



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2014; 28 (2): 67 - 72
http://www.fusabil.org

Sıçanlarda Artan Dozlarda N^o-Nitro-L-Arginin (L-NNA) Uygulaması ve Yüksek Tuzlu Diyetin Adrenerjik Aktivite ve Vasküler Reaktivite Üzerine Etkileri *

Selçuk İLHAN¹
Engin ŞAHNA¹
Hakkı Engin AKSULU²

¹Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Elazığ, TÜRKİYE

²Çanakkale Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Çanakkale, TÜRKİYE

Amaç: Nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin akut ve kronik blokajı kan basıncı artışına neden olmaktadır. Bu model hipertansiyonda yüksek tuz diyeti ilavesi (%1), hipertansiyonun şiddetini artırmaktadır. Bu çalışmanın amacı, bu modelde tuza bağımlılığın, NOS inhibisyonunun büyüklüğü ve/veya vasküler alfa-adrenerjik reseptör duyarlılığı ile ilişkisi olup olmadığını belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: Erişkin Sprague-Dawley sıçanlara standart (%0.8) veya yüksek tuz (%8) içeren diyet ve günlük 5 veya 25 mg/kg oral L-NNA tedavisi uygulandı. Kan basıncı indirekt kan basıncı ölçüm sistemi olan tail-cuff yöntemi ile, idrar vanililmandelikasit (VMA) düzeyleri ise yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) metodu kullanılarak ölçüldü. Alfa-adrenerjik reseptör yanıtları izole torasik aorta halkalarında "in vitro" şartlarda değerlendirildi.

Bulgular: 14 gün sonunda, düşük doz L-NNA tedavisi ile birlikte tuz yüklemesi yapılan grupta anlamlı kan basıncı artışı saptandı. Yüksek doz L-NNA alan sıçanlarda anlamlı kan basıncı artışı görüldü ve hipertansiyon tuzun artırılmasıyla şiddetlendi. Çalışmanın 14. gününde düşük dozda L-NNA ile birlikte yüksek tuz diyeti alan grupta idrar VMA düzeyleri, diğer gruplara göre anlamlı yüksek bulundu. Aynı zamanda bu grupta, alfa-1 adrenerjik reseptör duyarlılığı anlamlı oranda azaldı.

Sonuç: Mevcut bulgular, subpressor dozda NOS inhibitörü ve beraberinde yüksek tuz içeren diyet uygulamasıyla hipertansiyon gelişmesinde, sempatik sistem aktivitesinde artışın önemli katılımcı olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hipertansiyon, L-NNA, tuz diyeti, vanililmandelik asit.

The Effects of Increasing Doses of N^o-Nitro-L-Arginin (L-NNA) with High Salt Diet on Adrenergic Activity and Vascular Reactivity in Rats

Objective: The acute and chronic blockade of Nitric oxide synthase (NOS) enzyme by N^o-nitro-L-arginine (L-NNA) leads to hypertension. In this model, the co-administration of a high salt diet (1%) increases the intensity of hypertension. The aim of this study is to determine whether salt dependence in this model is related to the extent of nitric oxide inhibition and/or vascular adrenoceptor responsiveness.

Materials and Methods: To determine whether salt dependence in this model is related to the extent of nitric oxide inhibition and/or vascular adrenoceptor responsiveness, we administrated a standard salt, or high salt diet and oral L-NNA treatment to adult male Sprague-Dawley rats at either 5 or 25 mg/kg per day. Blood pressure was measured by using tail-cuff method and urine vanillylmandelic acid (VMA) by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method. Alpha-adrenergic receptor responses in isolated thoracic aorta rings were evaluated in "in vitro" conditions.

Results: Low-dose L-NNA treatment induced a blood pressure augmentation only when associated with sodium overload. In rats receiving high-dose L-NNA, hypertension was aggravated by sodium excess. At the 14th day of treatment, the urine VMA levels was significantly increased in rats receiving low-dose L-NNA with high salt diet compared with others. Also, vascular alpha-1 adrenergic receptor sensitivity in this group was significantly decreased.

Conclusion: Present findings indicate that the activation of sympathetic may be a main contributor factor to development of hypertension induced by co-administration of a high salt diet with suppressor dose of L-NNA in rats.

Key Words: Hypertension, L-NNA, salt diet, vanillylmandelic acid.

Giriş

Esansiyel hipertansiyonda kan basıncı artışının mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Esansiyel hipertansiyon hastalarının plazma nitrit ve nitrat (NOx) düzeylerinde azalma olduğunu gösteren çalışmalar vardır (1, 2). Bu nedenle, sözkonusu multifaktöriyel mekanizmaların aydınlatılması amacıyla çalışılan deneysel

* Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Birimi (FÜBAP- Proje No: 518) tarafından desteklenmiştir.

20. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 4-7 Kasım 2009, Antalya.

Yazışma Adresi Correspondence

Selçuk İLHAN
Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Elazığ-TÜRKİYE

selcukilhan52@gmail.com

hipertansiyon modellerinden birisi de, güçlü vazodilatör nitrik oksitin, nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörleri uygulamasıyla inhibisyonu sonucu gelişen hipertansiyondur (3, 4). Farklı doz ve sürelerde uygulanan NOS inhibitörlerinin kan basıncında yükselmeler meydana getirdiği iyi bilinmesine karşın, oluşan kan basıncı artışının şiddeti ve karakteri uygulanan NOS inhibitörlerinin dozlarına ve uygulama sürelerine bağlı olarak değişmektedir (5). Daha önceki çalışmalarda deney hayvanlarına oral yolla verilen NOS inhibitörü L-NAME'in 15 mg/kg/gün dozunun tama yakın bir inhibisyon için yeterli olduğu ileri sürülmüştür (6, 7). Dahası, içme suyunda uygulanan subpressör doz olarak bildirilen 0.1 mg/mL (~3-5 mg/kg/gün) konsantrasyonda L-NAME aracılı kan basıncı artışından su ve tuz tutulumu sorumlu tutulmaktayken, daha yüksek dozdaki uygulamalardan periferik direnç artışı sorumlu tutulmaktadır (8).

Esansiyel hipertansiyonda noradrenalin spillover hızında artma olduğuna dair bulgular rapor edilmiştir (9-11). Ancak, akut NOS inhibisyonu çalışmalarında, sempatik sistem aktivitesinin kısmen de olsa katılımcı olmadığını düşündüren bulgular da gösterilmiştir (12). NO'nin sempatoeksitatör bir rolü dışlanamamasına rağmen, akut NOS inhibisyonu esnasında barorefleks yolak üzerinden sempato-inhibisyona işaret eden çalışmalar bulunmaktadır (13). Bunun yanında ganglion blokajı ile birlikte yapılan kronik NOS inhibisyonunda kan basıncı düşmesinin kontrole göre fazla olması kronik NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyonda sempatik sistemin rolünü düşündürmektedir (7, 14). Yine laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda kronik 15 mg/kg/gün oral N^o-nitro-L-arginine (L-NNA) uygulaması ile meydana getirilen kan basıncı yükselmesinin santral etkili sempatoitik ajan olan klonidin ile önlenmesi de sempatik sistem aktivasyonunun bu tip hipertansiyon modelinde kronik uygulama esnasında meydana gelen kan basıncına katkısı olabileceğini düşündürmektedir (15). NOS inhibisyonu şiddetinin ve diyetdeki tuz miktarında artışların vasküler yanıtları ve sempatik sistem aktivitesini nasıl değiştireceğine dair bilgiler ise sınırlı kalmaktadır.

Bu çalışmada; tuza dirençli normotansif sıçanlarda total ve kısmi NOS inhibisyonu yapan dozlarda NOS inhibitörü ve tuz yüklemesi uygulayarak idrarda katekolamin metaboliti olan vanillylmandelic acid (VMA) düzeylerinde değişiklikler ve aynı zamanda "in vitro" ortamda torasik aorta halkalarında fenilefrin kasılma cevaplarıyla, bunların kan basıncı değişimlerine muhtemel katkılarının incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Araştırmada 220-260 gr ağırlığında Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar (n=38) kullanıldı. Sıçanlar standart şartlarda (12 saat günışığı, 12 saat karanlık, havalandırılmı, sabit ısı odalarında), bireysel metabolik kafeslerde barındırıldı.

Tuz diyeti sıçanlara yemle beraber verildi. Sıçanların beslenmeleri ilk 3 günlük eşitleme periyodunda normal standart sıçan yemiyle, devamında ise çalışma

sonlandırılıncaya kadar %0.8 veya %8'lik ticari sıçan yemlerinden biriyle yapıldı.

L-NNA Uygulamaları: L-NNA deneklere içme suyuyla birlikte uygulandı. Tüm gruplarda deneklerin su alımı serbest bırakıldı. Yüksek tuz grubunda olan sıçanların diğerlerine nazaran daha fazla su içeceği göz önünde tutularak, yüksek tuz diyeti alan gruplarda sudaki L-NNA konsantrasyonu içilen günlük su miktarına göre düzeltildi ve nihai günlük dozlar çalışma sonunda hesaplanarak ortalama günlük uygulanan ilaç dozu elde edildi. Tuz ve L-NNA uygulaması 14 gün ve devamında sıçanlar dekapite edilinceye kadar sürdürüldü.

Deney Protokolü:

- 1.Grup: % 0.8 tuz içeren yem verildi (Kontrol, n= 6).
- 2.Grup: Sıçanlara 14 gün boyunca %8'lik tuz içeren sıçan yemi ve normal içme suyu verildi (Tuz, n= 6).
- 3.Grup: Sıçanlara 14 gün boyunca içme suyunda, ~5 mg/kg/gün dozda L-NNA ve %0.8 tuz içeren yem verildi (LNNA5, n= 7).
- 4.Grup: Sıçanlara deney süresi boyunca %8'lik tuz içeren yem ve ~5mg/kg/gün dozda L-NNA içeren içme suyu verildi (TLNNA5, n= 7).
- 5.Grup: Sıçanlara deney süresi boyunca içme suyunda ~25 mg/kg/gün dozda L-NNA ve %0.8 tuz içeren yem verildi (LNNA25, n= 6).
- 6.Grup: Sıçanlara deney süresi boyunca %8'lik tuz içeren yem ve içme suyunda ~25 mg/kg/gün dozda L-NNA verildi (TLNNA25, n= 6).

Kan Basıncı Ölçümleri: Bilinci açık sıçanların kan basıncı ölçümleri (sistolik kan basıncı) kuyruktan indirekt tail cuff yöntemi ile yapıldı (MAY BPHR 9610-PC TAIL-CUFF Indirect Blood Pressure Recorder, Ankara, Türkiye) Tüm gruplardaki Sıçanların kan basıncı ölçümleri 0., 7. ve 14. günlerde yapıldı. Alınan kan basıncı değerleri bilgisayara kaydedildi. Her sıçandan 5 ölçüm alındı ve ortalamaları hesaplandı.

İdrar Örneklerinin Toplanması (Metabolik Kafes Çalışması): 24 saatlik idrar örnekleri için, idrar toplama kaplarına 6 molarlık HCl çözeltisinden düşük tuz grubuna 200 µL, yüksek tuz grubuna ise 500 µL konularak idrar toplamaya geçildi (HCl miktarları ortalama idrar hacmi dikkate alınarak ayarlanmıştır). Alınan örnekler *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) yöntemiyle hemen analiz edildi.

Cerrahi Uygulamalar: Deney sonunda, denekler dekapite edilerek kan örnekleri alındı. Daha sonra çabuk bir biçimde abdomen ve toraks orta hattın açıldı. Torasik aorta diafragmanın üzerinden başlayarak arkus aortaya doğru diseke edilerek çıkarıldı ve soğuk krebs solüsyonu içine alındı. Torasik aorta çevre bağ ve destek dokularından dikkatlice temizlenerek arkusa yakın uçtan 4 mm boyunda halka halinde kesildi. Hazırlanan 4 mm boyundaki torasik aorta halkaları, lümeninden birbirine

paralel iki paslanmaz çengel geçirilerek içerisinde 37°C'ta 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 tutturulacak üst çengel de izometrik kasılma cevaplarını kaydetmek için force-displacement transducerlerine (FT 0.03) bağlandı.

İzole Organ Çalışmaları: Kayıtlar poligrafla (Grass, Model 79) yapıldı. İzole organ banyosuna asılan torasik aorta halkaları 2 gramlık istirahat gerimi altında 1 saat boyunca dengelendi. İzole organ banyosundaki Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu metabolik son ürünlerin birikimini önlemek için her 15 dakikada bir taze solüsyonla yenilendi. İn vitro torasik aorta çalışmaları endotel varlığında çalışıldı. Aortik halkaların fenilefrin (10⁻⁹ - 10⁻⁴ mol/L) kasılma cevapları elde edildi ve doz-cevap eğrisindeki değerlerden EC50 değerleri hesaplandı. Emax değerleri için 80 mmol/L KCl ile elde edilen kasılma cevabı referans alınarak % kasılma cevabı olarak ifade edildi.

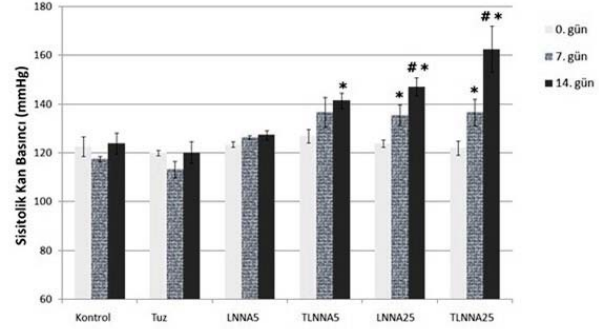
Vanililmandelikasit (VMA) Analizi: 24 saatlik idrardan VMA ölçümleri *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) kitleriyle (Hewlett Packard 1100 series HPLC system and ClinRep®, Recipe Chemicals and Instruments GmbH Munich, Germany) çalışıldı. Değerler günlük toplam idrar hacimlerine göre düzeltilerek µg/gün olarak ifade edildi.

Kimyasallar: Fenilefrin, Asetilkolin, L-NNA, (Sigma Aldrich Inc. St. Louis, MO. A.B.D) dan satın alındı.

İstatistiksel Analiz: Elde edilen veriler ortalama±standart hata (SH) olarak ifade edildi. Ortalamalar arasındaki farkların istatistiksel anlamlılık düzeylerini belirlemek için SPSS 22.0 paket istatistik programları kullanıldı. İstatistiksel farklar bağımsız gruplarda "one-way ANOVA" testi ile hesaplandı. Aynı grubun farklı zaman noktalarındaki değerleri arasındaki fark değerlendirmek için "paired student-t test" kullanıldı. Elde edilen sonuçların yorumlanmasında P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Kan Basınçları: Tüm gruplarda çalışmanın 0. 7. ve 14. günlerinde alınan kan basıncı değerleri analiz edildiğinde; kontrol, Tuz ve LNNA5 gruplarında 2 haftalık sürenin sonunda 0. ve 7. güne göre anlamlı basınç artışı tespit edilmedi (Şekil 1). TLNNA5 grubunda ise 14. günde, bazal değere göre anlamlı fakat 7. güne göre anlamlı olmayan artış tespit edildi (P<0.05). LNNA25 ve TLNNA25 gruplarında ise 14. gün kan basıncı değerleri hem 0. hem de 7. günlerine göre anlamlı artış gösterdi (P<0.05) (Şekil 1).



Şekil 1. *, 0. güne göre; #, 7. güne göre anlamlılığı temsil etmektedir, P<0.05.

VMA Düzeyleri: VMA değerleri günlük toplam idrar hacimlerine göre düzeltilerek mikrogram/gün cinsinden hesaplandı ve ortalama ± standart hata (SH) olarak ifade edildi (Tablo 1). Tüm gruplarda VMA değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda artmış olduğu bulundu. Buna göre LNNA5 ve LNNA25 gruplarında kontrole göre benzer oranda VMA artışı gerçekleştiği tespit edildi (P<0.05). Tuz grubunda, L-NNA5 ve L-NNA25 gruplarından daha fazla VMA artışı tespit edildi. Aynı zamanda L-NNA tedavisiyle Tuz diyeti birlikte olduğunda VMA'nın, özellikle LNNA5 grubunda en yüksek değere ulaştığı görüldü (Tablo 1).

Tablo 1. 24 saatlik idrarda VMA değerleri (HPLC analiz sonuçları).

Gruplar	n	VMA (mikrogram/gün)
Kontrol	6	5.27±1.40
Tuz	6	54.57±9.70 #
LNNA5	7	11.08±1.78 ¥
TLNNA5	7	202.65±51.92 ¥, #, *
LNNA25	6	12.76±2.67 ¥
TLNNA25	6	23.34±4.11 ¥, *, £, #

¥ Kontrole göre anlamlı farklılık vardır (P<0,05)

Normal tuz alan gruba göre anlamlı farklılık vardır (P<0,05)

£ 5 mg L-NNA alan gruba göre anlamlı farklılık vardır (P<0,05)

* L-NNA almamış gruba göre anlamlı farklılık vardır (P<0,05)

İzole Organ Çalışmaları: İn vitro şartlarda sıçanların torasik aorta halkalarında fenilefrin kasılmasına ait EC50 (-Log10) ve Emax değerleri ortalama ± standart hata (SH) olarak ifade edildi. Genel olarak değerlendirildiğinde idrar VMA düzeyleri ile EC50 (-Log10) değerleri arasında anlamlı düzeyde negatif korelasyon olduğu görüldü. EC50 ve Emax değerleri açısından L-NNA5, L-NNA25 ve Tuz gruplarında kontrole göre anlamlı değişim gözlenmedi. EC50 değerleri açısından TLNNA5 grubunda Kontrol ve L-NNA5 gruplarına göre anlamlı azalma tespit edildi (P<0.05). TLNNA25 grubunda ise TLNNA5 grubuna göre anlamlı artış olduğu görüldü (P<0.05). TLNNA5 ve TLNNA25 gruplarında Tuz ve L-NNA5 ve L-NNA25 gruplarına göre karşılaştırmada anlamlı oranda Emax artışı tespit edildi (P<0.05) (Tablo 2).

Tablo 2. Fenilefrin kasılmaları EC50 ve Emax değerleri

Gruplar	n	Ec50 (-Log10)	Emax / KCl*100
Kontrol	6	9.09±0.94	92.95±8.76
Tuz	6	7.19±0.21	83.55±3.58
LNNA5	6	8.98±0.64	78.23±5.16
TLNNA5	6	6.42±0.53 ¥, #	132.5±17.72 *, #
LNNA25	6	8.34±0.46	80.85±6.63
TLNNA25	6	8.16±0.52 £	116.87±11.4 *, #

¥ Kontrolle göre anlamlı farklılık vardır (P<0,05)

* L-NNA almamış gruba göre anlamlı farklılık vardır (P<0.05)

Normal tuz alan gruba göre anlamlı farklılık vardır (P<0.05)

£ 5 mg L-NNA alan gruba göre anlamlı farklılık vardır (P<0.05)

Tartışma

Bu çalışmanın bulguları, subpressör dozda NOS inhibisyonu ile beraber tuz yüklemesiyle gözlemlenen kan basıncı artışının patogenezinde, sempatik sistem aktivasyonunun katkısıyla ilgili literatürde var olan bilgileri destekleyen niteliktedir. Bunun yanında NOS enziminin inhibe edilmediği durumda, tuzlu diyetle cevap olarak sempatik sistem aktivitesinde anlamlı artışlar olmakla birlikte, tuzlu diyetin kan basıncı artışına neden olmadığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda İdrar VMA düzeyleri ile torasik aorta fenilefrin kasılma cevaplarına ait EC50 değerleri arasında negatif korelasyon olduğu tespit edilmiştir ki, bu bir reseptör down-regülasyonunu düşündürmektedir. Ayrıca, yüksek dozda NOS inhibitörü uygulamasında, subpressör doza göre karşılaştırmada, sempatik sistem aktivasyonunun anlamlı oranda düşük kaldığı gösteren bulgular elde edilmiştir.

Kan basıncının uzun süreli düzenlenmesinde nitrik oksit önemli role sahiptir (16, 17). L-arginin-NO metabolik yolunun bloke edilmesinin, hem kısa dönemde, hem de uzun dönemde renal ve sistemik damar direncinin artmasına, renal kan akımının azalmasına, idrar akımının ve sodyum atılımının azalmasına ve dolayısıyla sıçanların kan basıncı artışı ve sodyum duyarlılığına neden olduğu gösterilmiştir (6). Bu çalışmada subpressör doz olarak tanımlanan dozda NOS inhibitörü uygulaması 14 günlük sürede kan basıncında başlangıç değerlerine göre değişikliğe neden olmamıştır. Bu bulgu literatürle uyumludur (5). 25 mg/kg/gün dozda NOS inhibitörü uygulaması ise başlangıç değerlerine göre karşılaştırıldığında anlamlı kan basıncı artışına neden olmuştur. bu artışın patogenezinde en önemli faktör olarak sistemik damar direnci artışı suçlanmaktadır (6). NOS inhibitörlerinin uzun süreli uygulanmasıyla kan basıncında meydana gelen artışın sempatolitik bir ajan olan fentolamin (0.1 mg/kg i.v. bolus) infüzyonu ile dikkate değer bir şekilde önlenmesi kronik NOS inhibisyonu aracılı hipertansiyondan artmış sempatik aktivitenin sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (7, 14, 18). Bir başka çalışmada (19) mezenterik vasküler yatak bir NO vericisi ile inkübe edildiğinde dokudaki noradrenalin düzeyinin azaldığı, L-NAME ile inkübe edildiğinde ise arttığı bildirilmiş ve buna dayanarak NOS inhibisyonunda periferik sempatik aktivitede artışla kan basıncının yükseldiği ileri sürülmüştür. Laboratuvarımızda

yapılan çalışmalarda 15 mg/kg/gün uzun süreli oral L-NNA uygulaması ile meydana getirilen kan basıncı yükselmesinin santral etkili sempatolitik ajan olan klonidin ile önlenmesi de sempatik sistem aktivasyonunun, bu tip hipertansiyon modelinde kronik uygulama esnasında meydana gelen kan basıncı artışına katkısı olabileceğini düşündürmektedir (15). Ancak, akut ve yüksek dozda NOS inhibisyon çalışmalarında, sempatik sistem aktivitesinde barorefleks aracılı düşmelere işaret eden çalışmalar da mevcuttur (12, 13). Mevcut çalışmada da daha fazla kan basıncı değerlerine neden olan yüksek dozda NOS inhibisyonu yapılan gruplarda VMA değerlerinin kan basıncı artışı sağlanamayan Tuz grubundan anlamlı oranda düşük kalması bu görüşü doğrulamaktadır. Yine, kronik NOS inhibisyonu esnasında plazma katekolamin seviyelerinin değişmediğini ve ganglion blokajına artmış depresör yanıtın olmadığını gösteren karşıt bulgular içeren çalışmalar da mevcuttur (20, 21).

Mevcut çalışmanın metodolojisinde, sistemik damar direncinin belirleyici faktörlerinden biri olan sempatik sinir sisteminin ana metaboliti olan VMA idrar düzeyleri ve vasküler adrenerejik reseptörlerin duyarlılığı hakkında bilgi verebilecek olan, izole torasik aortada alfa-1 adrenerejik kasılma cevapları yer almaktadır. Subpressör dozda NOS inhibisyonu yapılan grupta kontrole göre karşılaştırmada kan basıncı artışı olmamasına karşın VMA düzeylerinde anlamlı artış görülmesi yanında, yüksek dozda NOS inhibitörü uygulanan grupta aynı düzeyde VMA artışıyla birlikte kan basıncında da anlamlı artış saptanması sempatik aktivite artışının, normal tuz diyeti alan gruplarda, yüksek dozda NOS inhibisyonu ile oluşturulan kan basıncı artışına primer olarak katılmadığını düşündürmektedir. Yine de NOS inhibisyonunun şiddeti arttıkça VMA düzeylerinin de arttığı ve ilginç olarak torasik aortada alfa-1 adrenerejik kasılma cevaplarına ait EC50 (-Log10) değerlerinin de azaldığı ve VMA ile EC50 arasında negatif korelasyon ilişkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (data gösterilmedi). Bu bulgu sempatik sistem aktivasyonu sonucunda beklenebilen reseptör down-regülasyonunu düşündürmektedir.

Yüksek tuzlu diyet ilavesinin NOS inhibisyon hipertansiyon modelindeki patojenik rolüne dair veriler ise karışıktır. Bu model hipertansiyonda tuz ilavesiyle birlikte tuzun vücutta birikiminin kan basıncında bir yükselmeyi beraberinde getirdiği (22), pressör (6) ve subpresör (4) dozda NOS inhibitörü uygulanmasının tuza duyarlılığa neden olduğu ve spontan tuza duyarlılığın ortaya çıkmasının altında yatan sebebin NO cevabının eksikliği olabileceğine dair kanıtlar içeren çalışmalar vardır. Tuza dirençli olduğu bilinen normal kan basıncı değerlerine sahip ratlarda yüksek tuz uygulaması HT geliştirmezken, tuza duyarlı ratlarda uzun süreli tuz uygulamasının kan basıncında anlamlı yükselmelere neden olduğu bilinmektedir (23-27). Bu çalışmalarla uyumlu olarak, akut NOS inhibisyonunun basınç natriürez eğrisini sağa kaydırdığı ve böylece renal sodyum atılım yeteneğinin bozulduğu rapor edilmiştir (28). NOS inhibitörleri ile birlikte yüksek tuz diyeti uygulandığında ise kan basıncının daha fazla arttığı bildirilmiştir (29). Kan

basıncındaki bu yükselmeden renal sodyum tutulumunda bir artış sorumlu tutulsa da, çelişki olarak plazma sodyum düzeyinin değişmediğini gösteren sonuçlar da vardır (30). Mevcut çalışmada, 14 gün boyunca tek başına yüksek tuz diyeti verilmesi kan basıncını değiştirmezken, subpressör dozda NOS inhibitörü uygulamasına ilave olarak yüksek tuzlu diyet verildiğinde 14. gün sonunda başlangıca göre artmış kan basıncı gözlemlendi. Aynı zamanda, yüksek dozda NOS inhibitörü uygulaması sonucu gelişen hipertansif durumun tuz ilavesiyle anlamlı oranda şiddetlendiği tespit edildi ki, bu bulgular literatürle uyumluydu (4-6, 22, 29).

Mevcut çalışmada özellikle tuzdan zengin diyetin, düşük dozda (subpressör doz) NOS inhibisyonunun kan basıncı artırıcı etkisine nasıl katkıda bulunduğunu aydınlatmak amacıyla idrarda 24 saatlik VMA düzeyleri ve vasküler adrenerjik kasılma yanıtları çalışıldı. Tek başına tuz uygulaması VMA düzeylerinde artmaya yol açmasına rağmen kan basıncını değiştirmede. Tek başına subpressör dozda L-NNA uygulaması da, VMA düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu halde kan basıncında önemli bir değişiklik yapmadı. Subpressör dozda L-NNA ile beraber yüksek tuzlu diyet (%8) uygulamasında ise VMA düzeylerinin çok yüksek değerlere ulaşması ve beraberinde anlamlı kan basıncı artışı meydana gelmesi, bu model hipertansiyonda tuzun sempatik sistem aktivasyonuna ve dolayısıyla kan basıncı artışına primer katkısı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, organ banyosu çalışmalarında en yüksek VMA değerine sahip olan TLNNA5 grubunun EC50 (-Log10) değerlerindeki anlamlı azalma tespit edilmesi (artmış sempatik aktiviteden kaynaklı olası reseptör down-regülasyonunu) bu modelde, tuzun kan basıncını artırıcı etkisine sempatik aktivite artışının katılmasına işaret edebilir.

Düşük doz L-NNA ve tek başına tuz yüklemesi yapılan gruplarda idrar VMA düzeylerinin artışına rağmen hipertansiyon gelişmemesi, sempatik sistem aktivitesinin hipertansiyon gelişmesine katılımlarını dışlayamadığı gibi, sempatik etkinliğin arttığı fakat, hipertansiyon gelişmesini indükleyecek düzeylere ulaşmadığına işaret edebilir. NOS inhibisyonunda plazma noradrenalin düzeyinin

değişmediğini gösteren çalışmalar mevcut olmakla beraber bu durum noradrenalin siklusundaki bir artış dışlayamamaktadır. Üstelik noradrenalin düzeyi değişmese dahi vasküler yataklarda sempatik duyarlılıkta meydana gelen bir artışın periferel vazokonstriksiyona ve dolayısıyla kan basıncının yükselmesine neden olabileceği muhtemeldir (13).

Yapılan araştırmalar özellikle yüksek doz NOS inhibitörleri ile oluşturulan hipertansiyona böbrek, kalp ve damarlarda meydana gelen kalıcı yapısal ve/veya fonksiyonel değişikliklerin katkıda bulunabileceğine dair bulgular içermektedir (31, 32). Yüksek doz L-NAME uygulamasında, kardiyovasküler hipertrofi, renal arteriyollerde duvar kalınlaşması, fokal glomerüler kollaps, interstisyel ekspansiyon ve tübüler atrofiyi içeren yapısal hasar bulguları bildirilmektedir (31-34). Düşük dozda fakat uzun süreli (5mg/kg/gün 2 ay ve 10 mg/kg/gün 3 hafta) L-NAME uygulandığında glomerüler skleroz ve renal vasküler duvar hasarı gözlenirken, 3 haftadan daha kısa sürelerde ise herhangi bir yapısal hasar gözlenmemiştir (35, 36). Uzun süreli uygulamada, kullanılan NOS inhibitörlerinin dozlarının düşük olmasına rağmen dokularda yapısal hasar meydana gelmesi, kronik NOS inhibisyonu aracılı hipertansiyonda yapısal hasarların kullanılan NOS inhibitörünün dozu kadar uygulama süresiyle de ilişkisinin önemine işaret edebilir. Bu çalışmada histopatolojik teknikler kullanılmadığından renal yapılarda meydana gelebilecek yapısal değişiklikler hakkında bilgimiz kısıtlıdır. Fakat yukarıda da değinildiği gibi mevcut çalışmada uygulanan dozlar ve uygulama sürelerinin literatürde belirtilmiş olan patolojilerin oluşması için rapor edilen sürelerden kısa olması, renal dokuda özellikle glomeruler yapıda dikkate değer bir değişimin olmadığını düşündürmektedir.

Sonuçta, bu çalışmanın bulgularına göre, subpressör dozda NOS inhibitörü ve beraberinde yüksek tuz içeren diyet uygulamasıyla HT gelişmesinde, sempatik sistem aktivitesinde artışının önemli katılımcı olabileceği, daha yüksek kan basıncı değerlerine neden olan NOS blokajında ise muhtemel refleks mekanizmalar üzerinden sempatik sistem aktivitesinin kana basıncına daha az oranda katılımcı olabileceği ileri sürülebilir.

Kaynaklar

1. Armas-Padilla MC, Armas-Hernandez MJ, Sosa-Canache B, et al. Nitric oxide and malondialdehyde in human hypertension. *Am J Ther* 2007; 14: 172-176.
2. Camilletti A, Moretti N, Giacchetti G, et al. Decreased nitric oxide levels and increased calcium content in platelets of hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2001; 14: 382-386.
3. Gardiner SM, Kemp PA, Bennett T, Palmer RM, Moncada S. Nitric oxide synthase inhibitors cause sustained, but reversible, hypertension and hindquarters vasoconstriction in Brattleboro rats. *European journal of pharmacology* 1992; 213: 449-451.
4. Salazar FJ, Pinilla JM, Lopez F, Romero JC, Quesada T. Renal effects of prolonged synthesis inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 1992; 20: 113-117.
5. Yamada SS, Sasaki AL, Fujihara CK, et al. Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. *Hypertension* 1996; 27: 1165-1172.
6. Tolins JP, Shultz PJ. Endogenous nitric oxide synthesis determines sensitivity to the pressor effect of salt. *Kidney Int* 1994; 46: 230-236.
7. Scrogin KE, Hatton DC, Chi Y, Luft FC. Chronic nitric oxide inhibition with L-NAME: Effects on autonomic control of the cardiovascular system. *Am J Physiol* 1998; 274: 367-374.
8. Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RM, Moncada S. Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 10-12.

9. Aggarwal A, Esler MD, Morris MJ, Lambert G, Kaye DM. Regional sympathetic effects of low-dose clonidine in heart failure. *Hypertension* 2003; 41: 553-557.
10. Grassi G, Turri C, Seravalle G, et al. Effects of chronic clonidine administration on sympathetic nerve traffic and baroreflex function in heart failure. *Hypertension* 2001; 38: 286-291.
11. Greenwood JP, Stoker JB, Mary DA. Single-unit sympathetic discharge: Quantitative assessment in human hypertensive disease. *Circulation* 1999; 100: 1305-1310.
12. Liu JL, Murakami H, Zucker IH. Angiotensin II-nitric oxide interaction on sympathetic outflow in conscious rabbits. *Circ Res* 1998; 82: 496-502.
13. Ramchandra R, Barrett CJ, Malpas SC. Nitric oxide and sympathetic nerve activity in the control of blood pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32: 440-446.
14. Sander M, Hansen J, Victor RG. The sympathetic nervous system is involved in the maintenance but not initiation of the hypertension induced by N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester. *Hypertension* 1997; 30: 64-70.
15. Oktar S, İlhan S, Aksulu HE. Clonidine prevents development of hypertension in N (omega)-nitro-L-arginine-treated rats. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi* 2008; 8: 104-110.
16. Raji L, Baylis C. Glomerular actions of nitric oxide. *Kidney Int* 1995; 48: 20-32.
17. Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol* 1997; 272: 561-578.
18. Zanchi A, Schaad NC, Osterheld MC, et al. Effects of chronic NO synthase inhibition in rats on renin-angiotensin system and sympathetic nervous system. *Am J Physiol* 1995; 268: 2267-2273.
19. Kolo LL, Westfall TC, Macarthur H. Nitric oxide decreases the biological activity of norepinephrine resulting in altered vascular tone in the rat mesenteric arterial bed. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: 296-303.
20. A KL, Foucart S, Moreau P, et al. Sympathetic functions in NG-nitro-L-arginine-methyl-ester-induced hypertension: modulation by the renin-angiotensin system. *Journal of Hypertension* 1998; 16: 63-76.
21. A KL, Wu L, Foucart S, de Champlain J. Impaired basal sympathetic tone and alpha1-adrenergic responsiveness in association with the hypotensive effect of melatonin in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension* 1998; 11: 219-229.
22. Salazar FJ, Alberola A, Pinilla JM, Romero JC, Quesada T. Salt-induced increase in arterial pressure during nitric oxide synthesis inhibition. *Hypertension* 1993; 22: 49-55.
23. Ni Z, Vaziri N. Effect of salt loading on nitric oxide synthase expression in normotensive rats. *American journal of hypertension* 2001; 14: 155-163.
24. Miyajima E, Bunag R. Dietary salt loading produces baroreflex impairment and mild hypertension in rats. *Am J Physiol* 1985; 249: 278-84.
25. Michel H, Meyer-Lehnert H, Backer A, Stelkens H, Kramer H. Regulation of atrial natriuretic peptide receptors in glomeruli during chronic salt loading. *Kidney Int* 1990; 38: 73-79.
26. Debinski W, Kuchel O, Buu N, et al. Effect of prolonged high salt diet on atrial natriuretic factor in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990; 194: 251-257.
27. Osborn J, Hornfeldt B. Arterial baroreceptor denervation impairs long-term regulation of arterial pressure during dietary salt loading. *Am J Physiol* 1998; 275: 1558-1566.
28. Majid DS, Williams A, Navar LG. Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates pressure-induced natriuretic responses in anesthetized dogs. *Am J Physiol* 1993; 264: 79-87.
29. Yuasa S, Li X, Hitomi 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.
30. Hu L, Manning RD, Jr Brands MW. Long-term cardiovascular role of nitric oxide in conscious rats. *Hypertension* 1994; 23: 185-194.
31. Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 1998; 32: 958-964.
32. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992; 20: 298-303.
33. Ribeiro MO, Antunes E, Muscara MN, De Nucci G, Zatz R. Nifedipine prevents renal injury in rats with chronic nitric oxide inhibition. *Hypertension* 1995; 26: 150-155.
34. Morton JJ, Beattie EC, Speirs A, Gulliver F. Persistent hypertension following inhibition of nitric oxide formation in the young Wistar rat: Role of renin and vascular Hypertrophy. *Journal of hypertension* 1993; 11: 1083-1038.
35. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992; 90: 278-281.
36. Qiu C, Muchant D, Beierwaltes WH, Racusen L, Baylis C. Evolution of chronic nitric oxide inhibition hypertension: relationship to renal function. *Hypertension* 1998; 31: 21-26.