

Antikolinesteraz İlaçların Sıçan Mide Fundus Düz Kası Üzerine Anti-Muskarinik Etkileri

İlker Kelle

ÖZET

Çalışmamızda neostigmin, piridostigmin ve edrofonyumun yüksek dozlarında sıçan mide fundus düz kas dokularındaki muskarinik reseptörleri inhibe edip etmediklerini ve bu ilaçların sıçan intestinal düz kas kasılmaları üzerine olası dual etkilerini inceledik. Çalışmamızın başlangıcında ilk olarak betanekole kümülatif olarak kontrol kasılma yanıtları alındı. Takiben antikolinesterazların her bir konsantrasyonu sonrasında betanekol için kümülatif derişim-yanıt eğrileri elde edildi. Antikolinesterazlardan hiçbirisi ilk üç derişimlerinde (sırasıyla 1, 10 ve 100 µM), betanekol kasılma yanıtlarında herhangi bir güçlenmeye yol açmadı (p>0,05). Fakat 1mM'lık en yüksek derişimlerinde, neostigmin, edrofonyum ve piridostigmin, mide düz kas striplerinde betanekolle uyarılan düz kas kasılmalarını zayıflattı (p≤0,05; eşleştirilmiş Student's t test). Sonuçlar antikolinesterazların sıçan mide fundus preparatlarındaki kolinerjik kasılma yanıtları üzerinde dual etkili olmadıklarını düşündürmektedir. Antikolinesterazlar yüksek dozlarında, mide fundus düz kas kasılmaları üzerinde antimuskarinik etkilere yol açabilirler.

Anahtar Kelimeler: Antikolinesterazlar, Mide Fundus Düz Kası, Düz Kas Kasılması, Betanekol, Antimuskarinik Etkiler

The Antimuscarinic Effects of Anticholinesterase Drugs on Rat Gastric Fundus Smooth Muscle

SUMMARY

We investigated whether neostigmine, piridostigmine and edrophonium in larger doses inhibit muscarinic receptors of rat gastric fundus and whether those drugs have dual effects on rat intestinal smooth muscle contractions. Initially control contractile responses in a cumulative manner obtained for bethanechol, Following this, four different concentrations of each anticholinesterases (respectively 1, 10, 100 and 1000 µM) injected into the organ bath solution where smooth muscle strips attached. After each concentration of anticholinesterases, cumulative dose-response curves for bethanechol has been obtained. Our results show that none of the three anticholinesterases did cause any potentialization on contractile responses for bethanechol at their first three concentrations (respectively 1, 10 and 100 µM). But at their highest concentration such as 1000 µM, neostigmine, edrophonium and piridostigmine attenuated the bethanechol induced contractile responses (p ≤ 0,05; paired samples t test). These results suggest that anticholinesterases do not have dual effects on bethanechol induced contractile responses of rat gastric fundus smooth muscle preparations. Larger doses of anticholinesterases may evoke antimuscarinic effects on intestinal smooth muscle contractions.

Key Words: Anticholinesterases, Gastric Fundus Smooth Muscle, Smooth Muscle Contractility, Bethanechol, Antimuscarinic Effects.



GİRİŞ

Viseral ya da irade dışı aktivite gösteren sinir sistemi olarak da tanımlanabilen Otonom sinir sistemi, parasempatik ve sempatik olmak üzere iki ana bölümde incelenir (1). Parasempatik sinir sisteminin aktivasyonu sonucunda salıverilen asetilkolin (ACh)'in etkileri, kolinerjik sinapslarda yüksek konsantrasyonlarda bulunan, hem sinir hem de kas dokusunda sentezlenen protein yapısındaki asetilkolinesteraz (AChE) enzimi tarafından sonlandırılır (2).

Asetilkolinesterazı inhibe eden antikolinesterazların karakteristik farmakolojik etkileri, primer olarak kolinerjik yollarda ACh'nin AChE enzimi tarafından hidrolizini önlemeleri sonucunda gelişir. Bunun sonucunda kolinerjik impulslarla ya da spontan olarak sinir uçlarından salıverilen ACh'nin sinaptik aralıktaki düzeyi yükselir ve ACh'ne bağlı yanıtlarda şiddetlenme görülür (1).

Günümüzde halen tedavi amaçlı olarak kullanılan antikolinesterazlar, kolinerjik aktivitenin azaldığı durumlarda ACh konsantrasyonunu arttırarak non-selektif nitelikteki indirekt etkileriyle hem muskarinik hem de nikotinik etkiler oluştururlar.

Bununla birlikte bazı çalışmalarda antikolinesteraz ilaçların beklenenin aksine antimuskarinik etkiler de oluşturduğu bildirilmiştir. Kenakin TP ve ark. (3)'nin çalışmasında bir antikolinesteraz olan Ambenonyumun kobay barsak longitudinal düz kasında ve trakeasında ve sıçan anokoksigeus kasında dual etki yaptığı; düşük dozlarında antikolinesteraz etkinlik ile ACh'ne bağlı yanıtları güçlendirdiği, yüksek dozlarında ise antimuskarinik etki oluşturduğu bildirilmiştir. Endou M. ve ark. (4)'nin kobay sağ atriumunda yaptıkları bir başka çalışmada ise neostigmin ve edrofonyumun yüksek konsantrasyonlarda bir antimuskarinik ajan gibi davrandığı gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre biz de çalışmamızda, antikolinesteraz ilaçların olası antimuskarinik etkilerini sıçan mide fundus düz kasında araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda her bir Wistar albino sıçandan hazırlanan mide fundus düz kas striplerinde muskarinik agonistik etkili betanekol ile oluşturulan kasılma

yanıtları üzerine neostigmin, edrofonyum ve piridostigminin doza bağımlı etkilerini inceledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney hayvanları

Çalışmamızda Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezinden (DÜSAM) temin edilen her iki cinsiyetten 200-300 g ağırlığında 30 adet Wistar albino sıçan kullanıldı.

Oniki saatlik karanlık – aydınlık döngüsü ortamında oda sıcaklığında barındırılan sıçanlar, intestinal içeriğinin temizlenmesine kolaylık sağlaması amacıyla bir gece aç bırakıldı ancak su içmeleri kısıtlanmadı.

Deney planı

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 mideye ulaşıldı. Mide karın boşluğundan çıkarıldıktan sonra mide fundusu, korpus bölgesinden ayrıldı ve içinde Tyrode solüsyonu bulunan bir kaba aktarıldı. Vane yöntemine (5) göre mide fundusu küçük kurvaturdan kesilip açılarak transvers kesilerle 1,5-2 cm'lik stripler hazırlandı. Stripler, 5/0 - 6/0 atravmatik krome katgüt sütür materyali kullanılarak izole organ banyosuna asılacak hale getirildi. Her bir strip için bir seri deney gerçekleştirildi. Hazırlanan tüm mide stripleri aynı gün içinde kullanıldı; hemen kullanılmayan stripler 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 chloloride (Riedel-De Hoen Agseelze).

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 aktarılarak değerlendirilmesinde ise BIOPAC Student Lab PRO Manual Professional Version 3.6.6 for PC with Windows programından yararlanıldı.

İn vitro organ banyosu deneyleri

37°C'ye kadar ısıtılmış ve sürekli olarak havalandırılan organ banyosunun içindeki mide fundus düz kas preparatlarına 1 g'lık gerilim uygulandı. İlaç uygulamasına geçilmeden önce, her 15 dakikada bir kez lavaj yapılmak suretiyle dokuların 45 dakika süreyle banyo ortamına adapte olmaları sağlandı. Adaptasyon süresinin sonunda her üç kanaldaki düz kas preparatları üzerinde önce agonist etkili betanekol için; organ banyosu içerisinde 0,01 µM'dan başlayarak sırasıyla 0,1 µM, 1 µM, 10 µM ve 100 µM'lık derişimler elde edilecek şekilde yapılan 1'er diziemlik ilavelerle kümülatif tipte kontrol derişim-yanıt eğrisi alındı. Takiben yapılan yıkama işlemi, her 5 dk'da 1 kez olmak üzere 3 kez tekrarlandı.

En son yıkama işleminden 5 dk sonra, 1 no'lu organ banyosuna neostigmin, 2 no'lu organ banyosuna edrofonyum, 3 no'lu organ banyosuna piridostigmin; ortamda 1µM'lık derişimleri oluşacak şekilde 1'er diziemlik enjeksiyonlarla katıldı. Enjeksiyonların doğrudan doku üzerine yönelmemesine dikkat edildi.

1'er diziemlik ilaveler şeklinde tatbik edilen herbir antikolinesteraz için 10 dk beklenildikten sonra tekrar betanekol için kümülatif tipte derişim-yanıt eğrileri alındı. Yanıtlar sonrasında yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işlemi her 5 dk'da 1 kez olmak üzere 3 kez tekrarlandı. Antikolinesterazlar sonrası betanekol için derişim-yanıt eğrileri 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

İlaç uygulaması öncesinde 1 g'lık gerilim uygulanan sıçan ileum preparatlarının antikolinesterazlarla muamele olmalarını takip en betanekole verdiği kasılma yanıtları, BIOPAC Student Lab PRO MPV 3.6.6 for PC programında 'peak to peak' değerleri hesaplanarak gram (g) cinsinden ifade edildi.

Deneylerimizde betanekol ve antikolinesterazlar sonrasında betanekol için alınan derişim-yanıt eğrileri, en son aşamada uygulanan BaCl₂ ile oluşturulan kasılma yanıtlarıyla karşılaştırıldı ve yüzde (%) olarak gösterildi.

Her bir seri deneyden elde edilen doz-yanıt eğrileri için EC50 ve -logEC50 (PD2) değerleri, Graph Pad Prism Version 4.00 (Trial) for Windows, San Diego, USA programı kullanılarak non-lineer regresyon analizi ile hesaplandı. Bütün veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası (SH) şeklinde ifade edildi.

Her bir antikolinesterazın, betanekol için Emaks ve EC50 değerleri üzerine olan etkileri Eşleştirilmiş Student's T testi ile değerlendirilirken, bu etkiler bakımından antikolinesterazlar arasında fark bulunup bulunmadığı One-way



varyans analizi (ANOVA) ile incelendi. $P \leq 0,05$ olması durumunda aradaki farkın anlamlı olduğu kanısına varıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda kullandığımız mide fundus striplerinden betanekolün kümülatif dozları sonrasında elde edilen kontrol kasılma yanıtlarına ait Emaks ve $-\log EC_{50}$ değerleri ile, neostigminin, edrofonyum ve piridostigminin $1 \mu M$ 'dan başlayarak sırasıyla $10 \mu M$, $100 \mu M$ ve $1000 \mu M$ 'lık artan derişimleri sonrasında betanekol için elde edilen Emaks ve $-\log EC_{50}$ değerleri arasında yapılan istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 1'de; her bir antikolinesterazın 4 farklı derişiminin, kümülatif tipteki betanekol doz-yanıt eğrisi üzerine olan etkileri ve $1000 \mu M$ 'lık antikolinesteraz derişiminde kasılma yanıtlarındaki anlamlı düşüş sırasıyla Şekil 1, 2 ve 3'de gösterilmiştir.

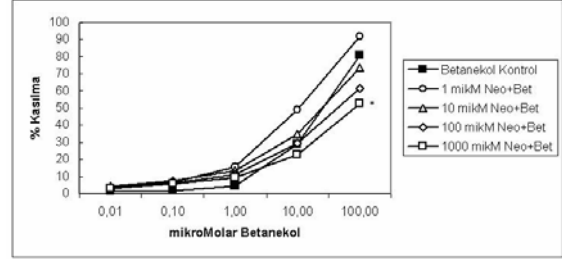
Her üç antikolinesteraz da $1 \mu M$, $10 \mu M$ ve $100 \mu M$ 'lık derişimlerinde, mide fundus düz kas preparatlarından elde edilen kümülatif tipteki doz – yanıt eğrilerinin Emaks değerlerinde kontrol yanıtlarına göre anlamlı bir artış oluşturmamış; buna karşılık neostigmin ve piridostigmin, edrofonyumdan farklı olarak bütün derişimlerinde $-\log EC_{50}$ değerlerinde bir artışa yol açmışlardır ($n = 24$, $p \leq 0,05$) Edrofonyum ise sadece $1000 \mu M$ 'lık derişiminde $\log EC_{50}$ değerlerini anlamlı olarak yükseltmiştir ($n=24$, $p \leq 0,05$), (Tablo 1)

Tablo 1. Sıçan mide fundus dokusunda antikolinesterazların $1 \mu M$ 'dan itibaren artan derişimlerdeki uygulamalarının, betanekol için alınan kümülatif doz-yanıt eğrilerinin- $\log EC_{50}$ ve Emaks değerleri üzerine olan etkileri ve bu etkilerin istatistiksel değerlendirme sonuçları görülmektedir (Eşleştirilmiş Student's t testi).

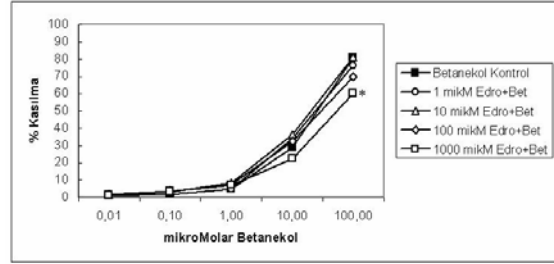
Tablo 1	$-\log EC_{50}$	% E maks
Betanekol kontrol yanıtları		
Neostigmin $1 \mu M$ + Bet	$4,29 \pm 0,085$	% $80,6 \pm 4,6$
$10 \mu M$ + Bet	$4,58 \pm 0,095^*$	% $92,0 \pm 7,1$
$100 \mu M$ + Bet	$4,60 \pm 0,108^*$	% $73,5 \pm 6,2$
$1000 \mu M$ + Bet	$4,66 \pm 0,136^*$	% $61,6 \pm 5,6$
Edrofonyum $1 \mu M$ + Bet	$4,75 \pm 0,078^*$	% $52,7 \pm 6,0^*$
$10 \mu M$ + Bet	$4,45 \pm 0,124$	% $76,6 \pm 5,4$
$100 \mu M$ + Bet	$4,42 \pm 0,149$	% $81,3 \pm 6,4$
$1000 \mu M$ + Bet	$4,49 \pm 0,138$	% $70,0 \pm 5,4$
Piridostigmin $1 \mu M$ + Bet	$4,55 \pm 0,101^*$	% $60,3 \pm 5,3^*$
$10 \mu M$ + Bet	$4,62 \pm 0,107^*$	% $97,8 \pm 9,1$
$100 \mu M$ + Bet	$4,58 \pm 0,096^*$	% $83,9 \pm 8,1$
$1000 \mu M$ + Bet	$4,65 \pm 0,092^*$	% $60,7 \pm 5,4$
$1000 \mu M$ + Bet	$4,73 \pm 0,083^*$	% $53,1 \pm 5,1^*$

*Kontrolle göre farklı ($p < 0,05$)

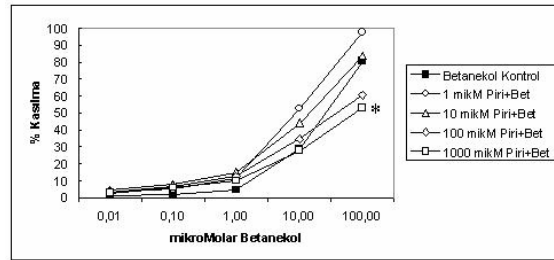
Emaks değerlerinde anlamlı düşüşün yanı sıra $-\log EC_{50}$ değerlerinde belirgin artış ($n = 24$, $p \leq 0,05$), her üç antikolinesterazın $1000 \mu M$ 'lık derişimlerinde gerçekleşmiştir ($n = 24$, $p \leq 0,05$), (Şekil 4, 5).



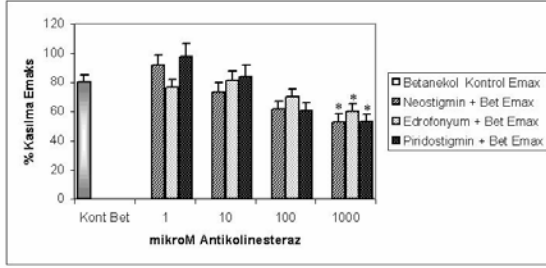
Şekil 1. Artan derişimlerdeki neostigmin uygulamasının kümülatif tipteki betanekol doz-yanıt eğrisi üzerine olan etkileri ve neostigminin $1000 \mu M$ 'lık derişiminin kasılma yanıtlarında oluşturduğu belirgin düşüş görülmektedir ($n = 24$, $p \leq 0,05$).



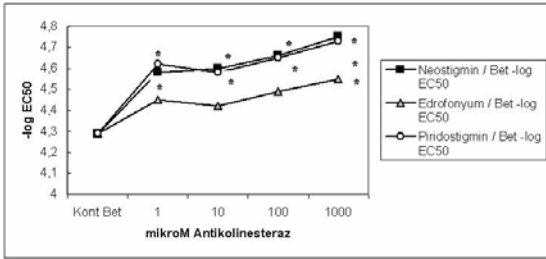
Şekil 2. Artan derişimlerdeki edrofonyum uygulamasının kümülatif tipteki betanekol doz-yanıt eğrisi üzerine olan etkileri ve $1000 \mu M$ 'lık edrofonyum derişiminin kasılma yanıtları üzerinde oluşturduğu anlamlı düşüş görülmektedir ($n = 24$, $p \leq 0,05$).



Şekil 3. Artan derişimlerdeki piridostigmin uygulamasının kümülatif tipteki betanekol doz-yanıt eğrisi üzerine olan etkileri ve $1000 \mu M$ 'lık piridostigmin derişiminin kasılma yanıtları üzerinde oluşturduğu anlamlı düşüş görülmektedir ($n = 24$, $p \leq 0,05$).



Şekil 4. Sıçan mide fundus dokusunda her üç antikolinesterazın artan derişimlerdeki uygulamalarını takiben betanekol doz-yanıt eğrilerinden elde edilen Emaks değerlerinin kontrol Emaks değerlerine göre değişimi görölmektedir.



Şekil 5. Artan derişimlerde uygulanan farklı antikolinesterazların betanekol kontrol yanıtlarının $-\log EC_{50}$ değerleri üzerine olan etkileri görölmektedir. Mide fundus striplerinden betanekolün kümülatif dozları için alınan kasılma yanıtı ve EC_{50} değerleri üzerine üç ayrı antikolinesterazın etkileri arasındaki farklılık açısından yapılan one-way varyans analizine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

TARTIŞMA

Memeli türlerinin gastrointestinal kanalının intrinsek ve ekstrinsek inervasyonunda görev alan çok sayıda nörotransmitter madde tanımlanmıştır. Bu maddelerden Asetilkolin (ACh), sıçan duodenum ve ileumunda yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır; buna göre antikolinesterazlar gibi kolinerjik agonistler in vitro olarak sıçan intestinal sistem düz kaslarında kasılma yanıtına yol açabilirler (6).

Antikolinesteraz ilaçlar, AChE enzimini inhibe etmek suretiyle otonomik gangliyonlarda ki sinapslar dahil bütün kolinerjik kavşaklarda ACh birikmesine neden olarak indirekt parasempatometik etkinlik gösterirler (7).

Antikolinesteraz ilaçların intestinal motilite üzerine olan etkileri muhtemelen intramural Auerbach pleksusundaki gangliyon hücrelerinde ve düz kas liflerinde, sırasıyla pregangliyonik ve postgangliyonik liflerden salıverilen ACh'nin AChE enziminin yıkılmasını önlemek suretiyle oluşturdukları etkilerin kombinasyonundan ibarettir (1).

Antikolinesterazlar sayılan etkilerinin dışında, yüksek dozlarda kullanıldıklarında ACh'in nöromuskuler kavşakta çok yüksek konsantrasyonlarda birikmesine yol açarak, başlangıçtaki stimülasyonu takiben devamlı depolarizasyon ve buna bağlı desensitizasyon oluşturmak suretiyle kaslarda felçlere ve çeşitli antimuskarinik etkilere yol açabilirler (7).

Bazı çalışmalarda dolaylı etkilerinin yanısıra antikolinesterazlardan neostigmin ve edrofonyumun $100\mu M$ ve üzerindeki derişimlerinde, ACh aracılığıyla oluşturdukları desensitizasyon etkisinden bağımsız olarak postsinaptik kardiyak muskarinik ACh reseptörlerini doğrudan inhibe etmek suretiyle antimuskarinik etkilere yol açabilecekleri de ifade edilmiştir (4).

Benzer sonuçlar, sıçan trakeal düz kas preparatlarında antikolinesteraz ilaçların dual etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada da görölmüştür. Karbakol ile uyarılan trakeal kasılmalar, neostigmin, piridostigmin ve edrofonyumun $1000\mu M$ 'lık derişimlerinde belirgin şekilde zayıflamıştır. Araştırmacılar antikolinesterazların, trakeal dokudaki kasılma yanıtı üzerindeki doza bağımlı etkilerine M_3 muskarinik reseptörlerinin aracılık ettiğini ileri sürmüşlerdir(8).

Deschamps ve ark.(9)'ı, 25 hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada, edrofonyumun, insanlardaki kardiyovasküler otonomik kontrol üzerinde düşük dozlarında güçlendirici; yüksek dozlarında ise zayıflatıcı yönde etki oluşturarak bifazik bir etki kalıbı gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Yine ambenonyum, kobay ileal longitudinal düz kasında ve trakeasında ve ayrıca sıçan anokoksigeus kasında, dokuların ACh'ne verdiği yanıt üzerinde dual etkiler oluşturmaktadır; önce asetilkolinesterazı inhibe etmek suretiyle bu yanıtı güçlendirmekte ve eş zamanlı olarak da muskarinik reseptörler



üzerinde blokaj oluşturarak yanıtları antagonize edebilmektedir (3).

Yost ve Maestrono (10), antikolinesterazlardan edrofonyum, neostigmin ve piridostigminin *Xenopus laevis* oositlerinde, bir nikotinik agonist olan dimetilfenil piperazinyum ile uyarılan nikotinik ACh reseptörlerinin aktivitesi üzerinde doza bağımlı bir inhibisyon oluşturmuştur. Antikolinesterazlar bu inhibisyonu muhtemelen ACh reseptörlerine doğrudan bağlanmak suretiyle ACh'nin etkisini antagonize ederek oluştururlar. Buna göre sayılan antikolinesterazlar bir anlamda parsiyel agonist gibi hareket ederek reseptör desensitizasyonuna yol açabilirler (11).

Yapılan çalışmaların sonuçlarından otonomik kolinerjik yollarda antikolinesterazların yüksek konsantrasyonlardaki uygulamalarına bağlı olarak antimuskarinik ve/veya antinikotinik etkiler de oluşturabileceği anlaşılmaktadır. Bu sonuçları zemin alarak gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda antikolinesterazlardan neostigmin, edrofonyum ve piridostigminin sıçan mide fundus düz kasındaki kasılma yanıtları üzerine olası dual etkilerini gözlemlemeyi amaçladık.

Çalışmamızda kullandığımız sıçan mide fundus düz kas striplerinde, gerek neostigmin gerekse piridostigminin sırasıyla 1 μ M, 10 μ M ve 100 μ M'lık derişimleri, betanekol ile oluşturulan kasılma yanıtlarında anlamlı bir artışa yol açmadı. Buna karşılık, her iki kolinesteraz inhibitörünün 1000 μ M'lık derişiminde betanekol ile uyarılan kasılma yanıtlarının E maks değerleri belirgin bir düşüş gösterirken, $-\log EC_{50}$ değerlerinde de anlamlı bir artış saptandı.

Sayılan etkiler edrofonyum için de benzer şekilde gelişti. Edrofonyumun sırasıyla 1 μ M, 10 μ M ve 100 μ M'lık ilk üç derişimi için betanekol ile oluşturulan kasılma yanıtlarının $-\log EC_{50}$ ve E maks değerlerinde anlamlı bir değişiklik oluşmadı. Edrofonyumun 1000 μ M'lık derişimi sonrasında ise, betanekol kasılma yanıtlarının $-\log EC_{50}$ değerleri anlamlı bir şekilde yükselirken, E maks değerleri belirgin biçimde düşüş gösterdi.

Bu sonuçlara göre neostigmin, edrofonyum ve piridostigminin, sıçan mide fundus dokularında düşük dozlarında kasılma yanıtları üzerinde etkisiz kaldığı, ancak 1000 μ M'lık

derişimlerinde belirgin bir antimuskarinik etki oluşturdukları, dolayısıyla da dual etkili olmadıkları anlaşılmaktadır.

Muskarinik M_3 reseptörleri ve kısmen de M_2 reseptörleri, fare mide fundusunda karbakol ya da betanekol gibi agonist etkili ajanlarla oluşturulan kasılma yanıtlarına aracılık ederler. Düz kasların özellikle de mide fundusunun kasılmasından başlıca M_3 reseptörlerinin aktivasyonu sorumludur. M_3 reseptörsüz farelerin mide fundusları kullanılarak yapılan çalışmalar, karbakole bağlı belirgin gevşeme yanıtlarının gelişebileceğini göstermiştir. Fare mide fundusunun muskarinik gevşeme yanıtı açık bir şekilde NO salınımına yol açan nöronal M_1 reseptörleri üzerinden gelişir. Bu görüş, selektif M_1 agonistik etkili *McN-A-343*'ün, karbakol gibi fare mide fundusunu gevşettiği ve selektif M_1 reseptör antagonisti pirenzepinin, gerek karbakol gerekse *McN-A-343* ile oluşan gevşeme yanıtlarını inhibe ettiği yönündeki gözlemlerle desteklenmiştir (12).

Ancak mide fundusu ya da ileum düz kaslarında gözlenen M_1 reseptör aracılı gevşeme yanıtlarında diğer muskarinik reseptörlerde muskarinik agonistlere bağlı desensitizasyon gelişiminin de bir katkısı olabilir. Bu desensitizasyon etkisi, sadece M_3 selektif antagonist olan P-floro-hekzahidrosiladifenidol ile dokuların muamele edilmesi sonucunda önlenabilir (13). Desensitizasyon etkisi aynı zamanda kolinerjik nikotinik reseptörlerde de görülebilir. Zira Tsuda ve ark. (2001)'nin belirttiğine göre Yost ve Maestrono, neostigmin ve edrofonyumun doza bağlı olarak nikotinik ACh reseptörlerini inhibe edebileceklerini göstermişlerdir.

Yapılan çalışmalardan M_4 muskarinik reseptörlerinin düz kas kasılmalarına bir katkısının olmadığı anlaşılmaktadır (14). Ayrıca sıçan trakeal düz kaslarındaki kasılma yanıtlarında antikolinesterazların yüksek dozlarına bağlı gelişen zayıflamanın, bir M_2 reseptör antagonisti olan Metoktraminden etkilenmemesi nedeniyle M_2 reseptörleri üzerinden gelişmediği düşünülebilir (8).

O halde, antikolinesterazların yüksek konsantrasyonlarında intestinal düz kas dokularında görülen antimuskarinik etkilerden, M_1 , M_2 ve M_4 reseptörlerinden ziyade M_3

muskarinik reseptörleri sorumlu tutulabilir (8).

Antikolinesterazlar için trakeal düz kas hücrelerinin muskarinik M_3 reseptörleri üzerinde iki bağlanma yeri bulunur (4, 8). Muskarinik reseptörün bir klasik (ortosterik) – bağlantı bölgesi ve bir de allosterik bağlantı bölgesi vardır. Klasik bağlantı bölgesi, antikolinesteraz için yüksek afinitelidir; bu bölgedeki bağlantı dokuların yıkanmasıyla bozulmayacak derecede sağlamdır ve antikolinesterazın agonistik etkilerine aracılık etmektedir. Diğer taraftan allosterik bölge, antikolinesteraz ajan için düşük afinitelidir; antikolinesterazla arasındaki bağ yıkanmayla kolayca bozulur ve antagonistik etkilere aracılık eder (4, 8). Allosterik bağlantı bölgesinin aktivasyonu, agonistlerin reseptöre bağlanması ve ayrılması süreçlerini değiştirirken, klasik (ortosterik) bağlantı bölgesinin fonksiyonlarını da etkiler. Tsuda ve ark.(8)'nin çalışmasında, trakeal kasılmalarda antikolinesterazların yüksek dozlarında oluşan gevşeme, dokuların yıkanmasından sonra ortadan kalktığı için, neostigmin, edrofonyum ve piridostigminin, yüksek dozlarında M_3 muskarinik reseptörlerinin fonksiyonlarını inhibe eden allosterik bölgeye bağlandığı ve böylelikle kasılma ve PI yanıtlarında bir düşüşe yol açtıkları sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız antikolinesterazlar, düşük dozlarında kolinesteraz enzimini inhibe etmek suretiyle sinaptik aralıktaki ACh düzeyini yükseltmiş ve bir parasempatometik etkinlik oluşturmuştur ancak bu etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Neostigmin, edrofonyum ve piridostigmin, 1000 μM 'lık derişimlerinde gözlenen antimuskarinik etkilerini muhtemelen sinaptik bölgedeki muskarinik reseptörler için ACh ve betanekol ile yarışmaya girmek ve M_3 reseptörlerinin düşük afiniteli allosterik bölgesine bağlanmak suretiyle oluşturmuştur (4, 8, 10, 11, 15, 16). Nitekim neostigmin ve piridostigminin 1000 μM 'lık derişimini takiben betanekol uygulaması sonrasında dokuların yıkanmasıyla gözlenen antimuskarinik etkiler ortadan kalkmıştır.

Bu verilere göre neostigmin, edrofonyum ve piridostigmin, sıçan mide fundus düz kas striplerindeki kasılma yanıtları üzerinde dual etki kalıbı sergilememektedir. Antikolinesteraz-

ların yüksek dozlarında gözlenen antimuskarinik etkilerine, olasılıkla M_3 muskarinik reseptörlerinde ve intestinal sistem parasempatik gangliyon hücrelerindeki nikotinik reseptörlerde, parsiyel agonistik etkinlik ile desensitizasyon oluşturmaları aracılık edebilir.

KAYNAKLAR

1. Goodman Gilman A; Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Ninth Edition, McGraw-Hill Medical Publishing Division; 1996. p. 105-6, 161-63, 171.

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

3. 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: 732-40.

4. 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.

5. Pharmacological Experiments on Isolated Preparations. Experiments with Intestinal Smooth Muscle. University of Edinburgh, Preface by PERRY W. L. M., Churchill Livingstone, Edinburgh, LONDON and NEW YORK; 1970. p. 58 – 62, 88 – 89.

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

7. Kayaalp SO. Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji. Kolinomimetik ilaçlar: Parasempatometik ilaçlar ve antikolinesterazlar. Cilt II, sekizinci baskı, Ankara: Feryal Matbaacılık; 1998. p. 1136-52.

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



9. Deschamps A, Backman SB, Novak V et al: 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.

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

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

12. 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.

13. 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.

14. Stengel PW, Gomez J, Wess J, Cohen ML: M(2) and M(4) receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 877-885.

15. Tanito Y, Miwa T, Endou M et al: Interaction of edrophonium with muscarinic acetylcholine M2 and M3 receptors. *Anesthesiology* 2001; 94: 804-814.

16. Eglen RM, Adham N, Whiting RL: Acute desensitization of muscarinic receptors in the isolated guinea-pig ileal longitudinal muscle. *J Auton Pharmacol* 1992; 12: 137-48.

Yazışma Adresi

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

