

İzole tavşan mesane detrusor düz kasında hipotermi ile karbakol cevaplarının arttırılması ve bunun Ca^{2+} , K^+ ve Na^+ kanalları ile ilişkisi

Kismet Esra ATALIK, Ayşe Saide ŞAHİN, Mehmet KILIÇ, Necdet DOĞAN

S.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı, KONYA

ÖZET

İzole tavşan mesane detrusor düz kasında yapılan bu çalışmada, 10^{-6} M konsantrasyonda uygulanan karbakol ile oluşturulan kasılma cevaplarına hipotermi etkisini, bu etkiden sorumlu olan kalsiyum (Ca^{2+}) kaynağını ve yine bu etkide potasyum (K^+) ve sodyum (Na^+) kanal blokörlerinin rolünü araştırmak amaçlanmıştır. 10^{-6} M konsantrasyonda uygulanan karbakol ile oluşan kasılmalar, banyo ısısının $37^{\circ}C$ 'den $28^{\circ}C$ 'ye düşürülmesiyle anlamlı olarak artmıştır. 10^{-6} M verapamil ilavesinde, bu kasılmaların inhibe edilmediği ve 3×10^{-4} M kafein varlığında ise hipotermiye bağlı kasılma cevabının arttığı gözlenmiştir. Ca^{2+} ile aktive edilen K^+ kanallarının blokörü tetraetilamonyum (TEA, 10^{-4} M) varlığında hipotermiye bağlı cevap artışı değişmezken, Na^+ kanal blokörü pilsikainid (10^{-7} M) varlığında hipotermiye bağlı cevap artışı anlamlı olarak azalmıştır. Ca^{2+} 'suz ortamda ise karbakol ile elde edilen kasılma kontrole göre belirgin olarak azalmıştır. Ancak hipotermi, kasılma cevaplarında belirgin artışa neden olmuştur. Sonuç olarak izole tavşan mesanesi detrusor düz kasında yapılan bu çalışmada, karbakol ile oluşturulan kasılma cevaplarının hipotermi ile artışında hücre içi kalsiyum depolarının ve membranda bulunan Na^+ kanallarının rollerinin önemli olduğu, bunun yanısıra Ca^{2+} 'a bağımlı K^+ kanallarının rolünün olmadığı belirtilebilir.

Anahtar Kelimeler: Tavşan mesane detrusor düz kası, karbakol, hipotermi.

SUMMARY

The effect of hypothermia on carbachol-induced contractions of the rabbit isolated detrusor smooth muscle and the role of calcium, potassium and sodium channels in this action

In this study, the effect of hypothermia on the carbachol-induced contractions and the role of calcium, potassium and sodium channels in this effect were investigated in the rabbit isolated detrusor smooth muscle of urinary bladder. The contractions induced by 10^{-6} M carbachol were enhanced by cooling of medium from 37 to $28^{\circ}C$. The hypothermia-induced contractions were not inhibited by 10^{-6} M verapamil and tetraethylammonium (TEA, 10^{-4} M) the blocker of Ca^{2+} -activated K^+ channels but were enhanced in the presence of 3×10^{-4} M caffeine and reduced by the sodium-channel blocker pilsicainid (10^{-7} M) significantly. When these procedures were repeated in the Ca^{2+} -free solutions, the carbachol-induced contractions were smaller than that of obtained in normal medium and these responses were enhanced by cooling. These results suggest that, intracellular Ca^{2+} pools and membranal Na^+ channels but not Ca^{2+} -activated K^+ channels may play a functional role in the cooling-induced contractions of rabbit detrusor smooth muscle.

Key Words: Rabbit urinary bladder detrusor smooth muscle, carbachol, hypothermia.

Karbakol ve asetilkolin gibi ekzojen olarak uygulanan muskarinik ajanlar, izole mesane detrusor düz kasında M_3 -tipi muskarinik reseptörler aracılığı ile fazik ve tonik komponentten oluşan iki fazlı kasılma meydana getirirler (1,2).

Düz kaslı yapılarda çeşitli agonistlerin oluşturdukları kasılma cevapları hipotermi ile artırılabilir (3). Hamster trakea düz kasında yapılan bir çalışmada ekzojen substans P ve karbakol ile oluşturulan kasılmaların, banyo ısısının $37^{\circ}C$ 'den

Haberleşme Adresi : Yrd.Doç.Dr. Kismet Esra ATALIK, S.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı, KONYA

20°C'ye düşürülmesiyle anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (4).

Bilindiği gibi düz kasda uyarı-kasılma kenetinde rol oynayan en önemli endojen madde, kalsiyum (Ca^{2+}) iyonudur. Mesane düz kasındaki muskarinik reseptörlerin karbakol ile aktive edilmesi, fosfoinozotidaz enzimini aktive ederek membran fosfolipidlerinde fosfatidilinozitol 4,5 bifosfat (PIP_2)'nin hidrolizine neden olur; bu olay sonucu iki ikinci ulak oluşur. Bunlar inozitol 1,4,5-trifosfat (IP_3) ve diasilgliserol (DAG)'dir; ilki endoplazmik retikulumdaki Ca^{2+} deposundan bu iyonu sitoplazmaya salıverir, DAG ise protein kinaz C'yi aktive eder. Ca^{2+} , kalmodulin'i aktive ederek onun aracılığı ile kalmodulin kinazı stimüle eder. Karbakol'e bağlı kasılmanın fazik komponenti kalmodulin'e bağımlı myozin hafif zincir kinazın aktivasyonu ve myozin hafif zincirlerin fosforilasyonu sonucu meydana gelirken, tonik komponenti ise kısmen protein kinaz C'nin aktivasyonuna kısmen de hücre membranının depolarizasyonuna bağlıdır (5).

Düz kaslı preparatlarda Ca^{2+} kanal blokörlerinin inhibitör etkileri kullanılan agoniste ve dokuya göre değişmektedir. Bu ilaçlardan biri olan verapamil'in çeşitli dokularda ekstraselüler Ca^{2+} 'un hücre içine girişini güçlü bir şekilde bloke ettiği bilinmektedir (6).

Düz kaslı yapılarda farklı tiplerde potasyum (K^+) kanalları tanımlanmış olup tetraetilamonyum (TEA), Ca^{2+} ile aktive edilen potasyum kanallarını bloke etmektedir (7,8). İzole tavşan portal veninde yapılan bir çalışmada, TEA'un düşük konsantrasyonunun ($<3mM$) Ca^{2+} 'la aktive edilen K^+ akımlarını selektif bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (9).

Sodyum (Na^+) kanal blokörlerinin düz kaslı yapılarda ekzojen muskarinik agonistlerle oluşan kasılma cevaplarını postsinaptik düzeyde etkiledikleri bilinmektedir (10).

Yapılan bu in vitro çalışmada, tavşan mesanesinin detrusor düz kasında karbakol'e bağlı kasılmaya hipotermiminin etkisi ve bu etkiden sorumlu olan Ca^{2+} kaynağının belirlenmesi ayrıca yine bu etkide K^+ ve Na^+ kanal blokörlerinin rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Her iki sekse ait Yeni Zelanda türü erişkin tavşanlar (2-2.5 kg) başlarına vurularak sersemletilip, a. carotisleri kesilmek suretiyle öldürüldü. Karın açılarak mesane çıkarıldı ve aşağıda bileşimi verilen besleyici solüsyona alındı. Detrusor kasından yaklaşık 10 mm boyunda ve 2-3 mm eninde transvers şeritler hazırlandı. Dokular 37°C' de Krebs-Henseleit solüsyonu içeren ve %95 O_2 - %5 CO_2 gaz karışımı ile gazlandırılan, 25 ml hacminde organ banyosu içine alındı ve 1 g gerilim uygulanarak 60 dakika süreyle dinlendirildi. Bu süre içinde dokular, her 15 dakikada bir normal solüsyonla yıkandı. İlaçlara verilen cevaplar izotonik levye aracılığı ile 10 kez büyütülerek isli kağıda kaydedildi. Deneylerde kullanılan Krebs-Henseleit solüsyonunun içeriği (mM) olarak şöyledir: NaCl 119; KCl 4.7; $MgSO_4$ 1.5; KH_2PO_4 1.2; $CaCl_2$ 2.5; $NaHCO_3$ 25; glukoz 11.

Deneyisel uygulama : Dinlenme süresinin bitiminde, banyo ortamına 10^{-6} M konsantrasyonda karbakol ilave edildi. Meydana gelen kasılma stabil hale geldiğinde banyo ısısı hızla 28°C' ye düşürüldü. Aynı işlem hipotermiden önce ortama sırasıyla verapamil (10^{-6} M), kafein (3×10^{-4} M), TEA (10^{-4} M) ve pilsikainid (10^{-7} M) ilave edilip 20 dakika süreyle inkübe edilerek tekrarlandı.

Çalışmanın bir diğer bölümünde, hipotermiye bağlı cevaplarda Ca^{2+} 'un rolünü araştırmak amacıyla, dinlenme süresinin sonunda dokular 10^{-6} M karbakol ilavesiyle normal solüsyonlu ortamda kasılıp kontrol cevapları alındı. Daha sonra aynı dokular banyo ortamı 0.1 mM konsantrasyonda EGTA (etilenglikol bis (β aminoetileter)-N-N'-tetraasetik asid) içeren Ca^{2+} 'suz Krebs solüsyonu ile değiştirilerek, 1 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyonun bitiminde 10^{-6} M karbakol'e ve hipotermiye verilen cevaplar araştırıldı. Her preparatta kontrolü takiben kullanılan ajanlardan sadece biri denendi.

İstatistik : Normal Krebsli ortamda elde edilen 10^{-6} M karbakol kasılma cevapları 100 kabul edilerek hipotermiye bağlı cevap artışları ile kanal blokörleri varlığında ve Ca^{2+} 'suz ortamda elde edilen hipotermi cevapları bunun %' si olarak değerlendirildi.

Bulgular, ortalama \pm standart hata şeklinde gösterilip, ortalamalar arasındaki farkın önem kontrolü Student' in-t

testi ile belirlendi (11). P değerlerinin 0.05' den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

İlaçlar : Deneylerde karbakol klorür (Sigma), verapamil (Sigma), kafein (Sigma), TEA (tetraetilamonyum klorür, Sigma) ve pilsikainid (Suntory Co.Ltd.) kullanıldı. Kullanılan ilaçların stok solüsyonları ile alt dilüsyonları distile suda hazırlandı.

BULGULAR

Tavşan izole detrusor düz kasında 10^{-6} M konsantrasyonda uygulanan karbakol, tekrarlanabilir nitelikte kasılmalar (0.41 ± 0.03 g) oluşturdu. Banyo ısısının $37^\circ C$ 'den $28^\circ C$ 'ye düşürülmesiyle karbakol'e bağlı kasılma cevaplarında anlamlı artışlar meydana geldi ($\% 72.28 \pm 0.31$) ($p < 0.05$). Verapamil, TEA ve pilsikainid bazal gerilime etkisiz bulunurken kafein $28^\circ C$ ' de bazal gerilimde, karbakol cevabının $\% 30$ 'u kadar artışa neden olmuştur. Şekil 1'de ortama ilave edilen 10^{-6} M verapamil, 3×10^{-4} M kafein, 10^{-4} M TEA ve 10^{-7} M pilsikainid varlığında elde edilen hipotermiye bağlı $\%$ kasılmalar gösterilmiştir.

Ca^{2+} 'suz ortamda yapılan çalışmalarda, karbakol'e bağlı kasılma, Ca^{2+} 'lu ortamdakine göre $\%63.3 \pm 10.5$ oranında azalmıştır ($p < 0.05$). Ca^{2+} 'suz ortamda elde edilen bu kasılmalar hipotermi ile anlamlı olarak artırılmıştır ($\%128.8 \pm 9.4$).

TARTIŞMA

Tavşan mesanesi detrusor düz kasında yapılan bu çalışmada, karbakol tekrarlanabilir nitelikte kasılmalara neden olmuştur. Detrusor düz kasında karbakol'e bağlı kasılmadan sorumlu olan reseptör tipinin M_3 -tipi muskarinik reseptörler olduğu bilinmektedir (12). Karbakol'e bağlı kasılma cevapları hipotermi ile anlamlı bir şekilde artırılmış olup bu artan cevaba Ca^{2+} iyonunun aracılık ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir (13,14). Sunulan bu çalışmada ekstraselüler Ca^{2+} girişini inhibe ettiği bilinen ve bir Ca^{2+} kanal blokörü olan verapamil (15,16), hipotermiye bağlı cevap artışlarını anlamlı olarak inhibe edememiştir. Verapamil'in hipotermi ile oluşturulan cevap artışlarını inhibe etmemesi, hipotermiye bağlı kasılmalarda intraselüler Ca^{2+} 'un kullanıldığını ortaya koymaktadır. Literatürde de bu bulguyu destekleyen çalışmalar vardır (13,16).

EGTA içeren Ca^{2+} 'suz ortamda karbakol ile meydana gelen kasılma, intraselüler depolardan Ca^{2+} 'un

saliverilmesi aracılığı ile olmaktadır. Sunulan bu çalışmanın, ekstraselüler Ca^{2+} içermediği kabul edilen ortamda yapılan bölümünde, karbakol normal Ca^{2+} 'lu ortamdakine göre daha zayıf kasılma oluşturmuş ve bu kasılma hipotermi ile yine anlamlı olarak artırılmıştır. Bu bulgu yukarıda da belirtildiği gibi hipotermiye verilen cevap artışında rol oynayan fonksiyonel Ca^{2+} 'un intraselüler kaynaklı olduğu görüşünü desteklemektedir. Nitekim intraselüler Ca^{2+} saliverilmesine neden olduğu bilinen kafein (17), $37^\circ C$ 'de etkisiz bulunurken $28^\circ C$ 'de anlamlı kasılmaya neden olmuştur. Ayrıca kafein varlığında hipotermiye verilen kasılma cevabı da anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Benzer şekilde hamster trakea düz kasında karbakol'e verilen kasılma cevabının hipotermi ile artışının intraselüler depolardan Ca^{2+} saliverilmesi aracılığı ile gerçekleştiğinin gösterildiği bir çalışmada, kafeinin $37^\circ C$ 'de bazal tonusa etkisiz veya çok az etkili bulunduğu, $20^\circ C$ 'de ise karbakol cevabının $\%30$ 'u kadar artışa neden olduğu bildirilmiştir (4).

Damar dışı düz kaslı yapılarda muskarinik reseptör stimülasyonunun çeşitli mekanizmalarla depolarizasyona neden olduğu bilinmektedir (18). Nitekim Fujii ve arkadaşları (19), ATP'ye duyarlı K^+ kanal blokörü glibenklamid' in mesane düz kası strip-lerinde depolarizasyona neden olarak kasılma cevaplarını artırdığını göstermişlerdir ki bu da mesanenin fonksiyonunda ATP'ye duyarlı K^+ kanallarının önemini vurgulamaktadır. Sunulan bu çalışmada, Ca^{2+} ile aktive edilen K^+ kanallarının hipotermi cevaplarına rolünü araştırmak amacıyla TEA kullanılmış olup, TEA varlığında hipotermiye bağlı cevap artışı kontrolden farksız bulunmuştur. Benzer şekilde Boyle ve arkadaşları da (20) kobay trakeasında TEA'un histamin ve asetilkolin'e verilen kasılma cevaplarını etkilemediğini bildirmişlerdir.

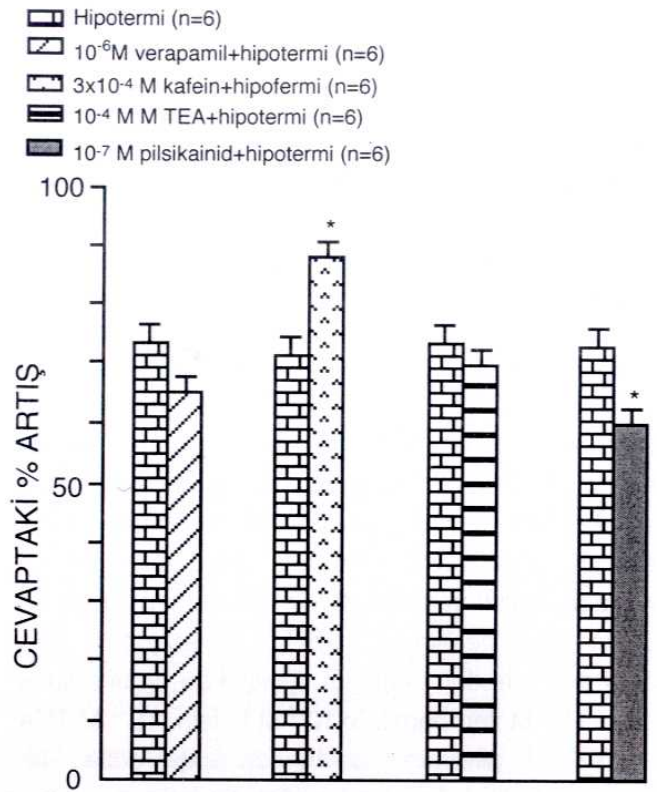
Düz kaslı yapılarda ekstraselüler veya intraselüler Na^+ konsantrasyonundaki değişmelerin sitoplazmik serbest Ca^{2+} düzeyini etkilediği bilinmektedir. Nitekim Cortijo ve arkadaşları (21) kobay trakeasında besleyici solüsyonda Na^+ iyonu konsantrasyonunu azaltarak yaptıkları çalışmalarda, asetilkolin, histamin ve serotonin ile alınan kasılma cevaplarının kontrol cevaplara göre daha küçük olduğunu belirtmişlerdir. Pilsikainid, antiaritmik etki potansiyeline sahip bir maddedir. Inomata ve arkadaşları (22) söz konusu

ajanın izole ventriküler hücrelere Na⁺ iyonu girişini selektif olarak bloke ettiğini göstermişler ve pilsikainid'i spesifik bir Na⁺ kanal blokörü olarak tanımlamışlardır. Ayrıca hücre membranında depolarizasyondan sorumlu olan Na⁺ kanallarını bloke ettikleri bilinen lokal anesteziklerin membranda stabilizasyon yaparak asetilkolin ya da karbakol gibi ekzojen ajanlara karşı membranın eksitabilitesini azalttıkları da bilinmektedir. Benzer şekilde Nakashima ve arkadaşları da (23) kobay trakeasında pilsikainid'in karbakol ile elde edilen kasılma cevaplarını inhibe ettiğini göstermişlerdir. Sunulan bu çalışmayla ilgili ön denemelerde pilsikainid, 10⁻⁵ M ve 10⁻⁶ M konsantrasyonlarda hipotermiye bağlı kasılma cevaplarındaki artmanın tamamen ortadan kalkmasına neden olmuştur. 10⁻⁷ M Pilsikainid varlığında ise, hipotermiye bağlı kasılmalar anlamlı olarak azalmıştır (%32.6±6.89; p<0,05).

Sonuç olarak, tavşan izole detrusor düz kasında yapılan bu çalışmada, karbakol ile elde edilen kasılma cevaplarının hipotermi ile anlamlı olarak arttığı ve Ishii ve Shimo'nun da (4) belirttikleri gibi hipoterminin intraselüler depolardan Ca²⁺ salıverilmesini artırdığı saptanmış ayrıca hipotermiye bağlı cevaplarda Ca²⁺ ile aktive edilen K⁺ kanallarının rolü görülemezken, membranda bulunan Na⁺ kanallarının önemi ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

1. Tobin G, Sjogren C. In vivo and in vitro effects of muscarinic receptor antagonists on contractions and release of [³H] acetylcholine in the rabbit urinary bladder. Eur J Pharmacol 1995;28 (1):1-8.
2. Wang P, Luthin GR, Ruggieri MR. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes mediating urinary bladder contractility and coupling GTP binding proteins. J Pharmacol Exp Ther 1995;273 (2):959-66.
3. Vanhoutte PM. Physical factors and regulation of vascular smooth muscle function. Bohr DF, Somlyo AP, Sparks H. editors Handbook of Physiology The American Physiological Society 1980; 443-7.
4. Ishii T and Shimo Y. Cooling - induced augmentation of the contractile response of the golden hamster tracheal muscle to substance P in vitro J Pharm Pharmacol 1986;38:403-5.
5. Uchida W, Masuda N, Shirai Y, Shibasaki K, Satoh N, Takenaka T. The role of extracellular Ca²⁺ in carbachol - induced tonic contraction of the pig detrusor smooth muscle. Naunyn - Schmiedberg's Arch Pharmacol 1992;261:1204-9.
6. Bhat MB, Mishra SK, Raviprakash V. Differential susceptibility of cholinergic and noncholinergic neurogenic responses to calcium channel blockers and low Ca²⁺ medium in rat urinary bladder. Br J Pharmacol 1989 ;96:837-42.
7. Langton PD, Nelson MT, Huang Y, Standen NB. Block of calcium - activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions. Am J Physiol 1991; 260: 927- 34.
8. Ometo M, Kajimoto N, Mizusawa H. The ionic mechanism of phenylephrine - induced rhythmic contractions in rabbit mesenteric arteries treated with ryanodine. Acta Physiol Scand 1993;147:9-13.
9. Inoue R, Kitamura K, Kuriyama H. Two Ca²⁺ - dependent K⁺-channels classified by the application of tetraethylammonium distribute to smooth muscle membranes of the rabbit portal vein. Pflugers Archiv 1985;405:173-9.
10. Wali FA. Local anaesthetics inhibit cholinergic and noncholinergic neural and muscular contractions in avian tracheal smooth muscle. Acta Anaesthesiol Scand 1987;31:148-53.



Şekil 1. Ca²⁺'lu ortamda 10⁻⁶ M karbakol'e bağlı kasılmaların hipotermi ile artırılması ve verapamil (10⁻⁶ M), kafein (3x10⁻⁴ M), TEA (10⁻⁴ M) ve pilsikainid (10⁻⁷ M)'in etkileri (cevaptaki % artış değerleri 10⁻⁶ M karbakol kasılma cevabı 100 kabul edilerek hesaplanmıştır).

* P<0.05 Kontrole göre.

11. Goldstein A. Biostatistics and introductory text. New York: The Mc Millan Co, 1971.
12. Longhurst PA, Leggett RE, Briscoe JAK. Characterization of the functional muscarinic receptors in the rat urinary bladder 1995;116:2279-85.
13. Sunano S. The effects of Ca^{2+} antagonists, manganese and lanthanum on cooling-induced contraction of depolarized vas deferens. Japan J Pharmacol 1984;34:51-6.
14. Kurihara S, Kuriyama H, Magaribuchi T. Effects of rapid cooling on the smooth muscle of the electrical properties of the guinea-pig, urinary bladder. Pflugers Archivt 1974; 238: 413-26.
15. Cenk A, Çiçek E, Şahin AS, Doğan N. İzole köpek safen veninde hipotermi ile noradrenalin, fenilefrin ve serotonin cevaplarının artırılması ve bunun Ca^{2+} ile ilişkisi. S.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 1989;5(3):29-33.
16. Ishii T, Shimo Y. Cooling- induced supersensitivity to acetylcholine in the isolated airway smooth muscle of the rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1985; 329: 167-75.
17. Van Breemen C, Saida K. Cellular mechanisms regulating $[Ca^{2+}]_i$ smooth muscle. Annu Rev Physiol 1989;51:315-29.
18. Sims SM. Cholinergic activation of a non-selective cation current in canine gastric smooth muscle is associated with contraction. J Physiol 1992;449:377-98.
19. Fujii K, Foster CD, Brading AF, Parekh AB. Potassium channel blockers and the effects of cromakalim on the smooth muscle of the guinea-pig bladder. Br J Pharmacol 1990;99:779-85.
20. Boyle JP, Davies JM, Foster RW, Good DM, Kennedy I, Small RC. Spasmogen action in guinea-pig isolated trachealis: involvement of membrane K^+ channels and the consequences of K^+ -channel blockade. Br J Pharmacol 1988;93:319-30.
21. Cortijo J, Gonzales M, Ortiz JL, Morcillo EJ. Effects of Na^+ transport inhibitors on guinea-pig tracheal responses to spasmogens. Eur J Pharmacol 1992; 221:43-50.
22. Inomata N, Ishihara T, Akaike N. SUN 1165: A new antiarrhythmic Na^+ current blocker in ventricular myocytes of guinea-pig. Comp Biochem Physiol 1987;87:237-43.
23. Nakashima Y, Sugiyama S, Shindoh J, Taki F, Takagi K, Satake T, Ozawa T. Effects of sodium channel blockers on electrical field stimulation-induced guinea-pig tracheal smooth muscle contraction. Arch Int Pharmacodyn 1990;306:130-8.