

Kurbağa alt özofagus segmentinde kalsiyumsuz ortama kalsiyum ilavesi ile oluşan kasılmalar üzerine bazı iki değerli katyonların (Mn^{2+} , Cd^{2+}) etkileri

Yusuf KARATAŞ, Kansu BÜYÜKAFŞAR, Peyman UÇAR, Şerare ATÇI, Ergin ŞİNGİRİK,
Atilla DİKMEN, Serpil ÖNDER, Firuz BAYSAL

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

ÖZET

0.01 mM Na_2EDTA ve 20 mM KCl içeren kalsiyumsuz Ringer ortamına 1 mM $CaCl_2$ uygulamasının izole kurbağa alt özofagus segmentlerinde oluşturduğu kontraktür tarzındaki cevaplar üzerine bazı iki değerli katyonların etkisi incelendi. Kullanılan konsantrasyonlarda (0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 ve 1 mM) Mn^{2+} veya Cd^{2+} , kasılmaları doza bağımlı bir şekilde inhibe etti. $CaCl_2$ ile elde edilen kontraktürler üzerine Mn^{2+} ve Cd^{2+} 'un inhibitör etkileri karşılaştırıldığında, Cd^{2+} 'un daha güçlü olduğu saptandı.

Bu bulgulara göre KCl ile depolarize edilmiş Na_2EDTA içeren kalsiyumsuz ortamdaki kurbağa alt özofagus şeritlerinde dışarıdan kalsiyum ilavesi ile oluşan kasılmaların Cd^{2+} ve Mn^{2+} tarafından inhibe edilmesi, söz konusu kasılmaların depolarize ortamda kalsiyum influksuna bağlı olabileceğini telkin etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kurbağa özofagusu, kalsiyum, kadmiyum, mangan.

SUMMARY

Effects of some divalent cations (Mn^{2+} , Cd^{2+}) on the contraction of frog lower oesophageal circular strips induced by Ca^{2+} in Ca^{2+} - free EDTA containing medium.

Effects of Mn^{2+} and Cd^{2+} were investigated on the contracture induced by 1 mM $CaCl_2$ in the isolated frog lower oesophageal circular segments incubated in Ca^{2+} - free Ringer solution containing 20 mM KCl and 0.01 mM Na_2EDTA . Both Mn^{2+} and Cd^{2+} inhibited the contractures in a concentration dependent manner. Cd^{2+} was found to be more potent than Mn^{2+} on the Ca^{2+} induced contracture. These findings indicated that Cd^{2+} and Mn^{2+} can block Ca^{2+} entry from extracellular space to intracellular compartment.

Key Words: Frog oesophagus, calcium, cadmium, manganese.

GİRİŞ

Vasküler düz kasın vazoaaktif ajanlar tarafından kasılmasında sitoplazmik kalsiyum düzeyinde artışın

aracı olduğu bilinmektedir. Söz konusu artışın kaynağı ekstrasellüler kalsiyum veya hücre içi bir kalsiyum deposu olabilir (1,2). Ayrıca bir çok düz

Haberleşme Adresi: Doç. Dr. Ergin ŞİNGİRİK, Ç.Ü. Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, 01330-ADANA.

Geliş tarihi : 16.01.1997
Kabul tarihi : 23.01.1997

kasta kalsiyum influksının kasılmadan sorumlu olduğu ve ekstrasellüler kalsiyumun çıkarılması veya kalsiyum antagonistlerinin ilavesi ile kontraksiyonların hızlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (3). İnorganik kalsiyum antagonistlerinden olan Mn^{2+} , Cd^{2+} gibi polivalan katyonların kalp kasında (4) ve taenia coli, myometrium (5) gibi çeşitli düz kaslarda membrana bağlanarak ekstrasellüler ortamdan Ca^{2+} iyonlarının girişini önledikleri ve aksiyon potansiyelini bloke ettikleri belirlenmiştir. Karataş ve arkadaşları (6) tarafından kurbağa rektus abdominis kasında yapılan bir çalışmada ise kalsiyumsuz ortamda oluşan kontraktür tarzındaki cevap Mn^{2+} ve Cd^{2+} tarafından inhibe edilmiştir.

Daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda kurbağa üst özofagus sirküler şeritlerinde ouabain (7), potasyum (8) ve nitrik oksid'in (9,10) etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kurbağa alt özofagus sirküler şeritlerinin kalsiyumsuz ve yüksek KCl içeren ortamda dışardan ilave edilen kalsiyuma verdiği yanıtların Cd^{2+} ve Mn^{2+} ile etkileşmesi incelenmiştir.

MATERYAL ve METOD

Deneylerde ortalama ağırlıkları 15-25 g ağırlığında tatlı su kurbağaları kullanıldı. Deney hayvanının başı kesilip medulla spinalisi tahrip edildikten sonra alt özofagus segmenti dikkatli bir şekilde 2-3 mm kalınlığında olmak üzere halka şeklinde izole edildi. Daha sonra enine kesi yapmak sureti ile takriben 1.5-2 cm uzunluğunda bir şerit hazırlandı. Hazırlanan dairevi şeritler içerisinde 0.01 mM Na_2EDTA ve 20 mM KCl içeren kalsiyumsuz Ringer solüsyonu (mM olarak NaCl 94.62, KCl 20, $NaHCO_3$ 2.38, $NaH_2PO_4H_2O$ 0.08, glukoz 10.09) bulunan 40 ml'lik organ banyosuna 0.5 g tansiyon altında asıldı. Deneyler oda sıcaklığında (20-22°C) yapıldı. Dokunun yanıtları 8-10 büyütmeleli izotonik bir yazdırıcı ile isli kağıt üzerine kaydedildi. 1 saatlik dengeleme (ekilibriyum) periyodundan sonra bazal tonüs 5 dk kaydedildi. Bunu takiben banyo ortamına $CaCl_2$ (1 mM) uygulaması yapıldı. Dokunun $CaCl_2$ 'ye gösterdiği kasıcı cevap 5 dk süre ile

izlendi, daha sonra kimograf durdurularak banyo ortamı 0.01 mM Na_2EDTA ve 20 mM KCl içeren kalsiyumsuz Ringer solüsyonu ile yıkandı. Bu uygulama sırası izlenmek suretiyle her preparat için toplam 8 işlem yapıldı. Bu şekilde kontrol grupları teşkil edildi. Her uygulama arasında 30 dk beklendi.

Kontrol deneylerinden sonra mangan klorür ve kadmiyum klorürün etkileri araştırıldı. Bu amaçla 0.01 mM Na_2EDTA ve 20 mM KCl içeren ortamda kalsiyum klorüre verilen ilk dört cevap alındıktan sonra preparat değişik konsantrasyonlarda (0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 ve 1 mM) $MnCl_2$ veya $CdCl_2$ içeren 0.01 mM Na_2EDTA ve 20 mM KCl'li kalsiyumsuz Ringer solüsyonu içerisine alındı ve son 4 kalsiyum klorür uygulaması bu ortamda yapıldı. Her konsantrasyon için ayrı deney grupları oluşturuldu. Kontrol gruplarında her bir denemedeki en belirgin cevap 100 kabul edilerek diğerleri bunun yüzdesi şeklinde hesaplandı.

$CdCl_2$ ve $MnCl_2$ 'ün kullanıldığı deneylerde ilk dört $CaCl_2$ uygulaması ile elde edilen maksimum kasılmaların milimetrik ölçümlerinin ortalaması 100 kabul edilip daha sonra $CdCl_2$ ve $MnCl_2$ içeren ortamdaki her bir kalsiyum klorür uygulaması ile elde edilen maksimum cevap bunun %'si olarak ifade edildi. Elde edilen bütün bulgular ortalama ($\pm SE$) şeklinde değerlendirildi, karşılaştırmalar için "student t testi" kullanıldı. Deneylerde kullanılan $CaCl_2$, $MnCl_2$ MERCK, $CdCl_2$ ise SİGMA firmalarından temin edilmiştir.

BULGULAR

Kontrol Grubu: 0.01 mM Na_2EDTA içeren 20 mM KCl'li kalsiyumsuz ortama 1 mM $CaCl_2$ uygulaması yapıldığında izole kurbağa alt özofagus sirküler şeritlerinde anlamlı kontraktür artışı meydana geldi. Oluşan bu kasıcı cevapların özelliği tekrarlanabilir nitelikte olması ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması idi (Tablo 1, Şekil 1A).

Mangan klorür'ün Uygulandığı Gruplar: Şeritlerde 1 mM $CaCl_2$ ile ilk dört kasılma cevabı

Tablo 1. 0.01mM Na₂EDTA ve 20mM KCl içeren kalsiyumsuz Ringer ortamında izole kurbağa alt özofagus segmentleri üzerine 1mM CaCl₂ uygulamasının oluşturduğu kontraktür tarzındaki cevapların mm(\pm SE) ve % değişim değerleri

	1	2	3	4	1	2	3	4
mm \pm SE	17.8 \pm 2.5	16.9 \pm 2.5	17.5 \pm 2.9	15.4 \pm 2.6	16.8 \pm 3.0	15.8 \pm 2.4	16.4 \pm 3.3	15.5 \pm 2.6
%değişme	89.9 \pm 3*	85.6 \pm 3	86.2 \pm 3.1	78.2 \pm 4.6	83.5 \pm 4.0	80.1 \pm 3.3	79.6 \pm 5.2	77.3 \pm 3.8

* Her bir denemedeki en belirgin değer 100 kabul edilip diğerleri bunun yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

elde edildikten sonra ortam MnCl₂ içeren solüsyonla değiştirildiğinde yanıtlarda bir inhibisyon gözlemlendi. MnCl₂'ün neden olduğu inhibisyon doza bağımlı idi. 0.01 mM Mn²⁺ kasılmaları yaklaşık % 30 düzeyinde inhibe ederken 1 mN

Mn²⁺ yaklaşık % 98 oranında inhibisyon oluşturdu (Tablo 2, Şekil 1B).

Kadmiyum Klorür'ün Uygulandığı Gruplar: Benzer şekilde ilk dört CaCl₂ kasılması elde edildikten sonra ortam CdCl₂ içeren solüsyonla değiştirilmesi

Tablo 2. 0.01 mM Na₂EDTA ve 20 mM KCl içeren kalsiyumsuz Ringer ortamında izole kurbağa alt özofagus segmentlerinin 1mM CaCl₂'e verdiği ilk dört cevap alındıktan sonra, değişik konsantrasyonlarda MnCl₂ uygulaması ile elde edilen inhibitör cevapların kontrole göre % değerleri.

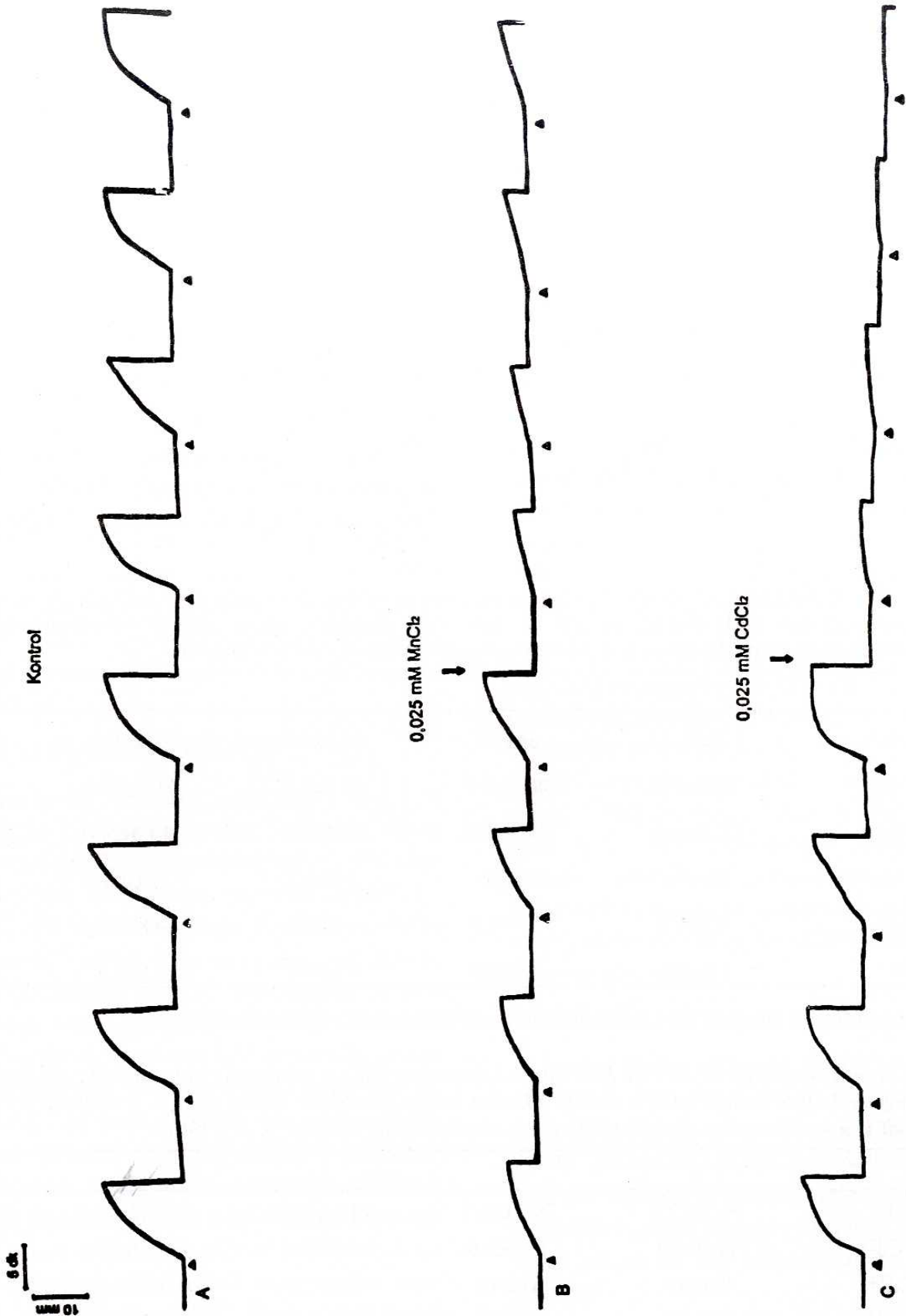
	1	2	3	4	n
0.01 mM Mn ²⁺	78 \pm 7.4	64 \pm 5.3	64.2 \pm 6.9	73.3 \pm 10.1	10
0.025 mM Mn ²⁺	49.7 \pm 7.9	40.4 \pm 8.4	44.7 \pm 7.9	61.9 \pm 12.9	9
0.05 mM Mn ²⁺	21.5 \pm 6.2	17.7 \pm 5.8	17.4 \pm 5.5	19.3 \pm 5.4	9
0.075 mM Mn ²⁺	9.4 \pm 3.7	8.4 \pm 3	7.9 \pm 2.7	6 \pm 2.6	9
0.1 mM Mn ²⁺	7.2 \pm 2.5	6.5 \pm 1.8	1.3 \pm 0.7	4.8 \pm 2.4	9
1 mM Mn ²⁺	1.8 \pm 1.8	0.9 \pm 0.9	0.9 \pm 0.9	1.8 \pm 1.8	9

Sütünlardaki gösterilen rakamlar ilk 4 değer ortalamasının %'desi olarak ifade edilmiştir.

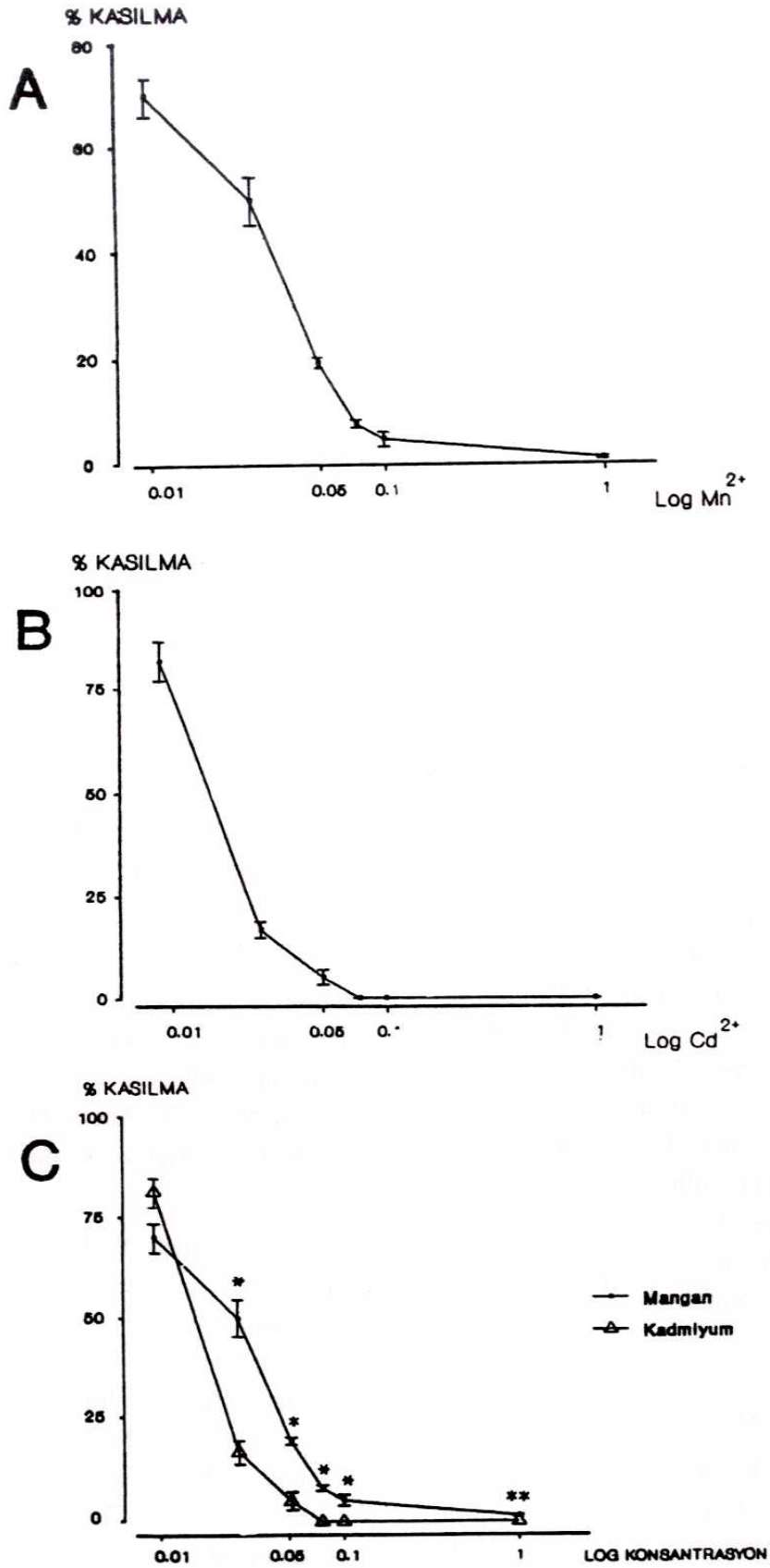
Tablo 3. 0.01 mM Na₂EDTA ve 20 mM KCl içeren kalsiyumsuz Ringer ortamında izole kurbağa alt özofagus segmentlerinin 1mM CaCl₂'e verdiği ilk dört cevap alındıktan sonra, değişik konsantrasyonlarda CdCl₂ uygulaması ile elde edilen inhibitör cevapların kontrole göre % değerleri.

	1	2	3	4	n
0.01 mM Cd ²⁺	96.3 \pm 17.4	79.5 \pm 13.1	74.2 \pm 12.6	76.7 \pm 13	6
0.025 mM Cd ²⁺	21.0 \pm 8.8	18.6 \pm 8.6	14.9 \pm 7.0	12.0 \pm 6.4	10
0.05 mM Cd ²⁺	9.4 \pm 6.3	6.6 \pm 4.6	2.2 \pm 1.5	1.8 \pm 1.4	9
0.075 mM Cd ²⁺	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	8
0.1 mM Cd ²⁺	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	9
1 mM Cd ²⁺	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	6

Sütünlardaki gösterilen rakamlar ilk 4 değer ortalamasının %'desi olarak ifade edilmiştir.



Şekil 1. 0.01 mM Na₂EDTA içeren 20 mM KCl'li kalsiyumsuz Ringer ortamında izole kurbağa alt özofagus segmentleri üzerine 1mM CaCl₂ uygulamasının oluşturduğu (A); aynı dokunun 1mM CaCl₂'e verdiği ilk dört cevap alındıktan 0.025 mM MnCl₂ (B); ve 0.025mM CdCl₂ (C); uygulamalarının trase örnekleri.



Şekil 2. 0.01 mM Na_2EDTA içeren 20 mM KCl 'lü kalsiyumsuz Ringer ortamında izole kurbağa alt özofagus segmentlerinin 1mM $CaCl_2$ verdiği ilk dört cevap alındıktan sonra değişik konsantrasyonlarda uygulanan $MnCl_2$ (A) ve $CdCl_2$ (B) doz-cevap eğrileri. Mangan ve Kadmiyum inhibitör etkilerinin birbirleri ile karşılaştırılması (C). (* $p < 0.01$, ** $p < 0.02$).

ile cevaplarda, kullanılan konsantrasyona bağımlı ve istatistiksel olarak anlamlı inhibisyonlar gözlemlendi (Tablo 3, Şekil 1C).

Ancak CaCl₂ ile elde edilen kasılmalarda kadmiyum ve manganın oluşturduğu inhibisyonlar birbirleri ile karşılaştırıldığında, kadmiyumun daha güçlü bir inhibitör olduğu görüldü (Tablo 2,3 ve Şekil 2). Özellikle bu fark düşük ilaç konsantrasyonundan sonra (0.025 mM) daha da belirginleşti ve kadmiyum 0.075 mM konsantrasyondan itibaren kasıcı cevapları tamamen inhibe etti (Tablo 3).

TARTIŞMA

20 mM KCl içeren kalsiyumsuz ortamda bulunan kurbağa alt özofagus şeritleri 1 mM Ca²⁺ ilavesi ile tekrarlanabilir nitelikte kasılmalar hasıl etmiştir. Kalsiyum içermeyen bir ortamda Ca²⁺ ilavesi ile kontraktürlerin oluşması, olayın ekstrasellüler ortamdan içeri kalsiyum iyonu girişine (influks) bağlı olabileceğini telkin etmektedir. Benzer şekilde insan umbilikal arterinde yapılan bir çalışmada KCl veya 5HT varlığında kalsiyum içermeyen ortamda bulunan şeritler Ca²⁺ ilavesi ile tekrarlanabilir kasılmalar oluşturmuş ve bu yanıtlar nifedipin ile inhibe edilmiştir (11). Tavşan mezenterik arterinde yapılan başka bir çalışmada kalsiyumsuz ortamda dışardan Ca²⁺ ilavesi noradrenalin kasılmalarında ilave kontraktil cevaba neden olmuş ve bu yanıt verapamil tarafından inhibe edilmiştir (12). Söz konusu çalışmalardan elde edilen bulgular ile kurbağa alt özofagus şeritlerinde elde etmiş olduğumuz bulguların birbirine paralel olması, özofageal şeritlerde Ca²⁺ influksu ve ardından oluşan kasılmaların diğer dokulardakine benzer mekanizmalara sahip olabileceğini ortaya koymaktadır.

Mn, Co, Ni, Cd ve La gibi iyonların membrana bağlandığı ve depolarize edici akımlar tarafından oluşturulan aksiyon potansiyelini bloke ettiği ve kalsiyum antagonistleri olarak bilindiği bir gerçektir(5).

Kurbağa alt özofagus şeritlerinde yapılan bu çalışmada Mn²⁺ ve Cd²⁺, kalsiyum ilavesi ile oluşan kontraktür tarzındaki cevapları doza bağımlı bir şekilde inhibe etmiştir. Kobay intestinal düz kasında yapılan bir çalışmada ise Cd²⁺ ve Mn²⁺'ın asetilkolin tarafından oluşturulan kontraktil cevabı inhibe ettiği gösterilmiştir (13). Kurbağa rektus abdominis kasında kalsiyumsuz ortamda oluşan kontraktür artışı da Mn²⁺ ve Cd²⁺ tarafından inhibe edilmiştir (6). Bütün bu bulgulara göre çalışmada dışarıdan ilave edilen kalsiyuma bağlı kasılmaların inhibisyonundan kalsiyum girişinin engellenmesinin sorumlu olabileceği gibi, Na⁺ girişinin de önlenerek aksiyon potansiyelinin oluşmasının baskılanması sözkonusu olabilir. Zira Frelin ve ark. (14) tarafından yapılan çalışmada yüksek konsantrasyondaki (2 mM) kadmiyumun TTX'e bağlı duyarlı ve duyarsız Na⁺ kanallarını bloke ettikleri gösterilmiştir. Çalışmada Ca²⁺ ilavesine bağlı kontraktürler üzerindeki inhibitör etkileri karşılaştırdığımızda kadmiyumun mangana göre güçlü olmasını kadmiyumun ilave olarak Na⁺ girişini önleyici etkisine bağlamak mümkün olabilir.

Ancak sıçan aortasında eksternal Mg²⁺'un çekilmesi sonucu oluşan kontraksiyonları inhibe etme açısından EC50 değerleri karşılaştırıldığında manganın kadmiyuma göre daha potent olduğu görülmüştür (15). Ancak bu farklı bulgular kullanılan deney hayvanı ve deneysel prosedüre bağlı olabilir.

Sonuç olarak KCl ile depolarize edilmiş, Na₂EDTA içeren kalsiyumsuz ortamdaki kurbağa alt özofagus şeritlerinin dışardan Ca²⁺ ilavesi ile düzenli kasılmalar oluşturması ve bu kontraktürleri kalsiyum inflaksını inhibe ettiği bilinen divalen katyonlarda Cd²⁺ ve Mn²⁺ tarafından inhibe edilmesi, söz konusu kasılmaların depolarize ortamda ekstrasellüler Ca²⁺ girişini bağımlı olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Brading AF, Sneddon P. Evidence of multiple sources of calcium for activation of the contractile mechanism of guinea pig taenia coli on stimulation with carbachol. *Br J Pharmacol* 1980; 70: 229-40.
2. Vanhoutte PM. Heterogeneity of postjunctional vascular α -adrenoceptor and handling of calcium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982; 4: 91-6.
3. Baba K, Kawanishi M, Satake T, Tomita T. Effects of verapamil on the contractions of guinea-pig tracheal muscle induced by Ca, Sr, and Ba. *Br J Pharmacol* 1985; 84: 203-11.
4. Romani A, Marfella C, Scarpa A. Regulation of magnesium uptake and release in the heart and isolated ventricular myocytes. *Circ Res* 1993; 72: 1139-48.
5. Tomita T. Electrical activity (spikes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscle. In: Edith B, Brading AF, Jones AW, Tomita T, eds. *Smooth Muscle: Butler and Tanner Ltd* 1981: 127-56.
6. Karataş Y, Dikmen A, Baysal F. Kalsiyumsuz ortamda oluşan kontraktür ve bazı iki değerli katyonlar. *S.Ü.T.F. Dergisi (Baskıda)*
7. Şingirik E, Demircioğlu Z, Dikmen A, Baysal F. Electrically induced relaxation of frog esophageal circular strips and ouabain. *Çukurova Üniv Tıp Fak Dergisi* 1987; 12: 321-4.
8. Aksu F, Önder S, Öğülener N, Erden F, Baysal F. The relaxant effect of potassium on frog oesophageal circular strips. *Çukurova Üniv Sağlık Bil Derg* 1991; 6: 45-51.
9. Karataş Y. Kurbağa izole özofagus sirküler düz kas preparatlarında potasyum gevşemeleri ve nitretrjik sistem. *Çukurova Üniv Sağlık Bil Doktora Tezi* 1995.
10. Büyükafşar K. İzole kurbağa üst özofagus sirküler şeritlerinde elektriksel uyarı ile oluşan gevşemelerde nitrik oksidin muhtemel katkısı. *Çukurova Üniv. Sağlık Bil. Yüksek Lisans Tezi* 1994.
11. Doğan N, Çiçek E, Cenik AG, Şingirik E, Kılıç M, Özcan AS. 5-Hydroxytryptamine-induced contraction of human isolated umbilical artery and its dependence on cellular and extracellular Ca. *Archiv intern Pharmac Ther* 1991; 312: 79-85.
12. Demirel E, Türker RK. Inhibition by Iloprost of the contractile effect of noradrenaline in mesenteric artery rings. Evidence for a possible calcium-dependent mechanism. *Prostaglandins Leukotriens and Essential Fatty Acids* 1991; 42: 185-89.
13. Hurwitz L, Debbas G, Little S. Effects of temperature and inorganic ions on calcium accumulation in microsomes from intestinal smooth muscle. *Mol Cell Biochem* 1975; 8: 31-41.
14. Frelin C, Cognard C, Vigne P, Lazdunski M. Tetrodotoxinsensitive and tetrodotoxin-resistant Na^{+} channels differ in their sensitivity to Cd^{2+} and Zn^{2+} . *Eur J Pharmacol* 1986; 122: 245-50.
15. Altura BM, Altura BT. Magnesium withdrawal and contraction of arterial smooth muscle: effects of EDTA, EGTA and divalent cations. *Proc Soc Exp Biol Med* 1976; 151: 752-5.