

Antikolinesteraz İlaçların Sıçan Mide Fundus Ve İleum Düz Kasında Elektriksel Alan Stimülasyonu Aracılı Kasılma Yanıtları Üzerine Anti-Muskarinik Etkileri

Ilker Kelle, Ramazan Çiçek

ÖZET

İntestinal sistem düz kas kasılmasından dolayıyla da motiliteden başlıca sorumlu olan otonom sinir sisteminin parasempatik bölümüdür ve bu etkinin gelişimine, fizyolojik veya elektriksel stimülasyon gibi bir uyarana bağlı olarak eksitasyona uğrayan parasempatik liflerden salıverilen asetilkolin aracılık eder. Antikolinesteraz ilaçlar ise kolinerjik yollarda asetilkolinesterazı inhibe etmek suretiyle yıkımını önledikleri asetilkolinin düzeylerini artırarak dolaylı etkileriyle hem muskarinik hem de nikotinik etkiler oluştururlar. Yapılan bazı çalışmalarda asetilkolinesteraz inhibitörü ilaçların beklenenin aksine antimuskarinik etkiler de oluşturduğu bildirilmiştir. Biz de bu çalışmada neostigmin, edrofonyum ve piridostigmin gibi etki süreleri farklı olan antikolinesteraz ilaçların, Wistar albino sıçanlardan izole edilen mide fundus ve ileum düz kas preparatlarında, bir direkt stimülasyon tekniği olan Elektriksel Alan Stimülasyonu(EAS) ile uyarılan kasılma yanıtları üzerine olası antimuskarinik etkilerini incelemeyi amaçladık. Neostigmin ve piridostigminin her ikisi de ilk üç derişimlerinde (sırasıyla 1, 10 ve 100 µM), EAS'na bağlı kasılma yanıtlarının E maks değerlerini arttırdı, ancak sadece mide fundus striplerindeki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulundu. 1mM gibi en yüksek derişimlerinde, neostigmin ve piridostigmin EAS ile uyarılan düz kas kasılmalarını zayıflattı ve bir antimuskarinik etkiye yol açtı ($p \leq 0,05$; eşleştirilmiş Student's t test). Bunun aksine, edrofonyum dört derişiminden hiçbirisinde EAS ile uyarılan kas kasılmaları üzerinde anlamlı bir etki oluşturmadı ($p > 0,05$; eşleştirilmiş Student's t test). Neostigmin ve piridostigminin yüksek dozları, edrofonyumdan farklı olarak intestinal düz kas kasılmaları üzerinde antimuskarinik etkilere yol açmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Antikolinesterazlar, Düz Kas Kasılması, Antimuskarinik Etkiler, Elektriksel Alan Stimülasyonu.

The Antimuscarinic Effects of Anticholinesterase Drugs on Electrical Field Stimulation-Induced Contractile Responses in Rat Gastric Fundus and Ileum Smooth Muscle

SUMMARY

Parasympathetic component of autonomic nervous system is known as involving in majority of intestinal smooth muscle contractions and motility. Acetylcholine can be released from parasympathetic nerve terminals by an excitation which is formed by a physiological or an electrical stimulation in order to elicit smooth muscle contractions. Anticholinesterase drugs are expected to increase the levels of acetylcholine in cholinergic synapses via inhibiting the enzyme acetylcholinesterase. In recent studies, it has been shown that anticholinesterase drugs may cause an antimuscarinic effect on the contrary of their usual effects such as amplifying of cholinergic transmission. In this study, we investigated the antimuscarinic effects of neostigmine, edrophonium and piridostigmine on gastric fundus and ileum smooth muscle preparations isolated from Wistar albino rats. The contractions were induced by using electrical field stimulation (EFS) which is a direct stimulation technique. Both neostigmine and piridostigmine increased the E max values of contractile responses for EFS at their first three concentrations; but only the changes in gastric fundus strips has found significant as statistically. At their highest concentration such as 1000 µM, both neostigmine and piridostigmine attenuated the EFS induced smooth muscle contractions and caused an antimuscarinic effect ($p \leq 0,05$; paired samples Student's t test). In contrast, edrophonium had no effect on EFS induced smooth muscle contractions, at none of its four concentrations as statistically. Our results suggest that larger doses of neostigmine and piridostigmine, but not edrophonium, may evoke antimuscarinic effects on intestinal smooth muscle contractions.

Key Words: Anticholinesterases, Smooth Muscle Contractility, Antimuscarinic Effects, Electrical Field Stimulation.

GİRİŞ

Vücutta hücreleri elektriksel açıdan birbirleriyle bağlantılı olan kalp kası ve düz kas gibi sinsityal yapıları organlar; hücreleri elektriksel anlamda çevresinden yalıtılmış olan dokularla kıyaslandığında çok farklı bir elektriksel davranış kalıbı sergilerler. Sinsityal yapılanma, özellikle düz kas dokusunun eksitasyona vereceği elektriksel yanıtın oluşumunda merkezi bir rol oynar. Eksitasyon, sinir sistemi aracılığıyla fizyolojik bir uyarı şeklinde olabileceği gibi, vücut dışı kaynaklı bir elektriksel stimülasyon şeklinde de olabilir (1).

Elektriksel alana maruz kalan hayvanlarda gözlenen biyolojik etkilerin birçoğu, doğrudan ya da dolaylı olarak, sinir sistemiyle ilişkilidir ve özellikle de otonom sinir sistemi üzerinden gelişmektedir (2).

Mide ve barsağın hareketleri asıl olarak otonom sinir sisteminin kontrolü altındadır (3). İntestinal sistem düz kas kasılmalarından dolayısıyla da motiliteden başlıca sorumlu olan otonom sinir sisteminin parasempatik bölümüdür ve bu etkinin gelişimine fizyolojik veya elektriksel stimülasyon gibi bir uyarana bağlı olarak eksitasyona uğrayan parasempatik liflerden salınan asetilkolin (ACh) aracılık eder. İzole organ preparatlarında eksitasyon oluşturmak amacıyla iki temel stimülasyon metodu uygulanır. Bunlardan ilki indirekt stimülasyon metodu olup, izole organı inerve eden sinir lifinin doğrudan stimüle edilmesi yöntemidir. İkinci yöntem olan direkt stimülasyon metodu ise, elektrodları organa bağlayarak gerçekleştirilen stimülasyon yöntemidir (4).

ACh'nin etkileri, kolinerjik sinapslarda yüksek konsantrasyonlarda bulunan, hem sinir hem de kas dokusunda sentezlenen protein yapısındaki asetilkolinesteraz (AChE) enzimince sonlandırılır (5).

Antikolinesterazlar, kolinerjik yollarda AChE'yi inhibe etmek suretiyle yıkımını önledikleri ACh'nin düzeylerini arttırarak non-selektif nitelikteki indirekt etkileriyle hem muskarinik hem de nikotinik etkiler oluştururlar.

Yapılan bazı çalışmalarda antikolinesteraz ilaçların beklenen aksine antimuskarinik etkiler de oluşturabileceği bildirilmiştir (6, 7).

Bu verilerden hareketle biz de çalışmamızda etki süreleri farklı olan antikolinesteraz ilaçların olası antimuskarinik etkilerini sıçan mide fundus ve ileum düz kasında araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda her bir Wistar albino sıçandan hazırlanan mide fundus ve ileum düz kas preparatlarında direkt stimülasyon tekniği olan elektriksel alan stimülasyonu (EAS) ile uyarılan kasılma yanıtları üzerine neostigmin, edrofonyum ve piridostigminin doza bağımlı etkilerini inceledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezinden (DÜSAM) temin edilen her iki cinsiyetten 200-300 g ağırlığında 10 adet Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar ileum içeriğinin temizlenmesine kolaylık sağlaması amacıyla bir gece aç bırakıldı ancak su içmeleri kısıtlanmadı.

Deneylerimizde anestezik madde olarak Ketamine (100mg/kg; Ketalar®) ve Xylazine Hydrochloride (10mg/kg; Rompun®) kombinasyonu kullanıldı. Anestezize edilen sıçanlar eksanguinasyon ile sakrifiye edildi. Anestezize edilen sıçanların karın boşlukları longitudinal abdominal insizyon ile açılarak mide ve ileuma ulaşıldı. Mide karın boşluğundan çıkarıldıktan sonra mide fundusu, korpus bölgesinden ayrıldı ve içinde Tyrode solüsyonu bulunan bir kaba aktarıldı. Vane yöntemine (8) göre mide fundusu küçük kurvaturdan kesilip açılarak transvers kesilerle 1,5-2 cm'lik şeritler hazırlandı.

Abdomen açıldıktan sonra belirlenen ileum, çekum ile birleştiği bölgeden kesilerek bir hemostatik klemp ile tespit edildi ve tek darbe ile süratle çekilerek ileumun mezenterden ayrılması sağlandı. Takriben 40 cm uzunluğunda kesilen barsak parçası içinde 37°C'a kadar ısıtılmış Tyrode solüsyonu bulunan bir kaba aktarıldı. İleumun proksimal ve distal kısımları işaretlendikten sonra ucunda küt ağızlı kanül bulunan 10 ml'lik bir enjektör kullanılarak, doku zedelenmeden Tyrode solüsyonu ile ileum içeriği uzaklaştırıldı. İleumun her iki ucundan 10'ar cm kesilerek atıldı ve kalan kısım Magnus yöntemine (8) göre 1,5-2 cm'lik tüp şeritler şeklinde kesildi.



Mide fundusundan ve ileumdan hazırlanan preparatlar, 5/0 - 6/0 atravmatik krome katgüt suture materyali kullanılarak izole organ banyosuna asılacak hale getirildi. Her bir strip için bir seri deney gerçekleştirildi. Gerek mide gerekse ileum preparatları aynı gün içinde kullanıldı; hemen kullanılmayan preparatlar Tyrode solüsyonu içinde +4°C'de saklandı.

07/12/2001 tarihli ve 5117 sayılı Etik Kurul izni alınan çalışmalarımız süresince hayvan hakları ile ilgili olarak Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) tarafından belirlenen "Hayvan Haklarının Korunması" hususundaki esaslara özenle uyuldu.

İlaçların hazırlanması

Deneylerimizde kullanılan ilaçlar: Bethanechol chloride (Sigma Chemical Co.), Pyridostigmine bromide (Sigma Chemical Co.), Neostigmine bromide (Sigma Chemical Co.), Edrophonium chloride (Sigma Chemical Co.), Barium chloride (Riedel-De Hoen Agseeleze).

Deneyde kullanılan Tyrode solüsyonunun bileşimi

Tyrode solüsyonunun bileşimi litrede 137 mM NaCl, 11,9 mM NaHCO₃, 2,7 mM KCl, 1,1 mM CaCl₂, 1,1 mM MgCl₂, 0,45 mM NaH₂PO₄ ve 5,5 mM Glukoz olacak şekilde hazırlandı.

Tyrode solüsyonu için distile su temininde AutoStill™, Jencons Scientific Lim., Cherrycourt Way Industrial Estate cihazı kullanıldı.

Çalışmamızda ısıtıcı ceketli izole organ banyosu olarak May IOBS 99 (isolated organ bath stand) ve beraberinde MAY WBC 3044 V3 (waterbath and circulator system) ısıtıcı-dolaşım cihazı kullanıldı.

Agonist ve antikolinesteraz etkili ilaçlara izole organ banyosuna asılı dokuların verdiği yanıtların saptanmasında izometrik tipte FDT 10-A Force Displacement Transducer'dan, saptanan yanıtların amplifiye edilmesinde BIOPAC Systems Inc. Model MP30b-CE amplifikatöründen, yanıtların bilgisayar ortamına aktarılması değerlendirilmesinde ise BIOPAC Student Lab PRO Manual Professional Version 3.6.6 for PC with Windows programından yararlanıldı.

İn vitro organ banyosu deneyleri

Araştırmamızda elektriksel alan stimülasyonu (EAS) kullanılarak mide ve ileum düz kas preparatlarının elektriksel uyarıya verdiği yanıtlar incelendi. Bu amaçla stimülatör olarak MAY ST 95 PT STIMULATOR, güç kaynağı olarak da MAY ISO 150 A Stimulus Isolated Power Supply cihazlarından yararlanıldı. Elektriksel alanın oluşturulmasında, halka şeklinde 0,5 cm çaplı, aralarında 1 cm'lik mesafe bulunacak şekilde yerleştirilmiş platin uçlu elektrotlardan hazırlanan düzenekler kullanıldı. Elektrotlar, 40 V gerilim altında, 1 saniye süreyle 20 Hz frekanslı, 30 milisaniye durasyonlu kare dalga formunda alan stimülasyonu oluşturacak şekilde ayarlanan stimülatöre bağlandı.

Doku örnekleri iki adet platin elektrotun ortasından geçecek şekilde yerleştirildi ve dokuların elektrotlara temas etmemesine özen gösterildi. Banyo solüsyonu 37°C'de tutuldu ve sürekli olarak havalandırıldı. Preparatlar, organ banyosu ortamına adapte olmalarını sağlamak amacıyla 45 dk süreyle bekletildi. Bu süre içerisinde dokular 15 dk'da bir kez olmak üzere üç kez yıkama işlemine tabi tutuldu.

Daha sonra sırasıyla 1, 2 ve 3 no'lu kanallara asılan düz kas preparatlarından EAS için kontrol kasılma yanıtları alındı. Takiben dokular yıkandı ve bu işlem 5'er dk arayla üç kez tekrarlandı.

Son yıkama işleminden 5 dk sonra, 20 ml'lik organ banyosunun 1 no'lu kanalında neostigminin, 2 no'lu kanalında edrofonyumun ve 3 no'lu kanalında da piridostigminin 1µM'lık derişimlerini oluşturacak şekilde 1'er diziye enjeksiyonlar yapıldı. Doku örneklerinin antikolinesteraz ilaçlarla muamele olabilmeleri için 10 dk süreyle beklenildi. Ardından her üç kanala da EAS uygulanarak, antikolinesterazların etkisi altındaki dokulardan kasılma yanıtları elde edildi ve takiben dokular yıkandı. Yıkama işlemi 5'er dk arayla 3 kez tekrarlandı.

Antikolinesterazlar sonrası EFS için kasılma yanıtlarının alınması ve takiben dokuların yıkanması şeklinde uygulanan deney serileri, antikolinesterazların 1µM, 10µM, 100µM ve 1000µM'lık artan derişimleri için ayrı ayrı tekrarlandı.



En son aşamada, mide fundus düz kas preparatları 10 mmol/L BaCl₂ ile muamele edilerek maksimum kasılma yanıtları oluşturuldu.

Veri Analizi

Deneylerimizde EFS ile alınan kasılma yanıtları ve antikolinesterazlar ile muamele edildikten sonra EFS için elde edilen yanıtlar, en son aşamada uygulanan BaCl₂ ile oluşturulan kasılma yanıtlarıyla karşılaştırıldı ve yüzde (%) olarak gösterildi.

Antikolinesterazların EAS ile alınan yanıtlar üzerine etkileri Eşleştirilmiş Student's T testi ile analiz edildi. Bu etkiler açısından antikolinesterazlar arasında fark bulunup bulunmadığı One-way varyans analizi (ANOVA) ile incelendi. P ≤ 0,05 olması durumunda aradaki farkın anlamlı olduğu kanısına varıldı.

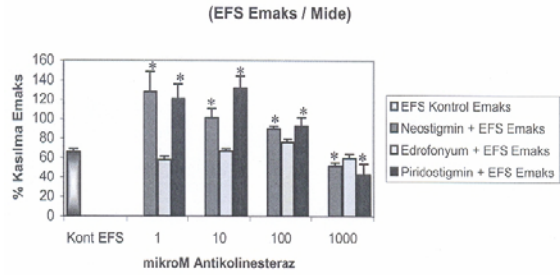
BULGULAR

Antikolinesterazların sıçan mide fundusunda EAS kasılma yanıtlarına etkileri

Neostigmin ve piridostigmin, mide fundus striplerinde her 4 derişimleri sonrasında EAS' na bağlı kasılma yanıtlarının Emaks değerlerinde anlamlı değişikliklere yol açtı. Söz konusu değişiklik, her iki antikolinesterazın 1, 10 ve 100 µM'lık derişimlerinde Emaks değerlerinde artış, 1000 µM'lık derişimlerinde ise Emaks değerlerinde belirgin düşüş şeklinde gerçekleşti (n = 8, p≤0,05); (Tablo 1, Grafik 1). Edrofonyumun ilk 3 derişiminde EFS sonrası Emaks değerlerinde anlamlı bir artış gelişmedi (n = 8, p>0,05); (Tablo 1, Şekil 1). Buna karşılık edrofonyumun 1000 µM'lık derişiminde Emaks değerleri düşüş gösterdi ancak bu değişiklik anlamlı bulunmadı (n = 8, p > 0,05); (Tablo 1, Şekil 1).

Tablo 1. Sıçan mide fundus dokusunda antikolinesterazların 1 µM'dan itibaren artan derişimlerdeki uygulamalarının, EAS ile oluşturulan kasılma yanıtlarının Emaks değerleri üzerine olan etkileri ve bu etkilerin istatistiksel değerlendirme sonuçları görülmektedir (Eşleştirilmiş Student's t testi). *Kontrolle göre farklı (p<0,05).

Tablo 1 / MIDE	% E maks
EFS kontrol yanıtları	% 65,8 ± 3,4
Neostigmin 1µM + EFS	% 128,3 ± 20,1*
10µM + EFS	% 101,3 ± 8,9*
100µM + EFS	% 89,8 ± 2,5*
1000µM + EFS	% 52,0 ± 3,2*
Edrofonyum 1µM + EFS	% 57,8 ± 3,9
10µM + EFS	% 66,8 ± 2,7
100µM + EFS	% 76,0 ± 3,5
1000µM + EFS	% 59,6 ± 4,0
Piridostigmin 1µM + EFS	% 121,0 ± 15,1*
10µM + EFS	% 132,3 ± 11,8*
100µM + EFS	% 92,4 ± 9,0*
1000µM + EFS	% 42,4 ± 11,4*



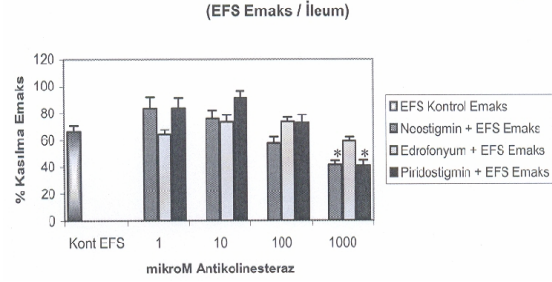
Şekil 1. Sıçan mide fundus düz kas dokusunda her üç antikolinesterazın artan derişimlerdeki uygulamalarını takiben EAS ile uyarılan kasılma yanıtlarından elde edilen Emaks değerlerinin kontrol Emaks değerlerine göre değişimi görülmektedir. Üç ayrı antikolinesterazın mide fundus striplerinde EAS ile uyarılan kasılma yanıtlarının Emaks değerleri üzerine olan etkileri arasındaki farklılık açısından yapılan one-way varyans analizine göre aradaki fark istatistiksel yönden anlamlı bulunmuştur (n=10, p ≤ 0,05).

Antikolinesterazların sıçan ileum dokusunda EAS ile elde edilen kasılma yanıtlarına etkileri

Çalışmamızın ikinci aşamasında kullandığımız ileum preparatlarında neostigminin 1 ve 10 μM ; piridostigminin de 1, 10 ve 100 μM 'lık derişimleri için Emaks değerlerinde bir artış meydana geldi ancak bu artış anlamlı bulunmadı ($n=8$, $p>0,05$); (Tablo 2, Grafik 2). Her iki antikolinesterazın 1000 μM 'lık derişimlerinde ise, EFS sonrası Emaks değerlerinde belirgin bir düşüş gözlemlendi ($n=8$, $p\leq 0,05$); (Tablo 2, Grafik 2). Edrofonyumun 10 ve 100 μM 'lık derişimleri için EFS sonrası Emaks değerlerinde bir artış, 1000 μM 'lık derişimi sonrasında ise bir azalma meydana geldi. Ancak edrofonyumun her dört derişimi için de bu değişiklikler anlamlı bulunmadı ($n=8$, $p>0,05$); (Tablo 2, Şekil 2).

Tablo 2. Sıçan ileum düz kas dokusunda antikolinesterazların 1 μM 'dan itibaren artan derişimlerdeki uygulamalarının, EAS ile oluşturulan kasılma yanıtlarının Emaks değerleri üzerine olan etkileri ve bu etkilerin istatistiksel değerlendirme sonuçları görülmektedir (Eşleştirilmiş Student's t testi).

Tablo 2 / İLEUM	% E maks
EFS kontrol yanıtları	% 66,3 \pm 4,8
Neostigmin 1 μM + EFS	% 83,9 \pm 7,8
10 μM + EFS	% 75,8 \pm 6,0
100 μM + EFS	% 57,5 \pm 5,1
1000 μM + EFS	% 42,0 \pm 2,8*
Edrofonyum 1 μM + EFS	% 64,3 \pm 3,5
10 μM + EFS	% 73,4 \pm 5,0
100 μM + EFS	% 73,5 \pm 3,1
1000 μM + EFS	% 59,0 \pm 3,4
Piridostigmin 1 μM + EFS	% 84,0 \pm 7,1
10 μM + EFS	% 91,1 \pm 4,6
100 μM + EFS	% 72,7 \pm 5,9
1000 μM + EFS	% 41,3 \pm 3,8*



Şekil 2. Sıçan ileum düz kas dokusunda her üç antikolinesterazın artan derişimlerdeki uygulamalarını takiben EAS ile uyarılan kasılma yanıtlarından elde edilen Emaks değerlerinin kontrol Emaks değerlerine göre değişimi görülmektedir. Üç ayrı antikolinesterazın sıçan ileum düz kas preparatlarında EAS ile uyarılan kasılma yanıtlarının Emaks değerleri üzerine olan etkileri arasındaki farklılık açısından yapılan one-way varyans analizine göre aradaki fark istatistiksel yönden anlamlı bulunmuştur ($n=10$, $p \leq 0,05$).

TARTIŞMA

Sinir impulsları düz kaslarda, kalp kasında, iskelet kasında ve ayrıca dış salgı bezlerinde postgangliyonik nöronlardan spesifik kimyasal nörotransmitterleri salıverdirmek suretiyle yanıtlara yol açarlar (9). Memeli türlerinin gastrointestinal kanalının intrinsek ve ekstrinsek inervasyonunda görev alan çok sayıda nörotransmitter madde tanımlanmıştır. Bunlardan asetilkolin (ACh), sıçan duodenum ve ileumunda yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır; buna göre kolinerjik agonistler in vitro olarak sıçan ileumunda kasılma yanıtlarına yol açabilirler (10).

Radomirov ve Venkova (1988)'nin belirttiğine göre 1955'de Paton'un elektriksel stimülusların postgangliyonik sinir uçlarından ACh salınımını indüklediğini göstermesiyle birlikte izole düz kas preparatlarında elektriksel uyarıyla tetiklenen kasılma yanıtları, nörotransmitter madde salınımı ve nöromuskuler ileti süreçlerinin çalışabileceği temel elektrofizyolojik model haline gelmiştir.

Son araştırmalar göstermektedir ki, farklı transmitter maddeler tek bir nöronda bulunabilir ve eş zamanlı olarak ko-transmitterler gibi birlikte salınmak suretiyle farklı reseptörlerle etkileşime girerek eksitator ya da inhibitör nitelikte etkiler oluşturabilirler. Radomirov ve ark.(1988)'na göre Bertaccini ve ark.'ı salınan nörotransmitterlerin oluşturduğu nörojenik düz kas yanıtlarını, lokal transmitter serbestlenmesiyle kenetli aksiyon potansiyelleri gelişiminin bir sonucu olarak değerlendirmektedir. Uygulanan elektriksel stimülusun frekansı ya da uyarı dizilerinin süresi nörotransmitter salıverilmesi sürecinde önemli rol oynamaktadır. Yüksek frekanslarda yapılan uyarılarla, nörotransmitter salıverilmesinde rol oynayan sinir uçlarında daha geniş alanlar etkilendiğinden, kasılma yanıtının amplitüdündeki artış yüksek miktarlarda salıverilen transmitterlere bağlı gelişir (11).

İnce barsaklardan hazırlanan striplerin, fizostigmin içeren solüsyonlarla muamele edilmelerinin, intramural sinir pleksuslarındaki parasempatik sinir uçlarından ACh salıverdirttiği, ayrıca elektriksel stimülasyon uygulamasının da ACh salınımını arttırdığı ve bu salınımın kolinerjik muskarinik reseptörler ve α -adrenoseptörler aracılığıyla gerçekleşen presinaptik inhibisyon ile düzenlendiği uzun süre önce gösterilmiştir (12).

EAS'nun muhtemelen parasempatik myenterik pleksusu uyarmak suretiyle ACh salıverdirttiği deneysel modeller, sıçan intestinal preparatlarında ve kobay ileal preparatlarında pek çok açıdan benzerlik göstermektedir (12).

10 Hz frekanslı EAS, ACh düzeylerini bazal değerlerin üç misline yükseltir; bu artış uyarının sonlandırılması ile birlikte kısa sürede zayıflar ve düzeyler stimülasyon öncesi değerlerine geri döner. Sıçan ince barsağında 10 Hz'lik frekansla gerçekleştirilen EAS, seğirme benzeri kasılma yanıtlarına yol açar. Bu yanıtlar, tetrodotoksin ile bloke olabildiği için nörojenik tiptedir ve atropin ile gerileyebildiği için de muskarinik parasempatik kontrol aracılığıyla gelişmektedir.

Kobay ileum preparatlarının 10 Hz'in üzerindeki frekanslarda iki veya daha fazla sayıdaki uyarı serileriyle uyarılması, 0,1 Hz

gibi düşük frekanslı tekli uyarılarda görülenlerden daha büyük amplitüdü kasılma yanıtlarının oluşumuna yol açar. Bu yanıtlar 1 μ M atropin ile % 50-60 oranında inhibe olur. 1 μ M atropin ile oluşan inhibisyon stabil hale geldikten sonra yapılan tetrodotoksin ilavesiyle % 4 oranında bir inhibisyonun daha geliştiği gözlenir. Burada atropin ve tetrodotoksin ile gelişen inhibisyon, yüksek frekanslı EAS'na verilen yanıtların yaklaşık % 50 oranında sinirsel aracılı kolinerjik yanıtlardan oluştuğunu gösterir (7, 11, 12).

Yüksek frekanslı elektriksel uyarıya verilen yanıtların atropin ve tetrodotoksine dirençli olan yaklaşık % 50'lik kısmı, ortama fenoksibenzamin ilavesiyle tamamen ortadan kalkar. Burada fenoksibenzaminin düz kas kasılmasını membran üzerine etki ederek ortadan kaldırması, atropinizasyon sonrası devam eden yaklaşık % 50 oranındaki kasılma yanıtının intestinal longitudinal kasların EAS'na verdiği yanıt olarak değerlendirilmektedir (7).

İntestinal düz kaslarda elektriksel alan stimülasyonu her zaman sadece kasılma yanıtları oluşturmaz, fakat aynı zamanda gevşeme yanıtlarına da yol açabilir. Fare mide fundusunda EAS ile uyarılan gevşeme yanıtı, L-NAME ile inhibe olabildiği için; gevşeme NO salınımıyla ilişkilidir. Ancak alan stimülasyonu ile NO salınımı M_1 reseptörlerinden bağımsızdır, çünkü pirenzepin ile NO salınımı önlenemez. Bundan dolayı, M_1 reseptör aracılı gevşeme; M_1 reseptörleri yalnızca karbakol ya da M_1 selektif agonistik etkili *McN-A-343* gibi eksojen ajanlarla uyarıldığında görülür. Çalışmamızın eksitasyon oluşturmak amacıyla EAS kullanıldığı için, sayılanların ışığında antimuskarinik etkinin gelişiminden M_1 reseptörlerinin ve dolayısıyla M_1 reseptör aktivasyonu ile salıverilen NO'nun sorumlu olmadığı kanaatindeyiz.

İntestinal sistemde düz kas kasılmalarından sorumlu reseptör tipi M_2 muskarinik reseptörleri olabilir ancak antikolinesterazların yüksek dozlarında görülen antimuskarinik etkilerin bir M_2 muskarinik reseptör antagonisti olan Metoktraminden etkilenmediği yönündeki sonuçlara göre, kasılma yanıtlarında antikolinesterazlarca oluşan azalmanın M_2



reseptörleri üzerinden gelişmediği düşünülebilir (13).

Ayrıca, muskarinik agonistlerin oluşturduğu kasılma yanıtına karşı gelişen desensitizasyon etkisi M_2 ya da M_1 selektif antagonistlerle değil de bir M_3 selektif antagonist olan *P-florohexzahidrosiladifenidol* ile ortadan kaldırılabılır. Buna göre, M_3 reseptörlerinin eksilmesi ya da desensitizasyonunun yanısıra M_3 reseptörlerinin kolinesteraz inhibitörleri gibi ajanlarla farmakolojik blokajı da sıçan intestinal sistem düz kaslarında gevşemeye yol açabilir (14).

Pek çok çalışmada antikolinesterazların yüksek dozlarında görülen antimuskarinik etkilerin M_3 selektif antagonistlerce ortadan kaldırıldığı (15), yüksek dozlarında antikolinesterazların bir parsiyel agonist gibi davranarak reseptör desensitizasyonuna yol açtığı (16-19) ve desensitize olan başlıca reseptör tipinin de M_3 muskarinik reseptörleri (10,20,21) olduğu yönündeki verilerden hareketle bizler de kolinesteraz inhibitörlerince oluşturulan antimuskarinik etkilerde M_3 muskarinik reseptörlerini sorumlu olarak görmekteyiz. İlave olarak, antikolinesterazların intestinal sistemdeki myenterik plexus gangliyon hücrelerinin nikotinik ACh reseptörlerine doğrudan bağlanarak, bu reseptörler üzerinde ACh'nin etkilerini antagonize etmelerinin de M_3 reseptör aracılı antimuskarinik etkilerin gelişiminde bir katkısı olabilir (18, 22, 23).

Antikolinesterazlar düşük derişimlerinde, sinaptik aralıkta asetilkolinesterazı inhibe ederek EAS ile parasempatik myenterik plexustan ve mide dokusundaki sekonder plexuslardan salıverilen ACh düzeylerinin devamlılığını sağlar. ACh postsinaptik bölgede bulunan M_3 reseptörlerine bağlanmak suretiyle düz kaslarda kasılma yanıtına yol açar ve antikolinesterazların agonistik etkinliğine aracılık eder (11, 13, 20). Yüksek dozlarında ise antikolinesterazlar, öncelikle myenterik plexus parasempatik gangliyon hücrelerinin nikotinik reseptörlerine bağlanarak bir desensitizasyona yol açmakta ve parasempatik aktiviteyi baskılamakta (18, 22), eş zamanlı olarak sinaptik aralıktaki ACh ile yarışmaya girmek suretiyle postsinaptik M_3 reseptörlerini

bloke etmekte ve sonuçta da EAS ile uyarılan kasılma yanıtları üzerinde bir antimuskarinik etki oluşturmaktadır (13, 15, 20, 21).

Antikolinesterazların 1000 μM 'lık derişiminde EAS ile gelişen kasılma yanıtları, 10 Hz'in üzerindeki yüksek frekanslı uyarılarda görülen, atropin ve tetrodotoksin ile bloke olmayan non-kolinerjik yolaklar aracılı kasılma yanıtlarıdır (7, 11, 12). Antikolinesterazlar 1000 μM 'lık derişimlerinde, bir anlamda atropin ya da tetrodotoksin gibi hareket ederek parasempatik aktiviteyi önemli ölçüde bloke etmekte ve yüksek frekanslı elektriksel uyarıya verilen yanıtların % 50 oranında parasempatik kontrol altındaki kısmını ortadan kaldırmaktadır. Kasılma yanıtlarının geriye kalan nörojenik kontrol altında olmayan % 50'lik kısmının, ortama fenoksibenzamin ilavesiyle tamamen önlenebildiği yönündeki verilere göre atropinizasyon benzeri etki oluşturan 1000 μM derişimli neostigmin ve piridostigmin uygulaması sonrasında devam eden yaklaşık % 50 oranındaki kasılma yanıtlarının intestinal longitudinal düz kasların direkt EAS'na verdiği yanıt olarak değerlendirilebilir (11).

Sıçan mide fundus ve ileum preparatlarında 1000 μM 'lık derişimlerinde neostigmin ve piridostigmin, EAS ile oluşturulan kasılma yanıtları üzerinde antimuskarinik etkiler oluşturmuştur. Verilerimiz, benzer çalışmalarda ki sonuçlarla uyumludur. Edrofonyum için de EAS sonrası kasılma yanıtlarında bir antimuskarinik etki gözlenmiştir ancak kasılma yanıtlarındaki bu düşüş anlamlı bulunmamıştır. Edrofonyum uygulamasının sıçan mide fundus ve ileum dokularında diğer iki kolinesteraz inhibitörüne göre gerek parasempatomimetik gerekse antimuskarinik etkinlik yönünden daha düşük amplitüdü yanıt oluşturmaması belki de olası antimuskarinik etkinliğinin, antikolinesteraz aktivitesiyle çakışmasından kaynaklanıyor olabilir (20). Zira Deschamps ve ark. (2001)'nin belirttiğine göre, Backman ve ark. ile Stein ve ark. deney hayvanlarından elde edilen veriler ışığında, kolinerjik gangliyonik iletimin blokajı ve kolinesteraz aktivitesinin inhibe olması şeklindeki doz-yanıt ilişkilerinin içiçe olabileceğini, böylelikle de otonomik parasempatik aktivitedeki değişikliklerin maskelenebileceğini belirtmişlerdir (17).



Çalışmamızın sonuçları antikolinesterazların antimuskarinik etkinliği yönünden ele alındığında, her ne kadar edrofonyum için EAS sonrası kasılma yanıtlarında gözlenen değişiklik anlamlı bulunmamış olsa da, her üç kolinesteraz inhibitörü ilacın da yüksek dozlarında antimuskarinik etkili olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Sourav S, Manchanda R: Effects of Variation in Intercellüler Electrical Coupling on Synaptic Potentials in Smooth Muscle: A Computational Study, *Electro- & Magnetobiology* 2001; 20: 193-205.

2. Suess MJ, Benwell-Morison DA. Non-ionizing radiation protection. Anderson LE, Kaune WT: Electric and magnetic fields at extremely low frequencies. WHO Regional Publications, European Series, Second edition. 1989. p. 175-224.

3. Koşumcu İ, Gastrointestinal Sistemin İnervasyonu, 16 Nisan 2000, URL: <http://www.geocities.com/HotSprings/Villa/3121/konular/gisinir.htm>

4. Schliep HJ, Döring HJ, Classen HG, Dehnert HO. Methods in Experimental Physiology and Pharmacology. BVM Biological Measuring Techniques, Volume 1, Muscle Contractions, 1st English Edition. 1986. p. 26-60.

5. Kayaalp SO. Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji. Kolinomimetik ilaçlar: Parasempatometik ilaçlar ve antikolinesterazlar. Cilt II, sekizinci baskı, Ankara: Feryal Matbaacılık; 1998: 1136-1152.

6. Katzung BG. Basic & Clinical Pharmacology. Cholinoceptor-activating & Cholinesterase-inhibiting drugs. Seventh Edition, McGraw-Hill Medical Publishing Division; 1998; 93-96.

7. Maske R, Orlandi B, Dowdle EB: Contractile responses of guinea-pig ileum to high-frequency electrical field stimulation. *Eur J Phar* 1980; 67: 47-52.

8. Perry WLM. Pharmacological Experiments on Isolated Preparations, By the staff of the Department of Pharmacology, University of Edinburgh, Second edition. 1970; 58-59, 88-89.

9. Goodman Gilman A; Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Ninth Edition, McGraw-Hill Medical Publishing Division; 1996; 105-106, 161-163, 171.

10. Galligan JJ, Burks TF: Cholinergic neurons mediate intestinal propulsion in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1986; 238:594-598.

11. Radomirov R, Venkova K: Pharmacological characteristics of the postsynaptically mediated contractile responses of guinea-pig ileum to long-lasting electrical field stimulation. *Neurpharmacology* 1988; 27: 729-735.

12. Blandina P, Barattini M, Fantozzi R, Masini E, Brunelleschi S, Mannaioni: Mediator release from isolated rat ileum in response to field stimulation. *Agents and Actions* 1984; 14: 405-409.

13. Tsuda A, Shibata O, Saito M, et all. A dose-response study of anticholinesterase drugs on contractile and phosphatidylinositol responses of rat trachea. *Anesthesia & Analgesia* 2001; 92: 100-105.

14. Stengel PW, Cohen ML: M1 receptor-mediated nitric oxide-dependent relaxation unmasked in stomach fundus from M3 receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 675-682.

15. Shehnaz D, Ansari ZK, Ehlert FJ: Acetylcholine-induced desensitization of the contractile response to histamine in guinea-pig ileum is prevented by either pertussis toxin treatment or by selective inactivation of muscarinic M3 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 1152-1159.

16. Koujirou Y, Yasufumi S, Tatsuji I: Pharmacodynamic analysis of cholinesterase inhibitors in rats. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 1996; 24: 327-347.

17. Deschamps A, Backman SB, Novak V, et all. Effects of the anticholinesterase edrophonium on spectral analysis of heart rate and blood pressure variability in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 112-117.

18. Sherby SM, Eldefrawi AT, Albuquerque EX, Eldefrawi ME: Comparison of the actions of carbamate anticholinesterases on the nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* 1985; 27: 343-348.



19. Kenakin TP, Beek D: Self-cancellation of Drug Properties as a mode of organ selectivity: the antimuscarinic effects of ambenonium. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1985; 232: 732-740.

20. Endou M, Tanito Y, Okumura F. A comparison between chronotropic effects of neostigmine and edrophonium in isolated guinea-pig right atrium. *Pharmacology and Exp. Therapeutics* 1997; 282: 1480-1486.

21. Eglen RM, Adham N, Whiting RL: Acute desensitization of muscarinic receptors in the isolated guinea-pig ileal longitudinal muscle. *J Auton Pharmacol* 1992; 12: 137-148.

22. Yost CS, Maestroni E: Clinical concentrations of edrophonium enhance desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor. *Anesth Analg* 1994; 78: 520-526.

23. Slater NT, Filbert M, Carpenter DO: Multiple interactions of anticholinesterases with *Aplysia* acetylcholine responses. *Brain Res* 1986; 375: 407-412.

Yazışma Adresi

İlker KELLE
Dicle Üniv. Tıp Fak., Tıbbi Farmakoloji A.D.
E-mail: ikel@dicle.edu.tr

