

ASETİLKOLİNİN İN VİTRO VEZİKÜLA SEMİNALİS KONTRAKSİYONLARINA ETKİSİ

EFFECT OF ACETHYLCHOLINE ON IN VITRO CONTRACTILITY OF SEMINAL VESICLES

İrfan ORHAN*, Rahmi ONUR*, Ahmet AYAR**, Cemal TAŞDEMİR*

* Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

** Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

ABSTRACT

Introduction: Seminal vesicles play important roles in male fertility by both their secretions and contractile characteristics. With the intense muscle mass in their wall and contractile features of these muscles, they are not only involved in fertility but also in ejaculation period. Since involved in ejaculation, regulations of tonus of this muscle will erve a new approach to the premature ejaculation that is among to the most common male sexual dysfunction. Determination of involvement of purinergic system in the innervation of these vesicles which is known to have sympathetic as well as parasympathetic innervations has lead to the investigation of mechanisms involved in the regulation of this organ. In the present experimental study, it was aimed to determine the effects of acetylcholine (ACh) on the contractility of isolated seminal vesicle.

Materials and Methods: Seminal vesicle strips used in this study were isolated from 200-250 g male Wistar rats.

Following decapitation, the lower abdomen was opened and seminal vesicles were removed and about 0.5 x 0.2 cm strips were obtained. The strips were placed in were placed in a jacketed organ bath containing Krebs' solution at 37°C and pH 7.4, constantly gassed with 95% O₂-5% CO₂ and after equilibration under one gram of resting tension isometric contractions were recorded.

After equilibration under 1 gram of resting tension, a 10-minute control recording was performed from strips those developed spontaneous contractions. At the end of this period ACh (10 µM) was applied to the organ bath to induce contractions and then atropine was applied to determine its effect on these ACh-induced contractions. Amplitude (mg) and frequency (number of contractions/10-min) of contractions and area under the contraction curves were evaluated by 10-minute intervals.

Results: Spontaneous contractions, even small, were developed in strips studied during the equilibration period. Maximal contractile response to the acetylcholine 10⁻⁹, 10⁻⁶ and 10⁻⁵ M were recorded. The mean maximal contractile response to ACh (10⁻⁹, 10⁻⁶ and 10⁻⁵ M) were 0.7±1.4 mg, 985±145 mg and 1189±156 mg, respectively. Atropine was inhibited the ACh-induced contractile responses by an immediately started effect. Atropine (1 micro molar) inhibited the area under the contractile curve induced by 10⁻⁵ M ACh by 85%; which was reached to a complete inhibition within 220±35 s of atropine application.

Conclusion: In rat seminal vesicle ACh causes contractions, which are, can be inhibited by atropine. Investigation of the effects of variety of specific agents on these contractions is of interest with respect to the development of therapy for male infertility and premature ejaculation.

Key words: Seminal vesicle, acetylcholine, contractility

ÖZET

Veziküla seminalisler gerek sekresyonları ve gerekse de kontraktıl özellikleri ile erkek fertilitesinde önemli rol oynayan organlardır. Hem sempatik hem de parasempatik sinir sistemi tarafından inerve edilen veziküla seminalislerin, ayrıca pürinerjik uyarımlarla da inerve edildikleri belirlenmiştir. Bu çalışmada da deneysel olarak asetilkolinin veziküla seminalis kas kontraksiyonlarına etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmada 200-250 g ağırlığında, erişkin erkek Wistar sıçanlardan izole edilen veziküla seminalis kesitleri kullanıldı. Hayvanlar dekapite edildikten sonra veziküla seminalisleri alındı ve 0.5x0.2 cm boyutlarında kesitler hazırlandı. Hazırlanan kesitler, içerisinde %95 oksijen ve %5 karbondioksitle sürekli gazlandırılan 37°C'de Krebs solüsyonu bulunan ısı ceketli çift çepirli izole organ banyosunda 1 gramlık istirahat gerimi altında asılarak izometrik kasılmaları kayıt edildi. Asetil kolin (10 µM Ach) organ banyosuna uygulanarak kasılmalar indüklendi. İlave olarak atropin uygulanarak asetilkolinle indüklenen kontraksiyonlar üzerine etkileri incelendi. Kasılmaların amplitütleri miligram (mg) olarak, frekansları ise kasılma sayısı (kasılma sayısı/ 10dakika) olarak hesaplandı.

Dergiye Gönderme Tarihi: 09.02.2004

Yayına Kabul Tarihi: 04.05.2004 (Düzeltilmiş hali ile)

Asetilkolinin konsantrasyona bağımlı bir şekilde izole sıçan seminal vezikül kesitlerinde kasılmalara yol açtı. 10^{-9} , 10^{-6} ve 10^{-5} M'lık ACh ile indüklenen kasılmaların maksimum değerleri sırasıyla 0.7 ± 1.4 mg, 985 ± 145 mg ve 1189 ± 156 mg idi. Atropin uygulaması ACh ile indüklenen kasılma yanıtını hemen başlayan bir etki ile tamamen inhibe etti.

Asetilkolin, veziküla seminalislerde atropinle inhibe edilebilen aktif kontraksiyonlara sebep olmaktadır. Bu kontraksiyonların çeşitli spesifik droglarla manüplasyonu gerek erkek infertilitesinde, gerekse prematüre ejakülasyon tedavisinde araştırılması gereken yeni konulardır.

Anahtar Kelimeler: Veziküla seminalis, asetil kolin, kontraktile

GİRİŞ

Veziküla seminalisler erkek reproduktif traktunda, vaz deferens ampüllası ile birleşerek ejakülatör kanalları oluşturan ve yoğun kas yapısına sahip kontraktıl organlardır¹. Özellikle sekresyonları ile fertilitede etkili olan veziküla seminalislerin fonksiyonel değerlendirmelerinde, sperm hücrelerinin temel enerji kaynağı olan fruktoz ve semenin koagülasyonunu sağlayan seminojelin kullanılan başlıca parametreler olmuştur².

Son yıllarda, veziküla seminalislerin sadece sekresyonları ile değil, musküler yapıları nedeni ile de sperm transportunda etkili olabilecekleri gündeme gelmiştir^{1,3}. Bu nedenle çok çeşitli nörotransmitterlerle fonksiyonu regüle edilen veziküla seminalislerin, inervasyon bozukluklarında ortaya çıkabilecek fonksiyonel obstrüksiyonların, özellikle idiyopatik infertil erkek popülasyonun değerlendirilmesinde gerekliliği ortaya çıkmıştır³.

Hem sempatik, hem parasempatik sinirlerle inerve edilen bu yapıların fonksiyonel regülasyonunda rol oynayan mekanizmalar net olarak belirlenmemiştir. Noradrenalinin α reseptörleri yolu ile veziküla seminalislerde kontraksiyon yaparak, NO-cGMP yolağında düz kas relaksasyonu etkisi ile denge tonusunu sağladığı bildirilmişse de asıl mekanizmalar tam olarak ortaya konmamıştır⁴. Yine veziküla seminalislerin kas yapısında kolinerjik sinirlerin bulunduğu bildirilmişse de, asetilkolinin (ACh) veziküla seminalislere hangi mekanizmalar ile etkili olduğu tam olarak saptanmamıştır⁵⁻⁷. Bu çalışmada deneysel olarak ACh'nin rat veziküla seminalis kontraksiyonlarına etkisi değerlendirildi.

GEREÇ ve YÖNTEM

Yerel etik kurul onayı alınan çalışma protokolünde, 200-250 g ağırlığında, erişkin erkek Wistar sıçanlardan izole edilen veziküla seminalis kesitleri kullanıldı. Hayvanlar dekapite edil-

dikten sonra, alt abdomen açılarak seminal veziküller alındı ve içerisinde Krebs solüsyonu bulunan bir Petri kutusuna yerleştirildi. Veziküla seminalislerin etrafındaki yağ ve bağ dokuları dikkatli disseksiyonla uzaklaştırıldı, veziküller içerisindeki koyu kıvamlı sıvı doku üzerine hassas bir kesi yapılarak ayrıştırıldı. Daha sonra 0.5×0.2 cm boyutlarında seminal vezikül kesitleri hazırlanarak içerisinde %95 oksijen ve %5 karbondioksitle sürekli gazlandırılan 37°C 'de Krebs solüsyonu bulunan ısı ceketli çift çeperli izole organ banyosunda 1 gramlık istirahat gerimi altında asılarak izometrik kasılmalar kayıt edildi.

Kesit hazırlanırken dokuların saklandığı ve kasılma deneylerinde kullanılan Krebs solüsyonunun içeriği (mM/L): NaCl, 120; glikoz, 11; NaHCO_3 , 25; KCl, 5; NaH_2PO_4 , 1; ve CaCl_2 , 2.5; olmak üzere her gün taze olarak hazırlandı ve pH'sı kontrol edilerek gerektiğinde 1 M NaOH ile 7.4'e ayarlandı. Krebs solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan kimyasal ajanların hepsi araştırma için hazırlanmış saflıktaydı [Sigma (Deisenhofen, Almanya)]. Bütün ilaçlar önce distile suda ve test konsantrasyonları Krebs solüsyonu içerisinde hazırlandı.

İstirahat gerimine 30 dakikalık bir uyum periyodundan sonra spontan kasılma gösteren seminal vezikül kesitlerinden ilave 10 dakikalık kontrol kayıtları alındı. Bu periyodun sonunda ACh ($10 \mu\text{M}$) (Sigma, Deisenhofen, Almanya) organ banyosuna uygulanarak kasılmalar indüklendi. İlave olarak atropin uygulanarak ACh'le indüklenen kontraksiyonlar üzerine etkileri incelendi.

İzometrik kasılmalar Ossilograf (Harvard Apparatus Limited, Kent, İngiltere) aracılığıyla yazdırılarak ölçüm ve değerlendirmeler bu kayıtlar üzerinde yapıldı. Bazı deneylerde ise MAY izole organ sistemi kullanıldı. Kasılmaların amplitütleri miligram (mg) olarak, frekansları ise kasılma sayısı (kasılma sayısı/10dakika) olarak hesaplandı. Kasılmaların amplitütleri kontrol koşul-

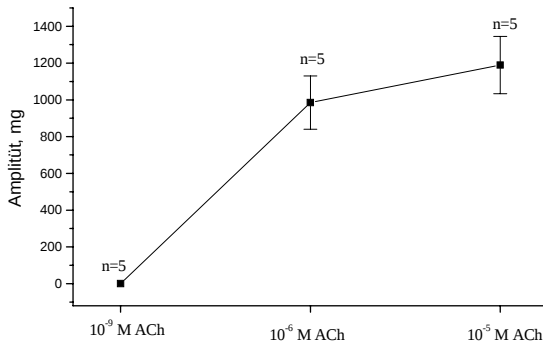
larında ve farmakolojik ajan uygulaması yapıldığında 10'ar dakikalık periyotlar halinde değerlendirildi.

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analiz (ANOVA) testi kullanıldı. $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Bütün istatistiksel değerlendirmeler ve grafikler Microgal Origin programı kullanılarak gerçekleştirildi.

BULGULAR

Çalışılan seminal vezikül kesitlerinde gerime adaptasyon periyodunda düşük amplitütlü de olsa spontan kasılmalar gözlemlendi. Spontan kasılma göstermeyen 3 kesit, hem uygulanan istirahat gerimi karşısında yeterli gevşeme göstermedi; hem de ardından uygulanan ACh'ye kasılma yanıtı göstermedi. Reseptör duyarlılığından ziyade kesit hazırlanması veya kullanılan kayıt solüsyonu ile ilgili problem olduğu düşünülen bu 3 düz kas kesiti çalışma kapsamına alınmadı.

ACh'nin 10^{-9} , 10^{-6} ve 10^{-5} M'lık konsantrasyonları uygulanarak maksimum kasılma yanıtları elde edildi. ACh konsantrasyona bağımlı bir şekilde izole sıçan seminal vezikül kesitlerinde kasılmalara yol açtı. 10^{-9} , 10^{-6} ve 10^{-5} M'lık ACh ile indüklenen kasılmaların maksimum değerleri sırasıyla 0.7 ± 1.4 mg, 985 ± 145 mg ve 1189 ± 156 mg olarak saptandı (Şekil 1, her konsantrasyon için $n=5$).



Şekil 1. Asetil kolinle indüklenen kasılmaların pik amplitüt değerleri.

Atropin uygulaması ACh ile indüklenen kasılma yanıtlarını hemen başlayan etkiyle baskılayarak kısa bir süre içerisinde tamamen inhibe etti. ACh'ye kasılma yanıtları ACh uygulamasının hemen ardından belirgin bir pik değer gösterip

kısmen geriledikten sonra plato şeklinde kasılmaya devam ettiğinden ACh'ye kasılma yanıtları ve ardından uygulanan atropinin etkileri kasılma eğrileri altında kalan alan olarak değerlendirildi. 1 mikromolar atropin 10^{-5} M ACh'le indüklenen kasılma eğrisi altında kalan alanları %85 oranında inhibe etti. Bu inhibisyon atropin uygulamasını takip eden ortalama 220 ± 35 saniye içerisinde tam inhibisyon şeklinde gerçekleşti (Şekil 2; $p < 0.05$, $n=7$).

İlave olarak atropinle ön muameleye tabi tutulan izole sıçan seminal vezikül kesitlerinde atropinle ön muamele uygulanmamış kesitlere göre anlamlı ölçüde baskılanmış kasılma yanıtları elde edildi (Şekil 3, $n=6$). 150 ± 12 mg olarak saptanan bu kasılmaların ortalama pik değerleri, önceden atropin uygulanmayan seminal vezikül kesitlerinde asetil kolinin aynı konsantrasyonu ile indüklenen kasılmalar için ortalama değer olan 1189 ± 156 mg ($n=5$) ile karşılaştırıldığında anlamlı ölçüde düşük bulundu ($p < 0.02$).

TARTIŞMA

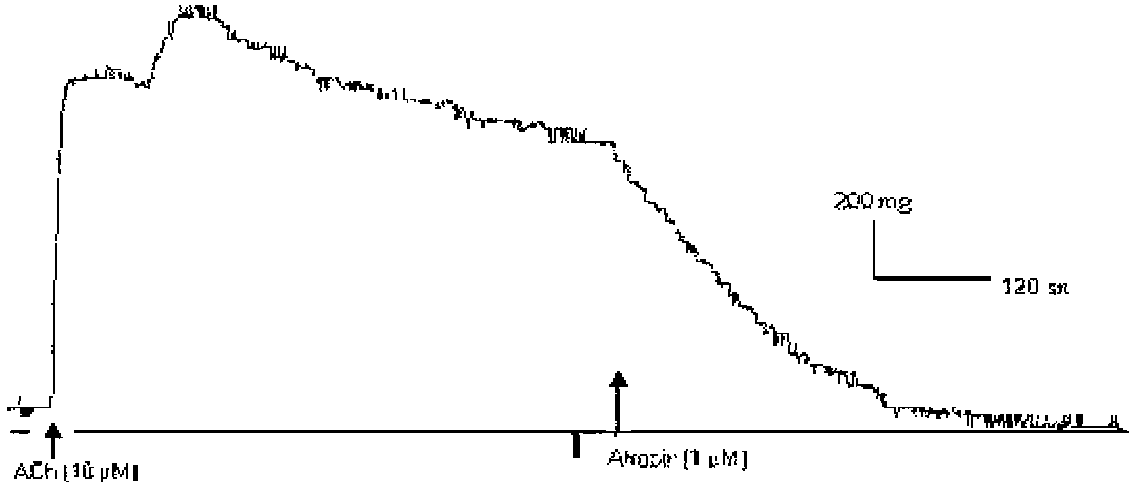
Evli çiftlerin yaklaşık %15'inde saptanan infertilitede, erkek infertilite faktörleri etiolojinin yarısını oluşturmaktadır. Bu %50'lik erkek infertilite patolojilerinin de yaklaşık %30'unda etiolojik faktör belirlenememektedir. İdiyopatik infertilite olarak adlandırılan bu hasta grubunda, etiolojik sebebe yönelik araştırmalarda, özellikle genital sistemdeki fonksiyonel obstrüksiyonların etkili olabileceği gündeme gelmiştir^{1,3,6}. Hem fizyolojik olaylar, hem nöronal ve endotelial çeşitli faktörlerle kompleks bir şekilde inerve edilen genitoüriner sistemin düz kas yapısındaki patolojilerin, erkek fertilitesinde etkili olabileceği bildirilmektedir⁷.

Duvar yapısı yaklaşık %80 düz kastan oluşan veziküla seminalisler, gerek ejakülasyondaki kontraktıl özellikleri, gerekse sekresyonları ile erkek fertilitesinde önemli rol oynamaktadırlar^{1,2}. Yoğun kas yapısına sahip bu organın olası nöromiyojenik patolojilerinin infertiliteye sebep olabileceğinin bildirilmesi, bu organların tonus regülasyonu ile ilgili mekanizmaların ayrıntılı incelenmesine sebep olmuştur^{1,7-10}.

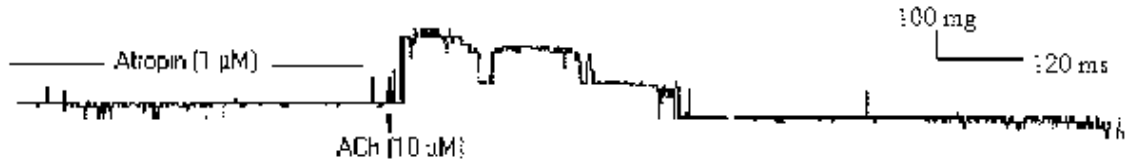
Veziküla seminalislerin kontraksiyonlarında özellikle hipogastrik sinir uyarısı ile nöradrenalinin α reseptörleri ve pürinerjik yolla etkili olduğu

bildirilmiştir^{7,11-13}. Yine veziküla seminalislerde transmural sinir uyarısının bifazik bir kontraksiyon oluşturduğu, bu kontraksiyonun hızlı komponentinde pürinerjik uyarıların, yavaş komponentinde ise α reseptör uyarılarının etkin olduğu belirlenmiştir¹⁴. Ancak veziküla seminalis kas yapısının ayrıntılı incelenmesi ile saptanan kolinerjik sinirlerin bu kontraksiyonlardaki rolü net belirlenmemiştir. Özellikle ACh'nin kalsiyumdan bağımsız olarak veya membran potansiyelini değiştirerek veziküla seminalislerin tonusuna etkili olabileceği bildirilmiştir^{5,7}. Hangi mekanizma ile etkili olduğu tam belli olmasa da, çalışmamızda ACh ile indüklenen rat veziküla seminalislerinde artan konsantrasyonlarla doğru orantılı bir kontraksiyon cevabı belirlendi. Bu da özellikle kolinerjik sinir sisteminin veziküla seminalis tonus regülasyonunda etkin olduğunu ortaya çıkarmaktadır.

Veziküla seminalislerde düz kas relaksasyonunda etkili olan ana mekanizmanın NO- cGMP yolağının olduğu bildirilmiştir⁷. Normal tonusun sağlanmasında etkili olan bu mekanizma, özellikle ejakülasyon süresinin devamında etkili olmaktadır. Erkek cinsel fonksiyon bozuklukları içerisinde en sık oranda belirlendiği bildirilen prematüre ejakülasyonun tedavisinde, NO- cGMP yolunun regülasyonu ile tedavi imkanının sağlanabileceğinin belirlenmesi, bu patolojinin tedavisinde veziküla seminalis istirahat tonusunun sağlanmasının önemini gündeme getirmiştir^{15,16}. Özellikle periferik olarak veziküla seminalis istirahat tonusunda etkili olacak ilaçların yeni tedavi alternatifleri arasında yer alabileceği bildirilmektedir. Çalışmamızda özellikle atropinin veziküla seminalis kontraksiyonlarını inhibe etmesi prematüre ejakülasyon tedavisinde yeni, daha spesifik antikolinerjik tedavi protokollerinin geliştirilebileceğini düşündürmektedir.



Şekil 2. İzole sıçan veziküla seminalisinde asetil kolinle kasılmanın indüksiyonu ve bu kasılma yanıtına ardından uygulanan atropinin etkisini gösteren orijinal kayıt örneği. ACh ve atropin okla gösterilen noktalarda uygulanmış ardından sürekli olarak ortamda kalmıştır.



Şekil 3. İzole sıçan veziküla seminalisinde atropinle ön muamelenin asetil koline kasılma cevabına etkisini gösteren orijinal kayıt örneği. ACh ve atropin okla gösterilen noktalarda uygulanmış ardından sürekli olarak ortamda kalmıştır.

SONUÇ

Veziküla seminalisler gerek sekresyonları ile gerekse kontraktıl özellikleri ile erkek fertilitesinde önemli rol oynamaktadırlar. Bu fonksiyonların nöronal regülasyonunun tam olarak anlaşılması, özellikle idiyopatik infertil hasta popülasyonunda yani tedavi alternatiflerini gündeme getirecektir.

KAYNAKLAR

- 1- **Turek PJ, Aslam K, Younes AK, et al:** Observations on seminal vesicle dynamics in an in vivo rat model. *J Urol.* 159: 1731- 1734, 1998.
- 2- **Gonzales GF:** Function of seminal vesicles and their role on male fertility. *Asian J Androl.* 3: 251-258, 2001.
- 3- **Orhan İ, Onur R, Cayan S, et al:** Seminal vesicle sperm aspiration in the diagnosis of ejaculatory duct obstruction. *BJU Int.* 84: 1050- 1053, 1999.
- 4- **Heuer O, Ückert S, Machtens SA, et al:** Effects of various nitric oxide donating agents on the contractility and cyclic nucleotide turnover of human seminal vesicles in vitro. *Urology.* 59: 958-962, 2002.
- 5- **Kubota Y, Hashitani H, Fukuta H, et al:** Mechanisms of excitatory transmission in circular smooth muscles of the guinea pig seminal vesicle. *J Urol.* 169, 390- 395, 2003.
- 6- **Kadioglu A, Cayan S, Tefekli A, et al:** Does response to treatment of ejaculatory duct obstruction in infertile men vary with pathology?. *Fertil Steril.* 76:138-142, 2001.
- 7- **Machtens S, Ückert S, Stief CG, et al:** Effects of various nitric oxide-donating drugs on adrenergic tension of human seminal vesicles in vitro. *Urology.* 61: 479- 483, 2003.
- 8- **Stief CG, Ückert S, Truss MC, et al:** A possible role for nitric oxide in the regulation of human ureteral smooth muscle tone in vitro. *Urol Res.* 24: 333-337, 1996.
- 9- **Zorgniotti AW, Lizza EF:** Effect of large doses of the nitric oxide precursor L-arginine on erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 6: 33- 35, 1994.
- 10- **Suzuki H:** Electrical responses of smooth muscle cells of the rabbit ear artery to adenosine triphosphate. *J Physiol.* 359:401- 415, 1985.
- 11- **Nakanishi H, Takeda H:** The possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission between the hypogastric nerve terminal and seminal vesicle in the guinea pig. *Jpn J Pharmacol.* 23: 479- 490, 1973.
- 12- **Kajimoto N, Kirpekar SM, Wakade AR:** An investigation of spontaneous potentials recorded from the smooth muscle cells of the guinea pig seminal vesicle. *J Physiol.* 224: 105-119, 1972.
- 13- **Meldrum LA, Burnstock G:** Evidence that ATP is involved as a co-transmitter in the hypogastric nerve supplying the seminal vesicle of the guinea pig. *Eur J Pharmacol.* 110: 363- 366, 1985.
- 14- **Pinna C, Rubino A, Burnstock G:** Age related changes in purinergic and adrenergic components of sympathetic neurotransmission in guinea pig seminal vesicles. *Br J Pharmacol.* 122: 1411-16, 1997.
- 15- **Laumann EO, Paik A, Rosen R:** Sexual dysfunction in the United States: Prevalence and predictors. *JAMA.* 281: 537- 544, 1999.
- 16- **Aversa A, Mazzilli F, Rossi T, et al:** Effects of sildenafil (Viagra™) administration on seminal parameters and post-ejaculatory refractory time in normal males. *Hum Reprod.* 15: 131-134, 2000.