

## ASETİLKOLİN İLE KASILAN İZOLE KOBAY VE TAVŞAN MİDE FUNDUSUNDA PİNAVERİUM'UN ETKİSİ VE BUNUN KALSİYUM İLE İLİŞKİSİ

Dr. Ekrem ÇİÇEK\*, Dr. H. İbrahim KARABACAK\*, Dr. Esra ATALIK\*

\*S. Ü. T. F. Farmakoloji ABD

### ÖZET

İzole kobay ve tavşan mide fundusunda yapılan bu *in vitro* çalışmada, kalsiyumsuz ortamda  $10^{-4}$  M asetilkolin (ACh) ile kasılan dokular üzerine kümülatif konsantrasyonda uygulanan kalsiyumla ( $10^{-4}$  -  $10^{-2}$  M) elde edilen cevaplara pinaveriumun etkisi araştırıldı.

0.77 mM  $\text{Na}_2$  EDTA içeren  $\text{Ca}^{+2}$  'suz ortamda  $10^{-4}$  M ACh ile elde edilen cevaplar, kümülatif konsantrasyonda  $\text{Ca}^{+2}$  ilavesiyle doza bağımlı bir şekilde anlamlı olarak arttı. Ortamda pinaverium ( $10^{-5}$  M) varlığında her iki dokuda da maksimum cevap anlamlı olarak azaldı. Kobay mide fundusunda pinaveriuma bağlı inhibisyonun tavşan mide fundusuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü ( $P<0.05$ ).

Elde edilen bulgular, pinaveriumun muhtemelen her iki dokuda da ekstraselüler  $\text{Ca}^{+2}$  girişini inhibe edebileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler :** Pinaverium bromid, mide fundusu, *in vitro*.

### SUMMARY

**The Effect of Pinaverium on Isolated Guinea-Pig and Rabbit Stomach Fundus Contracted With Acetylcholine and Its Relation With Calcium.**

In this *in vitro* study, by using  $\text{Ca}^{+2}$  -free medium, the effect of pinaverium on acetylcholine (ACh) responses induced by cumulative addition of  $\text{Ca}^{+2}$  ( $10^{-4}$  -  $10^{-2}$  M) was investigated in isolated guinea pig and rabbit stomach fundus.

The responses induced with  $10^{-4}$  M ACh,  $\text{Ca}^{+2}$  -free medium containing 0.77 mM  $\text{Na}_2$  EDTA, showed a dose-dependent and significant increase by addition of cumulative concentration of  $\text{Ca}^{+2}$ . In the presence of pinaverium ( $10^{-5}$  M), the maximum response decreased significantly in both preparations. It was showed that the inhibition induced by pinaverium was higher in guinea-pig stomach fundus than in rabbit stomach fundus ( $P<0.05$ ).

The results suggest that extracellular  $\text{Ca}^{+2}$  - influx can be inhibited by pinaverium in both preparations.

**Key Words :** Pinaverium bromide, stomach fundus, *in vitro*.

### GİRİŞ

Düz kas kasılmalarında rol oynayan ana katyon  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu olup, bu iyonun kaynakları ekstraselüler ve intraselüler  $\text{Ca}^{+2}$  şeklindedir (1). Bulbring ve Kuriyawa (2), muskarinik reseptör agonisti ACh'e bağlı kasılmalarda her iki  $\text{Ca}^{+2}$  kaynağının da kul-

lanıldığını belirtmişlerdir. Kobay detrusor düz kasında yapılan bir çalışmada,  $\text{Ca}^{+2}$  'suz ortamda muskarinik reseptör stimülasyonu sonucu meydana gelen kasılmanın intraselüler  $\text{Ca}^{+2}$  depolarından salınan  $\text{Ca}^{+2}$  aracılığıyla oluştuğu ve bu kasılmanın ortama ilave edilen  $\text{Ca}^{+2}$  ile artırıldığı gösterilmiştir (3).



Kalsiyum iyonunun ekstraselüler ortamdan hücre içine girişini sağlayan  $Ca^{+2}$  kanallarının iki şekli vardır. Bunlar, voltaja ve reseptöre bağımlı  $Ca^{+2}$  kanallarıdır (4). Düz kas membranında yoğun olarak voltaja bağımlı kanallar bulunur ve bunlar genellikle yavaş açılıp kapanan L-tipi kanallardır (5). Gastrointestinal sistemdeki kanallar belirtilen her iki tip kanalı da içerirler (6). Bu kanallar dihidropiridinler, verapamil ve diltiazem gibi  $Ca^{+2}$  antagonisti ilaçlarla bloke edilirler. Pinaverium,  $Ca^{+2}$  antagonistleri gibi voltaja bağımlı  $Ca^{+2}$  kanallarının selektif blokerüdür. Bunun yanında daha az olmak üzere reseptöre bağımlı kanalları da etkilemektedir (7).

Pinaverium, yapılan birçok çalışmada çeşitli agonistlerle meydana gelen kasılmalar üzerine gevşetici etki göstermektedir. Itoh ve Takahashi (8), pinaveriumun izole köpek mide, ince barsak ve kolondaki kasıcı aktiviteyi azalttığını, benzer bir çalışmada Grenier ve arkadaşları (9), köpek ince barsağındaki kasılmanın söz konusu ajanla inhibe edildiğini göstermişlerdir. Bir başka çalışmada ise,  $10^{-3}$  M baryum ve  $10^{-4}$  M ACh ile kasılan izole sıçan kolonunda pinaveriumun verapamile benzer bir şekilde kasılmayı inhibe ettiği belirtilmiştir (10).

İzole kobay ve tavşan mide fundusunda yapılan bu in vitro çalışmada  $Ca^{+2}$  'suz ortamda, ACh ile önceden kasılan dokuya ilave edilen  $Ca^{+2}$  'a bağlı cevaplar üzerine pinaveriumun inhibitör etkisi araştırıldı.

## MATERYAL VE METOD

Çalışmada Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edilen her iki sekse ait kobaylar (450-550 g) ve Yeni Zelanda türü beyaz tavşanlar (2-2.5 kg) kullanıldı. Hayvanlar başlarına vurulup, karotis arterleri kesilerek öldürüldü. Karınları açılarak mide dışarı çıkarılıp, içinde besleyici solüsyon bulunan petri kutusuna alındı. Fundal bölge mideden ayrılarak, mukozası sıyrılıp yaklaşık 10 mm boyunda ve 2-3 mm eninde stripler hazırlandı. Preparatlar, içinde Krebs-Henseleit solüsyonu bulunan 25 ml'lik organ banyosuna alındı. Dokulara 1 g'lık gerilim uygulandı ve % 95  $O_2$  + % 5  $CO_2$  ile gazlandırılıp, banyo ısı 37°C'ye ayarlandı. İlaçlara verilen cevaplar bir transduser (Haward) aracılığı ile izometrik olarak kaydedildi.

60 dakikalık dinlenme süresinin bitiminde, her iki hayvana ait dokular 0.77 mM  $Na_2$  EDTA içeren  $Ca^{+2}$  'suz solüsyona alındı. Her 15 dakikada bir yıkılarak 60 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu işlemlerden sonra dokular  $10^{-4}$  M ACh ile kasıldı. Ortama kümülatif konsantrasyonda  $Ca^{+2}$  ( $10^{-4}$ - $10^{-2}$  M) ilave edilerek oluşan cevaplar gözlemlendi. Daha sonra preparatlar normal solüsyonla yıkayıp tekrar  $Ca^{+2}$  'suz ortama alındı. Aynı agonistle kasıldıktan sonra ortama  $10^{-5}$  M pinaverium ilave edilerek 15 dakika süre ile inkübasyon yapıldı. Bu sürenin sonunda kümülatif konsantrasyonda  $Ca^{+2}$  uygulanarak pinaveriumun, bu kasılmaları inhibe etme gücü araştırıldı.

ACh ile kasılan dokularda, pinaveriumsuz ortamda kümülatif konsantrasyonda uygulanan  $Ca^{+2}$  'a verilen cevaplar maksimum cevap olarak kabul edildi. Pinaverium varlığında ise, kümülatif konsantrasyonda ilave edilen  $Ca^{+2}$  'a verilen cevaplar bunun yüzdesi olarak değerlendirildi. Elde edilen değerler ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde belirtilip, ortalamalar arasındaki farkın anlamlılık derecesi Student'in t-testi ile hesaplandı (11). P değerinin 0.05'den küçük olması halinde ortalamalar arasındaki fark anlamlı olarak kabul edildi.

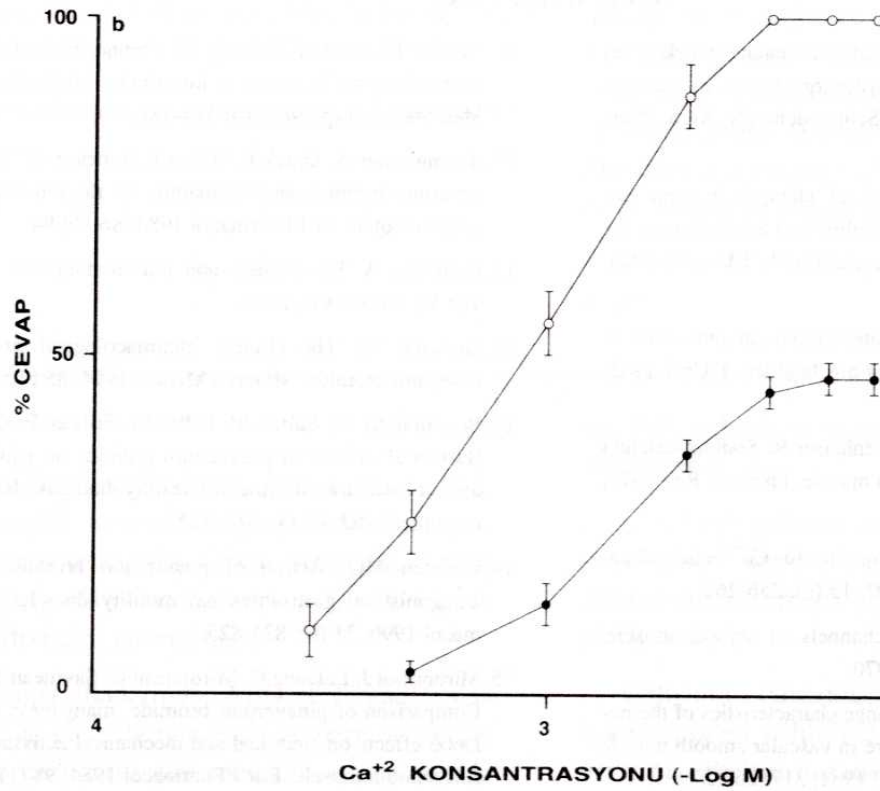
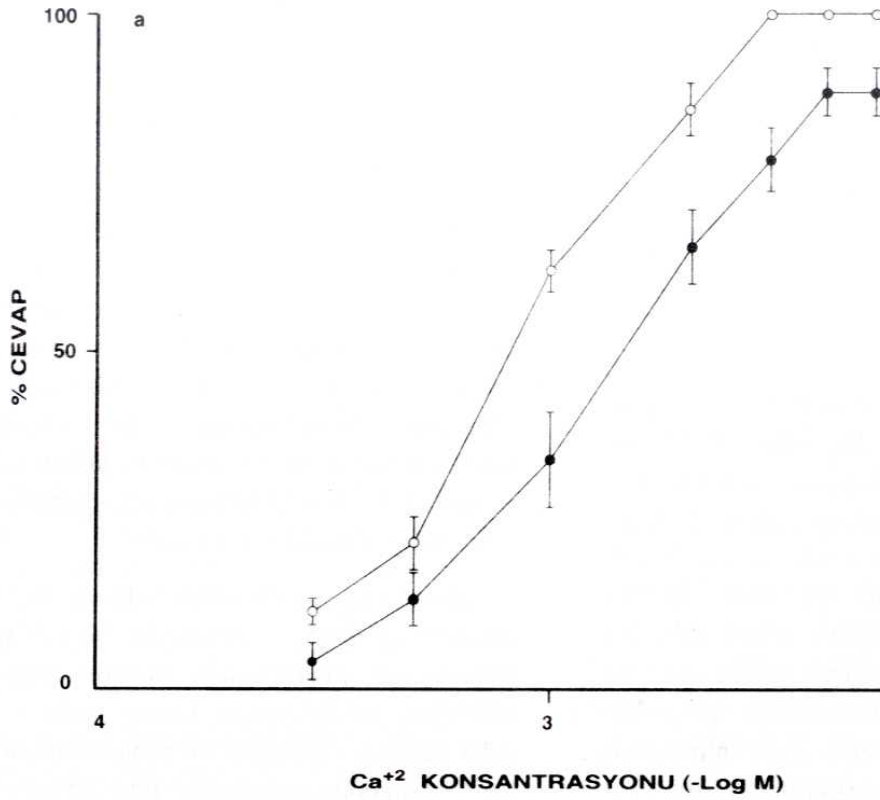
Krebs-Henseleit solüsyonunun bileşimi mM olarak şöyledir : NaCl 188, KCl 4.70,  $CaCl_2$  1.60,  $MgSO_4$  1.20,  $NaHCO_3$  24.90,  $KH_2PO_4$  1.20 ve glukoz 11.10.

Kullanılan ilaçlar : Asetilkolin HCl (Haver), Pinaverium bromid (Yeni İlaç ve Hammaddeleri Sanayi - İst.).

## BULGULAR

$Ca^{+2}$  'suz ortamda kobay ve tavşan mide fundus striplerinde ACh, tekrar edilebilir nitelikte kasılmalara neden oldu. Bu agonistin varlığında kümülatif konsantrasyonda uygulanan  $Ca^{+2}$ , konsantrasyona bağımlı bir şekilde kasılma oluşturdu.

Pinaveriumlu ortamda kümülatif konsantrasyonda uygulanan  $Ca^{+2}$  ile elde edilen maksimum cevap tavşan fundus striplerinde kontrol cevabın %  $89.32 \pm 4.00$ 'ü (Şekil 1a) ve kobay fundus striplerinde de %  $47.03 \pm 3.03$ 'ü (Şekil 1 b) oranında oluştu.



Şekil 1.  $Ca^{+2}$ 'suz ortamda ACh ile kasılan tavşan (a) ve kobay (b) mide fundusunda ortama ilave edilen  $Ca^{+2}$ 'a bağlı maksimum cevaplara (o-o) pinaveriumun (•-•) etkisi.



Bu iki değer birbirlerinden anlamlı olarak farklı olup ( $P<0.05$ ), pinaveriumun kobay fundusunda daha potent olduğu görüldü.

## TARTIŞMA

Sunulan bu in vitro çalışmada, ACh ile kasılan kobay ve tavşan fundus striplerinde ortama kümülatif konsantrasyonda uygulanan  $Ca^{+2}$  ile elde edilen cevaplar pinaverium tarafından anlamlı olarak inhibe edildi.

Pinaverium gastro-intestinal sistemde lokal spazmolitik etki gösteren bir ilaç olup,  $Ca^{+2}$  antagonistlerinde olduğu gibi düz kas hücrelerine ekstraselüler  $Ca^{+2}$  girişini inhibe eder (12,13). Gastrointestinal preparatlar üzerinde yapılan birçok çalışmada, pinaveriumun düz kas hücre membranında bulunan voltaja bağımlı L-tipi kanalları bloke etmek suretiyle  $Ca^{+2}$  girişini inhibe ettiği ve gevşemeye neden olduğu gösterilmiştir (14). Mironneau ve arkadaşları (15), izole sıçan antrumunda  $Ca^{+2}$  'suz ortamda ACh ile oluşturulan kasılma ce-

vabının pinaveriumla inhibe edildiğini, aynı çalışmada metoksiverapamil ile mukayese edilen bu ajanın etkisinin, halen kullanılmakta olan  $Ca^{+2}$  antagonistlerine oldukça benzediğini göstermişlerdir. Bir başka çalışmada ise Bobo ve arkadaşları (16), izole tavşan antrumunda gastro-intestinal hormonlardan gastrin ile elde edilen kasılma cevaplarının esasen ekstraselüler  $Ca^{+2}$  'a bağımlı olduğunu ve bu cevabın diltiazem ve nikardipin gibi pinaveriumla da inhibe edildiğini ve dolayısıyla söz konusu ajanın  $Ca^{+2}$  kanal blokörü özelliğinin olabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada pinaveriumla elde edilen bulgular, yukarıda belirtilen araştırmacıların elde ettikleri sonuçlara benzemektedir olup, onları destekler niteliktedir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, her iki türden alınan mide fundus striplerinde elde edilen kasılma cevaplarının pinaveriumla anlamlı olarak inhibe edildiğini, inhibisyonun kobay mide fundusunda daha belirgin olduğunu ve pinaveriumun etkisinin  $Ca^{+2}$  antagonistlerine benzediğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Glusa E, Markward F. Effect of calcium channel blockers on the contractile response to dihydroergotamine in isolated human femoral veins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1987; 335: 529-533.
2. Bülbring E, Kuriyawa H. Effects of changes in ionic environment on the action of acetylcholine and adrenaline on the smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli. *J Physiol* 1963; 166: 59-74.
3. Mostwin JL. Receptor operated intracellular calcium stores in the smooth muscle of the guinea-pig bladder. *J Urol* 1985; 133: 900-902.
4. Breemen CV, Aoronson P, Loutzenheiser R. Sodium-calcium interaction in mammalian smooth muscle. *Pharmac Rev* 1979; 30: 167-208.
5. Catterall WA, Striessnig J. Receptor sites for  $Ca^{+2}$  channel antagonists. *Trends in Pharmac Sci* 1992; 13 (6): 256-262.
6. Karaki H, Weiss G. Calcium channels in smooth muscle. *Gastroenterology* 1984; 87: 960-970.
7. Casteels R, Droogmans G. Exchange characteristics of the noradrenaline sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells of rabbit ear artery. *J Physiol* 1981; 317: 263-279.
8. Itoh Z, Takahashi I. Inhibitory effect of pinaverium bromide on gastrointestinal contractile activity in conscious dogs. *Arzneim Forsch Drug Res* 1981; 31: 1450-1453.
9. Grenier JF, Angel F, Schang JC, Crenner F, Said A. Action du pinaverium sur la motricite intestinale. Etude chez le chien *J Med Strassbourg* 1983; 14: 385-388.
10. Baumgartner A, Drack E, Halter F, Scheurer U. Effects of pinaverium bromide and verapamile on the motility of the rat isolated colon. *Br J Pharmacol* 1985; 86: 89-94.
11. Goldstein A. Biostatistics and introductory text. New York: The Mc Millan Co, 1971.
12. Guslandi M. The clinical pharmacological profile of pinaverium bromide. *Minerva Medica* 1994; 85 (4): 179-185.
13. Bouchoucha M, Salles JP, Fallet M, Frileux P, Cugnenc PH, Barbier JP. Effect of pinaverium bromide on jejunal motility and colonic transit time in healthy humans. *Biomed Pharmacother* 1992; 46 (4): 161-165.
14. Christen MO. Action of pinaverium bromide a calcium-antagonist on gastrointestinal motility disorders. *Gen Pharmacol* 1990; 21 (6): 821-825.
15. Mironneau J, Lalanne C, Mironneau C, Savineau JP, Lavie JL. Comparison of pinaverium bromide, manganese chloride and D600 effects on electrical and mechanical activities in rat uterine smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1984; 98 (1): 99-107.
16. Bobo MH, Magous R, Christen MO, Bali JP. Effect of pinaverium and other calcium channel blockers on contraction of isolated gastric antral smooth muscle cells caused by gastrointestinal hormones. *Life Sciences* 1994; 54 (25): 1947-1954.