



Klopidogrelin Dişi Sıçanlarda Bronş Düz Kas Kasılması Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

İhsan SERHATLIOĞLU^{1, a}
Emine KAÇAR^{2, b}
Hüsna BATMAZ^{2, c}
Orhan SAYIN^{2, d}
Ahmet Sait BOZYIL^{2, e}
Mehtap PERVİN^{2, f}
Münever Gizem HEKİM^{3, g}
Mehmet Rıdvan ÖZDEDE^{2, h}

¹ Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Biyofizik Ana Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Ana Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

³ Fethi SEKİN Şehir
Hastanesi,
Fizyoloji Bölümü,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-2384-7971

^b ORCID: 0000-0002-1585-7248

^c ORCID: 0009-0009-7466-2967

^d ORCID: 0000-0003-1813-2311

^e ORCID: 0009-0006-2768-5224

^f ORCID: 0009-0000-3660-2909

^g ORCID: 0000-0002-6697-8795

^h ORCID: 0000-0001-9977-9023

Geliş Tarihi : 31.05.2024

Kabul Tarihi : 12.06.2024

Yazışma Adresi Correspondence

Hüsna BATMAZ
Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Ana Bilim Dalı
Elazığ – TÜRKİYE

hnn_33@outlook.com

Giriş ve Amaç: Klopidogrel, platelet agregasyonunu inhibe eden antitrombositler bir ajandır. Sıklıkla koroner arter hastalığı gibi damar kan akımının bozulduğu durumlarda ve tedavi sonrası idame olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu denli sıklıkla kullanılıyor olması kardiyovasküler sistem üzerine olan etkileri dışında diğer sistemler üzerindeki etkilerinin de incelenmeye değer olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca daha önce yapılan bir çalışmada da klopidogrelin mesane düz kası üzerinde inhibitör etkinliği olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda bu çalışma ile bir başka düz kas dokusuna sahip olan bronş üzerinde klopidogrelin olası etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Yöntem: Bu çalışmada erişkin (8-10 haftalık) Sprague-Dawley cinsi dişi ratlar kullanıldı (n=9). Ratlar diöstrusta fazında dekapite edildi ve ana bronşları izole edildi. Elde edilen bronşlardan 3 mm'lik halka şeklinde stripler elde edildi. Bronşlar, krebs solüsyonu içeren izole organ banyolarına asıldı. Regülasyon süreci tamamlandıktan sonra 0.1 µM ve 10 µM dozlarında klopidogrel non-kümülatif olarak verildi ve aynı işlem 10 µM asetilkolin (Ach) ile indüklenen bronşlar üzerinde de tekrarlandı. Klopidogrel'in etkileri maksimal kasılma amplitüdü (E_{max}) ve izometrik kontraktilite indeksleri açısından değerlendirildi. Elde edilen veriler yüzde olarak normalize edildi ve eşleştirilmiş t-testi (SPSS 22.0) kullanılarak analiz edildi.

Bulgular: 0.1 µM ve 10 µM klopidogrel uygulamasının E_{max} değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farka neden olmadığı görüldü. Ach ile indüklenmiş bronş düz kasında ise 0.1 µM klopidogrel uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmazken 10 µM'lık doz E_{max} değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olmuştur (P<0.05).

Sonuç: Klopidogrel uygulamasının, Ach ile indüklenen bronş düz kasında kasılma üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu görüldü. Bu etki, klopidogrelin klinik kullanımında göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Bronş, klopidogrel, izometrik kasılma, düz kas, izole organ banyosu

Investigation of the Effects of Clopidogrel on Bronchial Smooth Muscle Contraction in Female Rats

Aim: Clopidogrel is an antiplatelet agent that inhibits platelet aggregation. It is frequently used in cases of impaired vascular blood flow such as coronary artery disease and as maintenance after treatment. The fact that it is used so frequently suggests that its effects on other systems besides its effects on the cardiovascular system are worthy of investigation. In addition, clopidogrel has been shown to have inhibitory activity on bladder smooth muscle in a previous study conducted by us. Therefore we aimed to investigate the possible effects of clopidogrel on bronchus.

Methods: Adult female Sprague-Dawley rats (n=9) were used. The rats were decapitated in diestrus and their main bronchi were isolated. 3 mm ring-shaped strips were obtained from the bronchi. Bronchi were suspended in isolated organ baths. After the completion of the regulation process, 0.1 µM and 10 µM doses of clopidogrel were administered non-cumulatively and the same procedure was repeated on 10 µM acetylcholine (Ach)-induced bronchi. The effects of clopidogrel were evaluated in terms of maximal contraction amplitude (E_{max}) and isometric contractility indices. The data obtained were normalized as percentages and analyzed using paired t-test.

Results: 0.1 µM and 10 µM clopidogrel administration did not cause a statistically significant difference in E_{max} value. In Ach-induced bronchial smooth muscle, 0.1 µM clopidogrel administration did not cause a statistically significant change, while 10 µM dose caused a statistically significant decrease in E_{max} values (P<0.05).

Conclusions: Clopidogrel administration had an inhibitory effect on Ach-induced contraction of bronchus. This effect should be considered in the clinical use of clopidogrel.

Key Words: Bronchus, clopidogrel, isometric contraction, smooth muscle, isolated organ bath

Giriş

Kaslar, kimyasal enerjiyi kasılma ve gevşeme yoluyla mekanik işe dönüştüren özelleşmiş dokulardır. Kas dokusu, kendini oluşturan kas iplikçiklerinin morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre çeşitlilik gösterir (1). Bu dokulardan biri olan düz kas dokusu, mekik şeklinde, tek çekirdek taşıyan ve çizgilenme göstermeyen hücrelerden oluşur (2). Düz kas dokusu organizmada dağınık veya gruplar halinde bulunabilir ve de genellikle iç organların duvarlarını tabakalar şeklinde çevreler (1, 2). Uterus, mesane, mide, trakea

ve bronş düz kas içeren yapılardan bazılarıdır. Bronşun temel fonksiyonu, kasılıp gevşeme yoluyla bronşiyal çapı düzenleyerek hayati önemi olan akciğer havalanmasının organize edilmesidir (3). Bu nedenle bronşiyal düz kas kontraktil aktivitesini değiştirme ihtimali olan her ajanın bu olası etkisinin bilinmesi önem arz etmektedir.

Klopidogrel, tienopiridin derivesi olup trombosit adenozin difosfat (ADP) reseptör antagonisti olarak antitrombositler tedavi amacıyla kullanılan bir ajandır (4). Glikoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) kompleksinin ADP aracılığı ile gerçekleşen aktivasyonunu engelleyerek etki gösterir. Klinikte, koroner stent uygulamalarının takibi, akut koroner sendrom ve miyokart infarktüsü gibi antiagregan etkinin oluşmasının istendiği durumlarda kullanılır (5). Kullanılan hasta grubu açısından, antiagregan etkisinin yanı sıra damar kontraktil aktivitesi üzerindeki etkinliği de önem arz etmektedir. Bu konu kapsamında, literatürde yapılan bir çalışmada (6) klopidogrel'in sıçan aort düz kası üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada görülen etkinin üzerine yapılan diğer bir çalışmada ise klopidogrel'in mesane düz kası üzerindeki etkinliği incelenmiş ve bu düz kas üzerinde de inhibitör etkinliği tespit edilmiştir (7).

Bu bilgiler ışığında, kontraktil aktivite değişiminin hayati önem taşıdığı bronş kontraksiyonu üzerindeki etkinliğinin de tespiti önemlidir. Bu çalışmanın amacı da klopidogrel'in bronş düz kasının kontraksiyonu üzerindeki olası etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma için Fırat Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul izni alınmıştır (Protokol no:2023/22-07).

Bu çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden temin edilen, vücut ağırlıkları 200-220 g arasında olan Sprague-Dawley (8-10 haftalık) cinsi dişi intak sıçanlar kullanıldı (n=9). Sıçanlar, 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsüne sahip, düzenli olarak havalandırılan 21±2 °C sıcaklığındaki odada, plastik kafeslerde tutuldu. Çeşme suyu ve pelet formundaki rat yemleri ad-libitum olarak verildi.

Sıçanlar deneysel işlemin yapılacağı sabah saat 9:00'da pastör pipetleri ile yapılan vajinal smear sonucu menstrual siklusun hangi evresinde olduğu tespit edildi. Sürecin hormonal değişimlerden etkilenmemesi amacıyla smear sonucu diöstrus fazında olduğu tespit edilen hayvanlardan bronş dokuları alındı. Hayvanların dekapitasyon işlemi sabah saat 11.00'de yapıldı. Sıçanlar deney gününde anestezik maddelerin düz kas kontraktil aktivitesini etkileyebilmesi nedeniyle anestezisi uygulanmaksızın dekapite edilerek sağ ve sol ana bronş dokuları lümen yapıları korunacak şekilde hızlıca eksize edildi. Elde edilen bronş dokuları Krebs solüsyonu içeren petri kaplarına alındı.

Deney süresince düzeneğin sıcaklığı 37°C olacak şekilde takip edildi. Banyoların içerisindeki krebs solüsyonları %95 O₂, %5 CO₂ olacak şekilde oksijenize edildi. Sağ ve sol ana bronşların her birinden birer tane

olmak üzere 3'er mm genişliğinde sirküler kesitler alındı. Hazırlanan stripler, Krebs solüsyonu (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 15.8 mM NaHCO₃, 1.18 mM KH₂PO₄, 11.5 mM glukoz ve 2.4 mM CaCl₂, 0.016 mM EDTA) içeren organ banyolarına lümeden karşılıklı 2 çengel geçecek şekilde asıldı ve 1.5 gram gerim uygulandı. Dokuların düzeneğe adaptasyonu için 15 dakikada bir krebs solüsyonu yenilenerek 60 dakika boyunca takip edildi (6, 7).

Öncelikle klopidogrel'in spontan bronş dokusundaki aktivitesini görmek amacıyla 0.1 µM ve 10 µM klopidogrel nonkümülatif olarak verildi. Dozların arasında krebs solüsyonu yenilenerek 90 dakika boyunca 15 dakikada bir yıkama yapılarak etken maddenin ortamdan ve dokudan uzaklaşması sağlandı. Ardından klopidogrel'in asetilkolin (Ach) ile kasılması indüklenmiş bronş dokusundaki etkisini değerlendirmek amacıyla 10 µM Ach uygulaması yapılarak 10 dakikalık takibin ardından Ach ile indüklenmiş banyoya 0.1 µM klopidogrel eklendi ve bu işlem 10 µM klopidogrel için de tekrar edildi. Yine klopidogrel uygulamasının ardından etken maddelerin ortamdan uzaklaştırılması için 90 dakika boyunca 15 dakikada bir yıkama yapıldı (Şekil 1) (7).

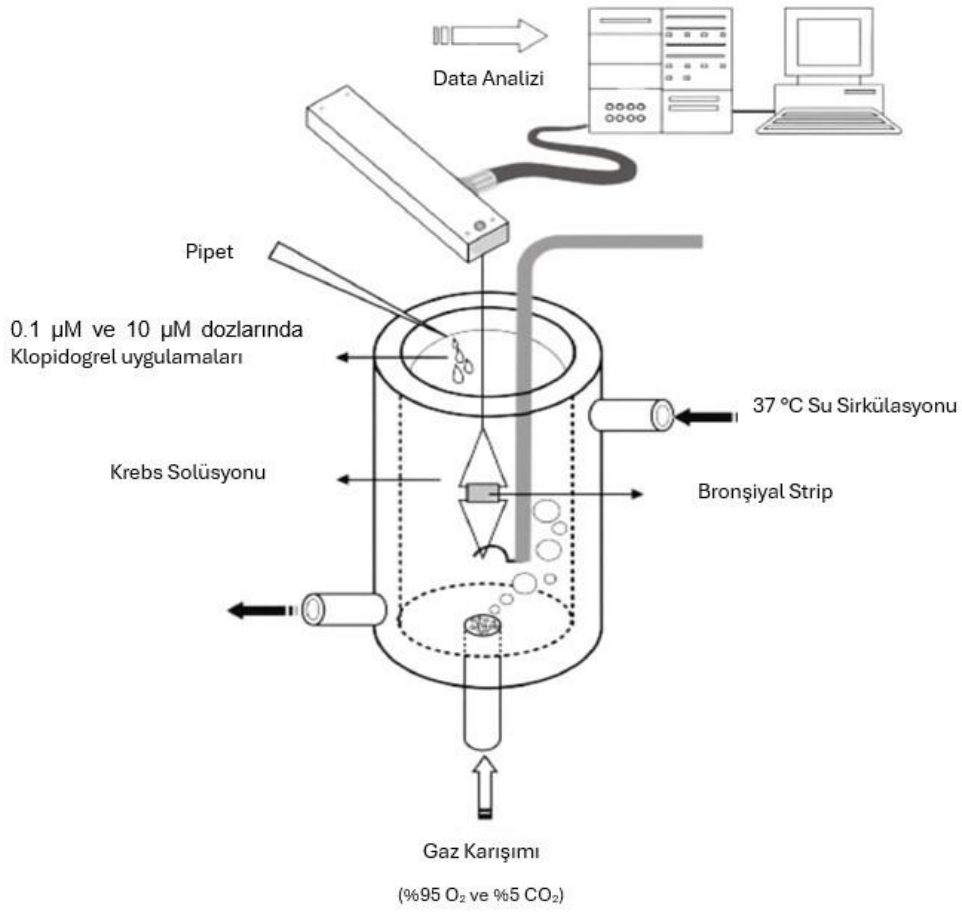
İstatistiksel Analiz: Klopidogrel'in etkileri E_{max} ve izometrik kontraktilite indeksleri açısından değerlendirildi. Elde edilen veriler yüzde olarak standardize edildi. Elde edilen verilerin normal dağıldığı Shapiro-Wilk testi ile doğrulandı. SPSS 22.0 programında eşleştirilmiş t-testi kullanılarak analiz edildi. P değerinin 0.05'ten küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

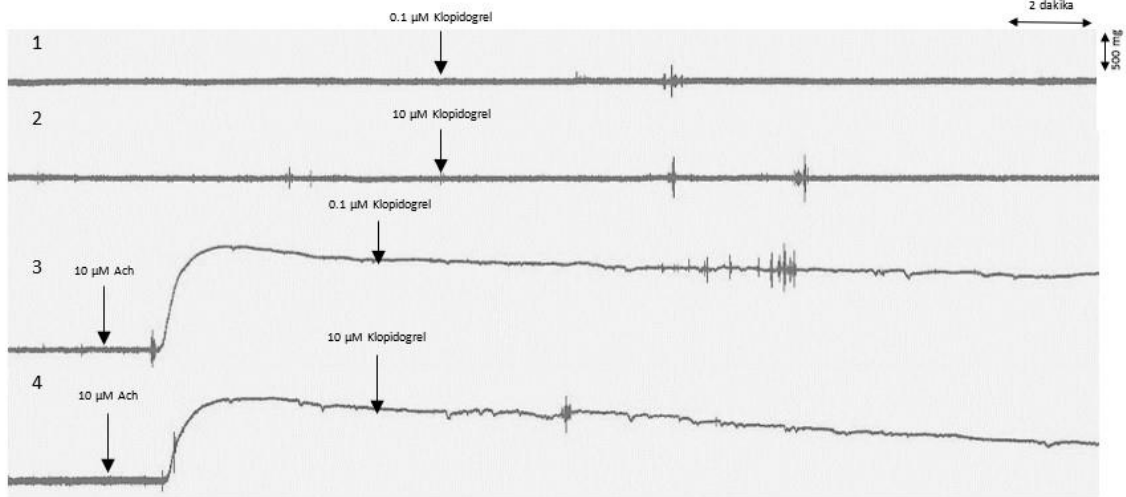
0.1 µM ve 10 µM klopidogrel uygulamasının Ach ile indüklenmemiş bronşta E_{max} değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farka neden olmadığı görüldü. Ach ile indüklenmiş bronş düz kasında ise 0.1 µM klopidogrel uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmazken 10 µM'lık doz E_{max} değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olmuştur (P<0.05) (Şekil 2, Şekil 3, Tablo 1).

Tablo 1. Klopidogrel uygulaması öncesi ve sonrası ortalama ± standart hata (SH) değerleri

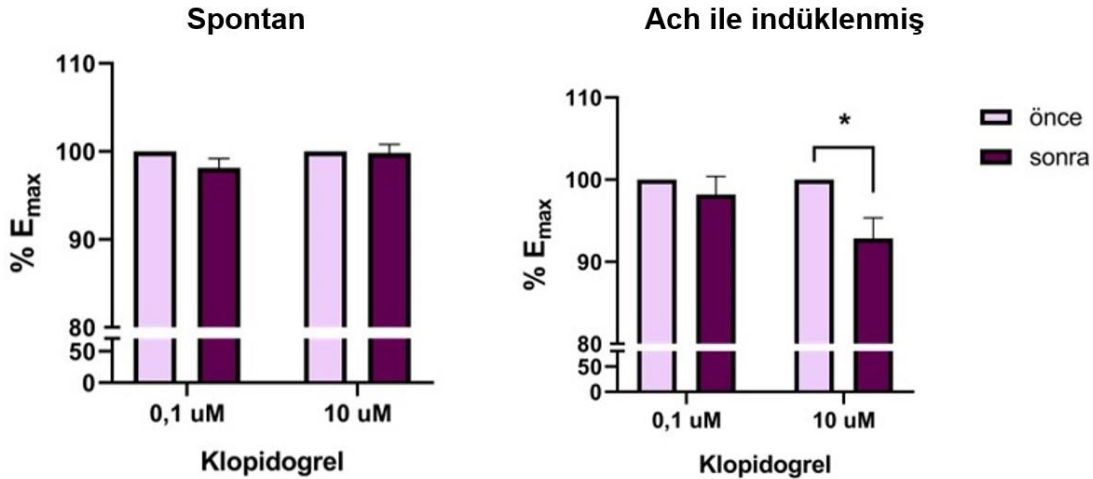
Değişkenler	%E _{max}	Ortalama ± SH	P değeri
Klopidogrel 0.1 µM Öncesi		100 ± 0	
Klopidogrel 0.1 µM Sonrası		98.12 ± 1.05	0.113
Klopidogrel 10 µM Öncesi		100 ± 0	
Klopidogrel 10 µM Sonrası		99.81 ± 0.96	0.855
Ach + Klopidogrel 0.1 µM Öncesi		100 ± 0	
Ach + Klopidogrel 0.1 µM Sonrası		98.18 ± 2.21	0.435
Ach + Klopidogrel 10 µM Öncesi		100 ± 0	
Ach + Klopidogrel 10 µM Sonrası		92.82 ± 2.52	0.022



Şekil 1. İzole Organ Banyosu



Şekil 2. İzole organ banyosunda elde olunan kontraksiyon traseleri. (1 numaralı trase: indüklenmemiş bronş dokusu + 0.1 μM klopidogrel; 2 numaralı trase: indüklenmemiş bronş dokusu + 10 μM klopidogrel; 3 numaralı trase: Ach ile kasılması indüklenmiş bronş dokusu + 0.1 μM klopidogrel; 4 numaralı trase: Ach ile kasılması indüklenmiş bronş dokusu + 10 μM klopidogrel)



Şekil 3. Kasılmanın ortalama %E_{max} ± SH değerleri (*P=0.022)

Tartışma

Bu çalışmada klinikte antiagregan olarak kullanılan klopidogrelin Ach ile indüklenmiş bronş düz kası üzerinde doz bağımlı olarak inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar klopidogrelin direkt bronkodilatör etkisi olmasa da bronkokonstrüksiyon üzerinde inhibitör etkili olabileceğini düşündürmüştür.

Klopidogrel, trombosit aktivasyonu ile ilişkili çeşitli arteriyel bozuklukların tedavisinde hali hazırda kapsamlı klinik denemelerden geçen, tiyopiridin türevi, trombositler üzerindeki P2Y₁₂ reseptörünün geri dönüşümsüz inhibisyonu yoluyla anti-trombotik aktiviteye sahip, yaygın olarak reçete edilen ilaçtır (8, 9).

Farmakolojik etkisinin önerilen mekanizmasının, trombosit yapışması/agregasyonu ve diğer aktivasyon süreçleri üzerinde ADP aracılı doğrudan ve dolaylı etkilerin inhibisyonu olduğuna inanılırken, gözlemlenen diğer birkaç farmakolojik etki, bu ilacın ayrıca ek etki bölgelerine sahip olabileceğini düşündürmektedir (10).

Yang ve ark. (8) yaptığı bir çalışmada tavşan ve sıçan vasküler düz kasında serotonin ve endotelin-1 yoluyla oluşan kasılmayı klopidogrelin inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu etki anti-ADP ajanlarının serotonin ve endotelin-1 tarafından indüklenen kasılmayı doğrudan inhibe ettiğini göstermiştir.

Kuszynski ve ark. (11) 2021 yılında yayınlanan bir çalışmada klopidogrelin orta serebral arter üzerinde P2Y₂ aracılı vazokonstriksiyonu önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir. Başka bir çalışmada ise Schäfer ve ark. (12) deneysel kronik kalp yetmezliği modeli üzerinde klopidogrel ile oluşturulan kronik P2Y₁₂ blokajının adenilat siklaz aktivasyonunu inhibe ettiğini ve böylece miktarı artan siklik adozin monofosfat'ın endotelial nitrik oksit sentetaz aktivasyonunu artırarak nitrik oksit

aracılı endotel fonksiyonlarını normalize ettiğini göstermişlerdir.

Froldi ve ark. (13) önceden hepatik biyoaktivasyon olmaksızın incelenen damara uygulanan klopidogrel, sıçan kuyruk ve kaudal arterinde gevsemeye neden olan doğrudan hedef dışı bir etki gözlemlenmiştir. Yine diğer bir çalışmada (7) ise klopidogrelin diğer bir düz kas olan mesane düz kasının kasılması üzerinde doz bağımlı olarak inhibitör etkili olduğunu göstermişlerdir.

P2Y reseptörlerinin göreceli ekspresyonu düz kas yapısına sahip dokular arasında farklılık gösterir ve bu nedenle purinerjik modülatörlerin etkileri değerlendirilirken bu farklılık göz önünde bulundurulmalıdır (14-16). Klopidogrel damar sistemini hem akut hem de kronik olarak etkilemektedir. Akut tepkiler, vazodilatasyonun indüksiyonu ve vazokonstriksiyonun inhibisyonu dahil olmak üzere vasküler fonksiyonun modülasyonu ile ilgilidir. Kronik tepkiler, vasküler yeniden yapılanmanın düzenlenmesi ve anjiyogenezin inhibisyonu dahil olmak üzere damar yapısındaki değişiklikleri içermektedir (9). Elde edilen sonuçlar ve literatür bilgileri ışığında klopidogrelin bronkokonstrüksiyon üzerinde görülen inhibitör etkisinin P2Y₁₂ reseptörü antagonizması yolu ile ortamdaki nitrik oksit miktarının artmasına neden olarak ortaya çıkması olasıdır.

Bu çalışmada klopidogrelin bronkokonstrüksiyon üzerindeki inhibitör etkisini hangi yolak üzerinden gerçekleştirdiğinin araştırılmamış olması, IC50 değerinin hesaplanamamış olması ve pre-klinik bir çalışma olması kısıtlılıklar arasındadır. Ancak elde edilen veriler daha ileri çalışmalar ile desteklenerek klopidogrelin bu etkisinin daha ayrıntılı olarak ortaya konulması gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Serbest K, Eldođan O. İskelet kaslarının yapısı ve biyomekaniği. *Academic Platform-Journal of Engineering and Science* 2014; 2: 41-51.
2. Prosser CL. Smooth muscle. *Annual Review of Physiology* 1974; 36: 503-535.
3. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994; 372: 231-236.
4. Savi P, Nurden P, Nurden et al. Clopidogrel: A review of its mechanism of action. *Platelets* 1998; 9: 251-255.
5. Sađdilek E, Özdemir B, Özlük K, et al. Kardiyovasküler hastalarda antitrombotik tedaviye yanıtın optik agregometre ve PFA-100 ile incelenmesi. *Uludađ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 36: 11-18.
6. Tarhan O. Sıçan Aortunda Kasılma – Gevşeme Mekanizması Üzerine Klopidogrel'in Etkileri. *Tıpta Uzmanlık Tezi, Elaziđ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2017.*
7. Kacar E, Serhatlioglu I. Clopidogrel inhibits acetylcholine-induced contractions of urinary bladder in rat. *Annals Medical Research* 2019; 26: 459-463.
8. Yang LH, Fareed J. Vasomodulatory action of clopidogrel and ticlopidine. *Thrombosis Research* 1997; 86: 479-491.
9. Kuszynski DS, Lauver DA. Pleiotropic effects of clopidogrel. *Purinergic Signalling* 2022; 18: 253-265.
10. Grzesk G, Kozinski M, Navarese EP, et al. Ticagrelor, but not clopidogrel and prasugrel, prevents ADP-induced vascular smooth muscle cell contraction: A placebo-controlled study in rats. *Thrombosis research* 2012; 130: 65-69.
11. Kuszynski DS, Christian BD, Dorrance AM, et al. Clopidogrel treatment inhibits P2Y2-mediated constriction in the rabbit middle cerebral artery. *European Journal of Pharmacology* 2021; 911: 174545.
12. Schäfer A, Fraccarollo D, Pfürtsch S, et al. Clopidogrel improves endothelial function and NO bioavailability by sensitizing adenylyl cyclase in rats with congestive heart failure. *Basic Research in Cardiology* 2011; 106: 485-494.
13. Foldi G, Bertin R, Dorigo P, et al. Endothelium-independent vasorelaxation by ticlopidine and clopidogrel in rat caudal artery. *J Pharm Pharmacol* 2011; 63: 1056-1062.
14. An X, Jiang G, Cheng C, et al. Inhibition of platelets by clopidogrel suppressed Ang II-Induced Vascular Inflammation, Oxidative Stress, and Remodeling. *J Am Heart Assoc* 2018; 7: e009600.
15. Giachini FRC, Osmond DA, Zhang S, et al Clopidogrel, independent of the vascular P2Y12 receptor, improves arterial function in small mesenteric arteries from AngII-hypertensive rats. *Clin Sci* 2010; 118: 463-471.
16. Giachini FR, Leite R, Osmond DA, et al. Anti-platelet therapy with clopidogrel prevents endothelial dysfunction and vascular remodeling in aortas from hypertensive rats. *PLoS ONE* 2014; 9: e91890.