatasyon yapması nedeni ile kardiyovasküler güvenlik profili ile ilgili çalışmalar günümüzde artmıştır (6). Fenilefrin ile kontrakte hale getirilmiş tavşan aortası üzerinde yapılan bir in vitro çalışmada, gliserol trinitrat ve sildenafil birlikte uygulandığında sildenafilin gliserol trinitrat ile oluşan vazodilatör etkiyi artırdığı gözlemlenmiştir (2). Bu çalışmadan sildenafilin nitrik oksit sağlayıcı ajanların hipotansif etkisini artırabileceği sonucuna varılmıştır.

Çalışma düzenimizde kullanılan normal Krebs solüsyonu, izole aort halkasının bulunduğu ortamdaki izotonsiteyi ve dokunun ihtiyacı olan glikozu sağlamaktadır. Doku örneklerinin fenilefrin ile kontrakte hale getirilmesi relaksasyon için hazır bir durum oluşturmakta, böylece vazodilatör ilaçların relaksasyon etkisi araştırılabilmektedir. Biz de çalışmamızda Krebs solüsyonu içindeki aort halkasına fenilefrin uygulayarak vazokonstriksiyon sağladık ve eşit konsantrasyonlarda verilen ilaçların relaksasyon cevaplarını bilgisayar ortamında değerlendirdik.

Kolin esterleri ile vasküler yatakta oluşan dilatasyon muskarinik reseptörlerin özellikle de M3 alt grubunun bulunmasına bağlıdır. Relaksasyondan sorumlu muskarinik reseptörler damar endotel hücrelerinde yerleşmiştir. Bu reseptörler uyarıldığında endotel den endotel kaynaklı relaksan faktör (nitrik oksit) salınarak komşu düz kaslara yayılmakta ve relaksasyona neden olmaktadır (7). Sodyum nitroprussid arteriyel ve venöz damarların her ikisini de genişleterek periferik damar direncini ve venöz dönüşü azaltmaktadır (8). Etki mekanizması ise potasyum kanallarını açarak ve membranda elektrojenik sodyum pompasını aktive ederek düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon yapması ve  $Ca^{++}$  kanallarından  $Ca^{++}$  girişini inhibe etmesi şeklinde açıklanmaktadır. Ayrıca hücrede nitrik oksit salınması ile sitoplazmadaki solübl guanilat siklaz-cGMP sistemini aktive ederek vazodilatasyon yaptığı da bilinmektedir. Sildenafil ise vasküler yapıda bulunan PDE5'in yanı sıra afinitesi düşük olmakla birlikte PDE3 ve PDE1 üzerinden etki ederek vazodilatasyon yapmaktadır (1,3,4).

Sonuç olarak çalışmamızda sıçan aortasında fenilefrinin oluşturduğu kontraksiyon üzerine sildenafil sitratın sodyum nitroprusside denki, asetil koline göre ise daha fazla relaksasyon etkisinin olduğu görülmüştür. Sildenafilin in vitro vazodilatasyon etkisi beklediğimizden daha fazla olmuştur. Normal sağlıklı bireylerde kan basıncındaki azalmanın hafif olması regülatuar mekanizmaların devreye girmesi ile açıklanabilir.

### Kaynaklar

1. Bravo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 1995; 75: 725-48.
2. Wallis RM, Corbin JD, Francis SH, Ellis P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carnea and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol* 1999; 83 (suppl 5): 3C-13C.
3. Jackson G, Benjamin N, Jackson N, Allen MJ. Effects of sildenafil citrate on human hemodynamics. *Am J Cardiol* 1999; 83 (suppl 5): 13C-20C.
4. Conti RP, Repine CJ, Sweeney M. Efficacy and safety of sildenafil citrate the treatment of erectile dysfunction in patients with ischemic heart disease. *Am J Cardiol* 1999; 83 (suppl 5): 29C-34C.
5. Webb DJ, Freestone S, Allen MJ, Muirhaed GJ. Sildenafil citrate and blood pressure lowering drugs: results of drug interaction studies with an organic nitrate and calcium antagonist. *Am J Cardiol* 1999; 83 (suppl 5): 21C-8C.
6. Zusman RM, Morales A, Glasser DB, Osterloh IH. Overall cardiovascular profile of sildenafil citrate. *Am J Cardiol* 1999; 83 (suppl 5A): 35C-44C.
7. Brown JH, Taylor P. Muscarinic receptor agonists and antagonists. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddo RW, Gilman AG (eds). *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of therapeutics 9 th edit.* Ch 7. New York: McGraw Hill, 1995. pp. 141-60.
8. Kelly RA, Smith TW. Pharmacological treatment of heart failure. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddo RW, Gilman AG (eds). *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics 9 th edit.* Ch 34. New York: McGraw Hill; 1995. pp.809-38.