

Antikolinesteraz İlaçların Sıçan İleum Düz Kasında Betanekol İle Uyarılan Kasılma Yanıtlarına Etkisi

Ilker Kelle

ÖZET

Günümüzde halen tedavi amaçlı olarak intestinal sistem ve mesane düz kaslarının atonisinde, glokomda, myastenia graviste ve kompetitif nöromuskuler kas gevşeticilerin etkilerinin sonlandırılmasında kullanılan antikolinesterazlar, bu gibi kolinerjik aktivitenin azaldığı durumlarda reseptörler üzerine selektif etkiler oluşturmaktan ziyade ACh konsantrasyonunu artırarak dolaylı etkileriyle non-selektif olarak hem muskarinik hem de nikotinik etkiler oluştururlar. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda antikolinesteraz ilaçların doğrudan antimuskarinik etkiler de oluşturabileceği bildirilmiştir. Biz de çalışmamızda bu amaçla, her bir Wistar albino sıçandan hazırlanan ileum düz kas preparatlarında muskarinik agonistik etkili betanekol ile oluşturulan kasılma yanıtları üzerine neostigmin, edrofonyum ve piridostigminin doza bağımlı etkilerini inceledik. Antikolinesterazların hiçbirisi ilk üç derişimlerinde betanekol kasılma yanıtlarında bir güçlenmeye yol açmadı ($p > 0,05$; eşleştirilmiş Student's t test). Fakat $1000\mu\text{M}$ 'lık en yüksek derişimlerinde, neostigmin, edrofonyum ve piridostigmin, ileum düz kas preparatlarında betanekol ile uyarılan düz kas kasılmalarını zayıflattı ($p \leq 0,05$; paired samples t test). Sonuçlar antikolinesterazların sıçan ileum preparatlarındaki kolinerjik kasılma yanıtları üzerinde dual etkili olmadıklarını düşündürmektedir. Antikolinesterazlar yüksek dozlarında, ileum düz kas kasılmaları üzerinde antimuskarinik etkilere yol açabilirler.

Anahtar Kelimeler: Antikolinesterazlar, İleum Düz Kası, Düz Kas Kasılması, Betanekol, Antimuskarinik Etkiler.

The Effects of Anticholinesterase Drugs on Bethanechol-Induced Contractile Responses in Rat Ileum Smooth Muscle

SUMMARY

At present, anticholinesterase drugs are valuable as therapeutic agents when cholinergic activity decreased in cases such as glokom, myastenia gravis and postoperative period which induces atony in bladder and intestinal smooth muscles. In these conditions anticholinesterases are expected to increase the levels of acetylcholine by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase, thus they can exhibit both muscarinic and nicotinic effects indirectly rather than constituting a direct effect on muscarinic receptors. But recently, it has been shown that anticholinesterase drugs may exhibit a dose-dependent antimuscarinic effect by interacting with muscarinic receptors directly. According to these results, we investigated the dose-dependent effects of anticholinesterases on bethanechol-induced contractile responses at ileum smooth muscle preparations. Our results show that none of the three anticholinesterases did cause any potentialization on contractile responses for bethanechol at their first three concentrations ($p > 0,05$; paired samples t test). But at their highest concentration such as $1000\mu\text{M}$, neostigmine, edrophonium and piridostigmine attenuated the bethanechol induced contractile responses ($p \leq 0,05$; paired samples t test). These results suggest that anticholinesterases do not have dual effects on bethanechol induced contractile responses in rat ileum smooth muscle preparations. Larger doses of anticholinesterases may evoke antimuscarinic effects on ileum smooth muscle contractions.

Key Words: Anticholinesterases, Ileum Smooth Muscle, Smooth Muscle Contractions, Bethanechol, Antimuscarinic Effects.

GİRİŞ

Otonom sinir sistemi, viseral, vejetatif ya da irade dışı aktivite gösteren sinir sistemi şeklinde tanımlanabilir. Otonom sinir sisteminin periferik kısmı kalp, kan damarları, salgı bezleri, diğer viseral organlar ve düz kasları inerve eden sinirler, gangliyonlar ve pleksuslardan oluşmaktadır. Otonom sinir sisteminin periferik kısımlarını oluşturan pregangliyonik otonomik liflerin tamamında, bütün postgangliyonik parasempatik liflerde ve birkaç postgangliyonik sempatik sinir lifinde nörotransmitter madde asetilkolin (ACh)'dir ve ACh salıveren bu liflere de kolinerjik lifler adı verilir (1).

Otonomik ve somatik motor sinirlerden salınan ACh'nin etkileri, molekülün enzimatik yıkımıyla sonlandırılır. Hidroliz olayı, kolinerjik sinapslarda yüksek konsantrasyonlarda bulunan, hem sinir hem de kas dokusunda sentezlenen protein yapısındaki asetilkolinesteraz (AChE) enzimi tarafından gerçekleştirilir (2).

AChE'yi inhibe eden ilaçlara antikolinesteraz ajanlar adı verilir. Antikolinesterazların karakteristik farmakolojik etkileri, primer olarak kolinerjik yollarda ACh'nin AChE enzimi tarafından hidrolizini önlemeleriyle oluşur. 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, postoperatif dönemde görülen intestinal sistem ve mesane düz kaslarının atonisinde, glokomda, myastenia graviste ve kompetitif nöromuskuler kas gevşeticilerin etkilerinin sonlandırılmasında kullanılan antikolinesterazlar, bu gibi kolinerjik aktivitenin azaldığı durumlarda reseptörler üzerine selektif etkiler oluşturmaktan ziyade ACh konsantrasyonunu arttırarak dolaylı etkileriyle non-selektif olarak hem muskarinik hem de nikotinik etkiler oluştururlar.

Ancak son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda antikolinesteraz ilaçların doğrudan antimuskarinik etkiler de oluşturabileceği bildirilmiştir. Tsuda A. ve ark. (3)'ü sıçan trakeasında yaptıkları bir çalışmada Neostigmin, Edrofonyum ve Piridostigmin gibi

antikolinesterazların yüksek dozlarda düz kas gevşemesine yol açtıklarını göstermişlerdir. Deschamps ve ark.(4)'ü ise, 25 hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada, bir antikolinesteraz olan edrofonyumun, insanlardaki kardiyovasküler otonomik kontrol üzerinde düşük dozlarında güçlendirici; yüksek dozlarında ise zayıflatıcı yönde etki oluşturarak bifazik bir etki kalıbı gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Bu veriler ışığında biz de çalışmamızda etki süreleri farklı olan antikolinesteraz ilaçların olası antimuskarinik etkilerini sıçan ileum düz kasında araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda her bir Wistar albino sıçandan hazırlanan ileum düz kas preparatlarında 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 sağlama 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 ileuma ulaşıldı.

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 (5) göre 1,5-2 cm'lik tüpler şeklinde kesildi. İleumdan hazırlanan tüpler, 5/0-6/0 atravmatik krome katgüt suture materyali kullanılarak izole organ banyosuna asılacak preparatlar haline getirildi. Her bir preparat için bir seri deney gerçekleştirildi. Hazırlanan tüm 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 Enstitüsüne (NIH) 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 aktarılarak değerlendirilmesinde ise BIOPAC Student Lab PRO Manual Professional Version 3.6.6 for PC with Windows programından yararlanıldı.

İn Vitro Organ Banyosu Deneyleri

Araştırmamızda her bir Wistar albino sıçandan hazırlanan üç adet ileum düz kas preparatı, dört kanallı 20 ml'lik izole organ banyomuzun sırasıyla 1, 2 ve 3 no'lu kanallarına asıldı. 37°C'ye kadar ısıtılmış ve sürekli olarak havalandırılan organ banyosunun içindeki ileum 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 içinde 0,01 µM'dan başlayarak sırasıyla 0,1 µM, 1 µM, 10 µM ve 100 µM'lık derişimler elde edilecek şekilde yapılan 1'er diziyelemlik 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 diziyelemlik enjeksiyonlarla katıldı. Enjeksiyonların doğrudan doku üzerine yönelmemesine dikkat edildi.

Birer diziyelemlik ilaveler ile 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. Antikolinesterazları takiben betanekol için derişim-yanıt eğrileri alınması ve ardından dokuların yıkanması şeklinde uygulanan deney serileri, antikolinesterazların 1µM, 10µM, 100µM ve 1000µM'lık artan derişimleri için ayrı ayrı tekrarlandı.



En son aşamada, ileum düz kas preparatları 10 mmol/L BaCl₂ ile muamele edilerek, artan konsantrasyonlardaki antikolinesterazların etkisi altındaki dokulardan betanekol için alınan yanıtların mukayese edilebileceği maksimum kasılma yanıtları oluşturuldu.

Veri Analizi

İlaç uygulaması öncesinde 1 g'lık gerilim uygulanan sıçan ileum preparatlarının antikolinesterazlarla muamele olmalarını takiben 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. Deneşlerimizde 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 tanımlandı.

Her bir antikolinesterazın, betanekol için Emaks ve EC₅₀ değerleri üzerine olan 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

Çalışmamızda kullandığımız ileum striplerinden betanekolün kümülatif dozları için elde edilen kontrol kasılma yanıtlarına ait Emaks ve -log EC₅₀ değerleri ile, neostigminin, edrofonyum ve piridostigminin 1 µM'dan başlayarak sırasıyla 10µM, 100µM ve 1000µM'lık artan derişimleri sonrasında betanekol ile elde edilen Emaks ve -log EC₅₀ 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 µM'lık antikolinesteraz derişiminde kasılma yanıtlarındaki anlamlı düşüş sırasıyla Şekil 1, 2 ve 3'de gösterilmiştir.

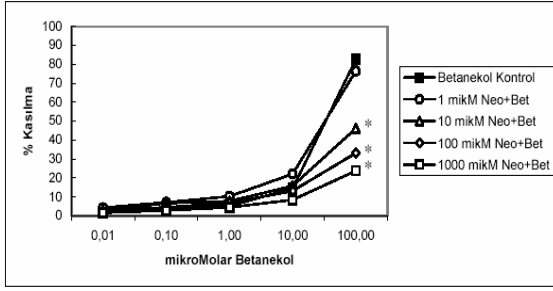
Her üç antikolinesteraz da düşük derişimlerinde, ileum düz kas preparatlarından elde edilen kümülatif tipteki doz - yanıt eğrilerinin Emaks ve -log EC₅₀ değerlerinde kontrol yanıtlarına göre anlamlı bir artış oluşturmamıştır (n = 24, p > 0,05), (Tablo 1).

Betanekol için Emaks değerlerinde anlamlı düşüşün yanısıra, -log EC₅₀ değerlerinde belirgin artış (n = 24, p ≤ 0,05), her üç antikolinesterazın 1000 µM'lık derişimlerinde gerçekleşmiştir (n = 24, p ≤ 0,05), (Şekil 4, 5).

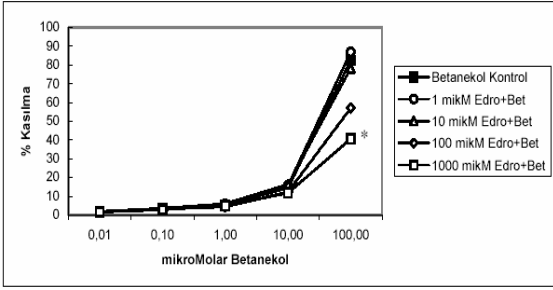
Tablo 1. Sıçan ileum dokusunda neostigminin, edrofonyum ve piridostigminin 1 µM'dan itibaren artan derişimlerdeki uygulamalarının, betanekol için alınan kümülatif doz-yanıt eğrilerinin -logEC₅₀ ve Emaks değerleri üzerine olan etkileri ve bu etkilerin istatistiksel değerlendirme sonuçları görülmektedir (Eşleştirilmiş Student's t testi). *Kontrolle göre farklı(p < 0,05).

	- log EC 50	% E maks
Betanekol kontrol yanıtları	3,53 ± 0,083	% 82,6 ± 6,0
Neostigmin 1µM + Bet	3,96 ± 0,110*	% 76,5 ± 10,0
10µM + Bet	4,23 ± 0,129*	% 46,2 ± 6,2*
100µM + Bet	4,25 ± 0,131*	% 33,2 ± 4,8*
1000µM + Bet	4,36 ± 0,092*	% 23,8 ± 2,3*
Edrofonyum 1µM + Bet	3,54 ± 0,158	% 87,0 ± 8,5
10µM + Bet	3,70 ± 0,149	% 78,3 ± 7,6
100µM + Bet	3,84 ± 0,141	% 57,1 ± 5,8
1000µM + Bet	4,05 ± 0,162*	% 40,1 ± 4,5*
Piridostigmin 1µM + Bet	3,86 ± 0,132	% 80,0 ± 10,3
10µM + Bet	4,05 ± 0,079	% 63,2 ± 7,7
100µM + Bet	4,17 ± 0,123*	% 35,7 ± 4,3*
1000µM + Bet	4,20 ± 0,120*	% 25,5 ± 2,5*

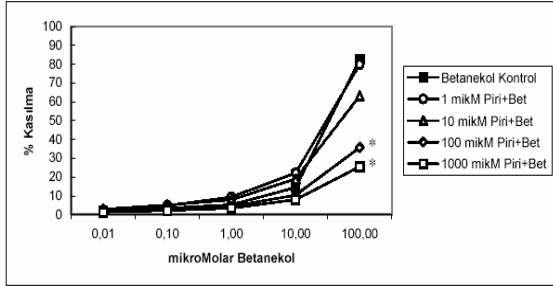




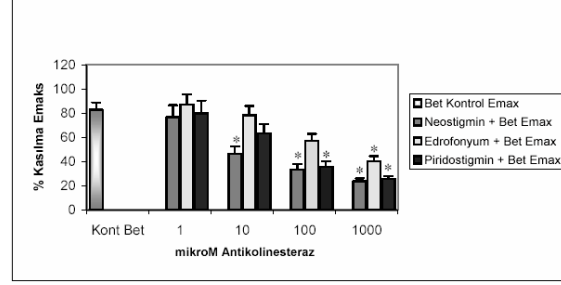
Şekil 1. Artan derişimlerdeki neostigmin uygulamasının kümülatif tipteki betanekol doz-yanıt eğrisi üzerine olan etkileri ve 1000 µM'lık neostigmin derişiminde kasılma yanıtlarındaki anlamlı düşüş görülmektedir (n = 24, p ≤ 0,05).



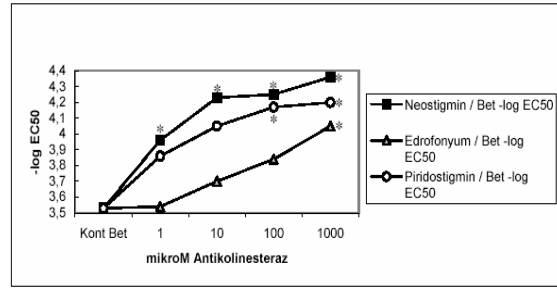
Şekil 2. Artan derişimlerdeki edrofonyum uygulamasının sıçan ileum düz kas preparatlarında kümülatif tipteki betanekol doz-yanıt eğrisi üzerine olan etkileri ve 1000 µM'lık edrofonyum derişiminin kasılma yanıtları üzerinde oluşturduğu anlamlı düşüş görülmektedir (n = 24, p ≤ 0,05).



Şekil 3. Artan derişimlerdeki neostigmin uygulamasının kümülatif tipteki betanekol doz-yanıt eğrisi üzerine olan etkileri ve 100 ve 1000 µM'lık piridostigmin derişiminde kasılma yanıtlarındaki anlamlı düşüş görülmektedir (n = 24, p ≤ 0,05).



Şekil 4. Sıçan ileum düz kas dokusunda her üç antikolinesterazın artan derişimlerindeki uygulamalarını takiben betanekol doz-yanıt eğrilerinden elde edilen Emaks değerlerinin kontrol Emaks değerlerine göre değişimi görülmektedir.



Şekil 5. Artan derişimlerde uygulanan farklı antikolinesterazların betanekol kontrol yanıtlarının -log EC50 değerleri üzerine olan etkileri görülmektedir. Üç ayrı antikolinesterazın ileum striplerinde betanekol ile uyarılan kasılma yanıtlarının EC50 değerleri üzerine olan etkileri arasındaki farklılık açısından yapılan one-way varyans analizine göre aradaki fark istatistiksel yönden anlamlı bulunmuştur (p ≤ 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 (1). Memeli türlerinin gastrointestinal kanalının intrinsek ve ekstrinsek inervasyonunda görev almak suretiyle yanıtlara yol açan çok sayıda nörotransmitter madde tanımlanmıştır. Bu maddelerin bir çoğu halen olası nörotransmitter olarak görülürken, bunlardan asetilkolinin kesin olarak bir nörotransmitter vazifesi gördüğü konusunda görüş birliğine varılmıştır.

ACh, sinaptik aralıktaki konsantrasyonunu arttırmak üzere sinir ucunun depolarizasyonu ile salıverilir ve asetilkolinesteraz (AChE) enziminin çabucak parçalanmadan ve sinaptik aralıktaki konsantrasyonu bazal düzeyine inmeden önce kolinerjik reseptörlerle etkileşime girerek postsinaptik membranı depolarize eder (6).

Antikolinesteraz ilaçlar, AChE enzimini inhibe etmek suretiyle periferde nöromuskuler kavşak ve otonomik gangliyonlardaki sinapslar dahil bütün kolinerjik kavşaklarda ACh birikmesine neden olarak postsinaptik membranda ki, muskarinik ya da nikotinik, kolinerjik reseptörleri ACh aracılığıyla indirekt bir şekilde aktive ederler (7).

Buna göre antikolinesterazlar gibi kolinerjik agonistler in vitro olarak sıçan ileumunda kasılma yanıtına yol açabilirler (8). Nitekim anestezize edilmemiş sıçana bir AChE inhibitörü olan neostigminin uygulanması sonrasında görülen kolinerjik transmisyonadaki güçlenme, doğrudan ince barsaklara verilmiş, emilime uğramayan radyoaktif bir maddenin barsaklardaki ilerleyişini hızlandırmıştır. Bu etki başlıca muskarinik kolinerjik reseptörlerde ki iletimin güçlenmesine bağlıdır. Görülen bu etki atropinle önlenemezken, bir nikotinik reseptör antagonisti olan hekzametonyumdan etkilenmemiştir. İntestinal transit zamanı üzerinde hekzametonyum uygulamasının etkisiz kalması, buna karşılık atropinizasyonun tek başına anlamlı bir düşüş oluşturması, sıçandaki intestinal hareketlerde kolinerjik muskarinik aktivitenin en önemli aracı olduğunu düşündürmektedir (8).

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

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, neostigminin 10 μM 'a kadar olan konsantrasyonlarında, kobay sağ atriumunda spontan kalp ritmini doza bağımlı olarak yavaşlattığı, 1000 μM 'lık yüksek konsantrasyonlarında ise ritmi ilaç öncesi

kontrol düzeylerine yükselttiği, buna karşılık edrofonyumun 3 μM 'lık konsantrasyonunda spontan kalp ritminde bir değişiklik oluşturmadığı saptanmıştır. Edrofonyum 50 μM gibi daha yüksek bir konsantrasyonunda, atım sayısını düşürmediği gibi anlamlı olmasa da hafifçe arttırmıştır. Bu verilere göre, neostigminin edrofonyumdan farklı olarak, düşük konsantrasyonlarında postsinaptik kardiyak muskarinik ACh reseptörlerini doğrudan uyardığı, buna karşılık gerek neostigminin 1000 μM 'lık, gerekse edrofonyumun 50 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında bu reseptörleri inhibe ederek antimuskarinik etkiler oluşturdukları ifade edilmiştir (9).

Benzer sonuçlar, sıçan trakeal striplerinde antikolinesteraz ilaçların dual etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada da görülmüştür. Tsuda ve ark.(3)'ün çalışmasında neostigmin ile piridostigmin, edrofonyumdan farklı olarak trakeal halkalardan hazırlanan striplerde kasılma ve fosfoinozotid (PI) yanıtları üzerinde dual etkiler oluşturmuştur. Trakeal halkaların istirahat gerimi, neostigminin 10 μM , piridostigminin de 100 μM ve altındaki konsantrasyonlarında artış gösterirken edrofonyumdan etkilenmemiştir. Takiben neostigmin ve piridostigminin dozlarının artırılmasına bağlı olarak düşük konsantrasyonlarında uyarılan kasılma yanıtları düşüş eğilimine girmiştir. Karbakol ile uyarılan trakeal kasılmalar, neostigmin, piridostigmin ve edrofonyumun 1000 μM 'lık derişimlerinde belirgin şekilde zayıflamıştır. Neostigmin ve piridostigminin 1000 μM 'lık, edrofonyumun da 100 μM ve üzerindeki derişimlerinde, karbakole bağlı gelişen inozitol trifosfat (IP3) birikiminde gözlenen düşme, kasılma yanıtlarındaki zayıflamaya eşlik etmiştir. Araştırmacılar antikolinesterazların, trakeal dokulardaki kasılma ve PI yanıtları üzerindeki doza bağımlı etkilerine M_3 muskarinik reseptörlerinin aracılık ettiğini ileri sürmüşlerdir.

Yine edrofonyum için Deschamps ve ark.(4)'ün çalışmasında gözlenen bifazik etki kalıbı, sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada piridostigmin, neostigmin ve ambenonyum için de gösterilmiştir (6). Sıçanlara İV yolla düşük



dozlarda verilen edrofonyum, piridostigmin, neostigmin ve ambenonyum başlangıçta siyatik sinir stimülasyonu ile uyarılan triceps kası tonüsünü yükseltmiştir. Takiben ambenonyum ve neostigmin için 0,1 μ M, piridostigmin ve edrofonyum için de 1 μ M'dan daha yüksek konsantrasyonlarda maksimum kasılma şiddetinde düşüş gözlenmiştir.

Deney hayvanları üzerindeki çalışmalar göstermektedir ki, antikolinesteraz etkinlik, kolinesteraz inhibitörü ilaçların düşük dozlarında gelişmekte, kolinerjik reseptörlerin blokajına bağlı otonomik kolinerjik iletideki zayıflama ise ilacın yüksek dozlarında görülmektedir (4).

Çalışmamızda kullandığımız ileum düz kas preparatlarında her üç antikolinesterazın 1 μ M'lık derişimi, betanekol ile uyarılan kasılma yanıtları üzerinde herhangi bir değişiklik oluşturmazken, neostigminin takiben uygulanan 10 μ M, 100 μ M ve 1000 μ M'lık derişimleri kasılma yanıtlarının $-\log EC_{50}$ değerlerinde anlamlı bir artışa, E maks değerlerinde ise belirgin bir düşüşe yol açmıştır. Bu doza bağımlı etki, piridostigmin 100 μ M ve 1000 μ M'lık derişimleri için de gözlenmiştir. Edrofonyumun ilk üç derişimi olan 1 μ M, 10 μ M ve 100 μ M için betanekol kasılma yanıtlarının $-\log EC_{50}$ ve E maks değerlerinde bir değişiklik oluşmazken, edrofonyumun 1000 μ M'lık derişiminde, ileum düz kas preparatlarında betanekol ile uyarılan kasılma yanıtlarının $-\log EC_{50}$ değerleri anlamlı bir şekilde yükselmiş, E maks değerleri ise belirgin biçimde düşüş göstermiştir.

Bu durumda kullanılan antikolinesterazların ileum striplerinde dual etkiler oluşturduğundan sözetmek mümkün değildir. Ancak ileum düz kas preparatlarında neostigmin, edrofonyum ve piridostigmin yüksek dozlarında belirgin bir antimuskarinik etki oluşturmuşlardır. Bu yönüyle sonuçlarımız, benzeri çalışmalardan elde edilen sonuçlarla uyum içerisindedir (3, 4, 9).

İntestinal sistem düz kaslarındaki muskarinik reseptörler hem kasılma hem de gevşeme yanıtlarına aracılık edebilirler. M_1 reseptör aktivasyonu sıçan duodenum ve jejunumunda, kolinerjik gevşeme yanıtlarının gelişimiyle ve NO salınımıyla ilişkilidir (10).

Buna göre M_1 reseptörleri, gevşeme yanıtlarıyla ilişkili başlıca muskarinik reseptör alt-tipi olarak gözükmetedir (11). Ancak ileum düz kaslarında gözlenen gevşeme yanıtlarında M_1 reseptörlerinin yanında diğer muskarinik reseptörler de görev alabilir. Örneğin, intestinal düz kasların muskarinik agonistlere kısa süreli maruziyeti halinde, başlangıçta uyarılan kasılma yanıtlarında desensitizasyona bağlı olarak bir zayıflama gelişebilir. Muskarinik agonistlerin oluşturduğu kasılma yanıtlarına karşı gelişen desensitizasyon etkisi, M_2 ya da M_1 selektif antagonistlerle değil de bir M_3 selektif antagonist olan P-florohexzahidrosiladifenidol ile dokuların muamele edilmesi sonucunda önlenebilir (12).

O halde intestinal sistemdeki düz kas kasılmalarından başlıca M_3 reseptörlerinin aktivasyonu sorumludur. M_3 reseptörsüz farelerin mide fundusları kullanılarak yapılan çalışmalar, karbakolün 1 μ M'ın üzerindeki konsantrasyonlarıyla belirgin gevşeme yanıtlarının gelişebileceğini göstermiştir.

Nitekim Eglen ve ark. (13), kobay ileal longitudinal düz kasında oluşturulan kasılma yanıtlarındaki desensitizasyonun M_2 reseptörleri üzerinden gelişmediğini, asıl M_3 reseptörlerinin duyarsızlaşmasından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Bundan çıkarılacak sonuç şudur; M_3 reseptörlerinin aşırı derecede aktive olması ileum düz kas dokularında bir desensitizasyona yol açabilir.

Yapılan bazı çalışmalarda karbakol, M_4 reseptörsüz farelerden hazırlanan mesane, trakea ve mide fundusu gibi düz kas preparatlarında, M_4 reseptörleri yönünden sağlıklı farelerdekiyle hemen aynı büyüklükte kasılma yanıtlarına yol açmıştır. M_2 reseptörsüz farelerde ise karbakolün sayılan düz kas preparatlarında kasılma yanıtlarını oluşturabilmesi için dozunun, M_2 reseptörleri sağlıklı farelerdeki dozuna göre iki kat artırılması gerekmiştir. Buna göre muskarinik reseptörler aracılığıyla oluşan bradikardide ve düz kas kasılmalarında rol alması kuvvetle muhtemel olan M_2 reseptörlerinin, bu etkilere aracılık etmediği anlaşılan M_4 reseptörlerine göre, antikolinesterazlar için M_3 reseptörleriyle birlikte potansiyel bir hedef muskarinik reseptör tipi olması beklenebilir (14).



Buna karşın sıçan trakeal düz kaslarındaki kasılma yanıtlarında neostigminin yüksek dozlarına bağlı gelişen zayıflamanın, bir M₂ muskarinik reseptör antagonisti olan Metoktraminden etkilenmemesi nedeniyle sıçan trakeasında karbakolle ya da antikolinesterazların yüksek dozlarıyla oluşan kasılma yanıtlarındaki zayıflamanın, ACh salınımının inhibisyonuna bağlı olmadığı dolayısıyla da presinaptik otoreseptör fonksiyonuna sahip M₂ reseptörleri üzerinden gelişmediği düşünülebilir (3, 12).

Bu verilere göre, antikolinesterazların yüksek konsantrasyonlarında intestinal düz kas dokularında görülen antimuskarinik etkilerden de M₁, M₂ ve M₄ reseptörlerinden ziyade M₃ muskarinik reseptörleri sorumlu tutulabilir.

Antikolinesterazlar için trakeal düz kas hücrelerinin muskarinik M₃ reseptörleri üzerinde iki bağlanma yeri bulunur (3, 9). 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. Tsuda ve ark.(3)'nın çalışmasında, trakeal kasılmalarda antikolinesterazların yüksek dozlarında oluşan gevşeme, dokuların yıkanmasından sonra ortadan kalktığı için, neostigmin, edrofonyum ve piridostigminin, yüksek dozlarında M₃ 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 yükselterek bir parasempatometik etkinlik oluşturmuş ancak bu etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak kolinesteraz inhibitörleri 1000 µM'lık derişimlerinde, bir antimuskarinik etkiye yol açmışlardır. Burada sayılan antikolinesterazlar 1000 µM'lık derişimlerdeki antimuskarinik

etkilerini muhtemelen sinaptik bölgedeki muskarinik reseptörler için endojen ACh ve non-selektif muskarinik reseptör agonisti olan betanekol ile yarışmaya girmek suretiyle oluşturmuştur (3, 15, 16).

Neostigmin, edrofonyum ve piridostigminin yüksek dozlarında görülen antimuskarinik etkilerinde, M₃ muskarinik reseptör blokajının yanısıra intestinal sistemdeki gangliyon hücrelerinde ve pleksuslarda bulunan nikotinik ACh reseptörlerine doğrudan bağlanarak desensitizasyon oluşturmalarının da bir katkısı olabilir (4, 16, 17). Zira Tsuda ve ark. (2001)'nin belirttiğine göre Yost ve Maestroni, neostigmin ve edrofonyumun doza bağlı olarak nikotinik ACh reseptörlerini inhibe edebileceklerini göstermişlerdir.

Bu veriler ışığında neostigmin, edrofonyum ve piridostigminin sıçan ileum düz kas striplerindeki kasılma yanıtları üzerinde dual etkili olmadıkları ve 1000 µM'lık yüksek derişimlerinde gözlenen antimuskarinik etkilerine olasılıkla M₃ muskarinik reseptörlerinde ve intestinal sistem parasempatik gangliyon hücrelerindeki nikotinik reseptörlerde parsiyel agonistik etkinlik ile desensitizasyon oluşturmalarının aracılık ettiği sonucuna varılmıştır.

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; 105 - 106, 161-163, 171.
2. Katzung BG. Basic & Clinical Pharmacology. Cholinoceptor-activating & Cholinesterase-inhibiting drugs. Seventh Edition, McGraw-Hill Medical Publishing Division; 1998; 93-96.
3. 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.
4. 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.



5. Pharmacological Experiments on Isolated Preparations. Experiments with Intestinal Smooth Muscle. By the staff of the Department of Pharmacology, University of Edinburgh, Preface by PERRY W. L. M., Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York; 1970; 58 – 62.

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

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

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

9. 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.

10. 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.

11. Olgart C, Iversen HH: Nitric oxide-dependent relaxation induced by M₁ muscarinic receptor activation in the rat small intestine. Br J Pharmacol 1999; 127: 309-313.

12. 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.

13. 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.

14. Stengel PW, Gomeza 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 all. Interaction of edrophonium with muscarinic acetylcholine M₂ and M₃ receptors. Anesthesiology 2001; 94: 804-814.

16. 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.

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

Yazışma Adresi

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

