

## İZOLE SIÇAN GASTRO-ÖZOFAGAL SFİNKTERİNDE ASETİLKOLİN'E BAĞLI KASILMALARDA FELODİPİN, VERAPAMİL, NİMODİPİN VE NİKARDİPİN'İN İNHİBİTÖR ETKİLERİ

Ecz. Arzu KÜÇÜKOSMANOĞLU, Dr. Ekrem ÇİÇEK, Dr. Necdet DOĞAN  
S.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı

### ÖZET

Sunulan bu *in vitro* çalışmada, sıçan gastro-özofagal sfinkterinde, asetilkoline bağlı kasılma üzerine felodipin, verapamil, nimodipin ve nikardipin'in gevşetici etkileri araştırıldı.

Sıçandan alınan gastro-özofagal sfinkter şeritleri Krebs-Henseleit solüsyonu içine alınarak,  $10^{-4}$ M asetilkolin ile kasıldı. Plato fazı oluştuktan sonra, antagonistlerden biri kümülatif konsantrasyonda ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$ M) ilave edilerek cevaplar gözlemlendi. Çalışmanın diğer bölümünde ise,  $Ca^{2+}$ 'suz ortamda asetilkolinle kasılan doku üzerine aynı antagonist kümülatif konsantrasyonda uygulandı.

$Ca^{2+}$ 'suz ortamda asetilkoline bağlı maksimum kasılma cevabı, başlangıçta  $Ca^{2+}$ 'lu ortamda meydana gelen kasılmaya yakın büyüklükte oluştu. Bu durum asetilkoline bağlı kasılmalarda ekstraselüler  $Ca^{2+}$  yanında, intraselüler  $Ca^{2+}$  kullanıldığını da göstermektedir.

Bulgular; bu dokuda kullanılan antagonistlerin inhibitör güç sıralamasının felodipin> verapamil> nimodipin=nikardipin şeklinde olduğunu, aynı inhibisyonun  $Ca^{2+}$ 'suz ortamda meydana gelmediğini, böylece söz konusu ilaçların gastro-özofagal sfinkter kasılmaları üzerine etkili olabileceklerini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Gastro-özofagal sfinkter, kalsiyum kanal blokerleri, kalsiyum iyonu-Asetilkolin

### SUMMARY

*The Inhibitory Effects of Felodipine, Verapamile, Nimodipine and Nicardipine on The Contractile Response to Acetylcholine in Isolated Rat Gastro-esophageal Sphincter*

In this *in vitro* study, the dilatory effects of felodipine, verapamile, nimodipine and nicardipine on the contractile response to acetylcholine in isolated rat esophageal sphincter were investigated.

The gastro-esophageal sphincters, obtained from rats, were suspended in Krebs-Henseleit solution and were contracted with  $10^{-4}$  M acetylcholine. In this part of investigation, cumulative concentrations ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$ M) of one of the antagonists were added in the medium. Then the responses were observed. In the other part of investigation, cumulative concentrations of the same antagonist were applied on the preparation, which was contracted with acetylcholine in the  $Ca^{2+}$ -free medium.

The maximum contraction response induced by acetylcholine in  $Ca^{2+}$ -free medium was similar to the response, obtained in medium with  $Ca^{2+}$ . It was showed that, acetylcholine used both intra-and extracellular  $Ca^{2+}$ . The potency of the inhibitory effects of these calcium channel blockers was felodipine>verapamile>nimodipine=nicardipine. In  $Ca^{2+}$ -free medium, there was no inhibition.

The results suggest that, these calcium channel blockers are effective on gastro-esophageal sphincter contractions and may be useful in the treatment of esophageal spasm.

Key Words: Gastro-esophageal sphincter, calcium channel blockers, calcium ion, acetylcholine.

## GİRİŞ

Ca<sup>2+</sup>, özofagal düz kas kasılmaları için temel iyondur (1). Gastro-özofagal sfinkterinde ekstraselüler Ca<sup>2+</sup>'un uzaklaştırılması ile asetilkoline verilen kasılma tarzındaki cevapların ortadan kalkmadığı görülmüş, bu nedenle asetilkoline bağlı kasılmalarda ekstraselüler Ca<sup>2+</sup> yanında, intraselüler Ca<sup>2+</sup> salıverilmesinin de rol oynadığı savunulmuştur (2).

Düz kasda oluşan kontraktıl cevaplar iki tip kalsiyum kanalından Ca<sup>2+</sup>-influx'ının olmasına bağlıdır. Bunlar voltaja bağımlı ve reseptöre bağımlı kalsiyum kanallarıdır (3). Gastrointestinal sistemdeki düz kaslı yapılar belirtilen iki tip kalsiyum kanalını da içerirler (4).

Kalsiyum kanal blokörlerinin çeşitli türlerin gastro-özofagal sfinkteride, kolinerjik agonistlere bağlı kasılmalarda etkili oldukları gözlenmiştir. Köpek gastro-özofagal sfinkterinde asetilkoline bağlı düz kas aktivitesi nifedipin ile inhibe olmakta, aynı ilaç in vivo ortamda oral yolla LES (Lower Esophageal Sphincter: alt özofagal sfinkter) basıncını azaltmaktadır (5). Başka bir araştırmada verapamil ve diltiazem in izole sıçan gastro-özofagal sfinkterinde asetilkolin, karbakol ve yüksek K<sup>+</sup>'a bağlı kasılma cevaplarını inhibe ettiği gösterilmiş ve özellikle LES basıncının oluşmasında Ca<sup>2+</sup>'un önemli bir rol oynadığını ortaya konmuştur. Kedi serebral ve mezenterik arterlerinde yapılan bir çalışmada; mezenterik arterin yüksek K<sup>+</sup> solüsyonu, serebral arterin ise PGF<sub>2α</sub> ile oluşan kasılmalarında, kalsiyum kanal blokörlerinin inhibitör güçleri nimodipin> nifedipin>verapamil>diltiazem şeklinde olmuştur. Aynı dokularda Ca<sup>2+</sup>'suz ortamda yüksek K<sup>+</sup> ile oluşan kasılmalarda ise, nifedipin ve nimodipinin daha etkili oldukları görülmüştür. Bu sonuç kalsiyum kanal blokörlerinin yalnızca Ca<sup>2+</sup>-influx'ını inhibe etmediklerini, ayrıca intraselüler etkilerinin de olabileceğini göstermektedir (6). Yapılan çeşitli çalışmalarda bu grup ilaçların özofagal motilitesi artmış hastalarda tedavi sağladığı görülmektedir. Deneysel olarak peristaltik kasılmaların amplitüdünü azaltıp, LES basıncını düşürürler (7). Özellikle verapamil, diltiazem ve nifedipin bu amaçla kullanılmaktadır (8).

Sunulan bu çalışmada rat özofagal sfinkterinde, Ca<sup>2+</sup>'lu ve Ca<sup>2+</sup>'suz ortamda asetilkoline bağlı kasılmalar üzerine kalsiyum kanal blokörlerinden felodipin, verapamil, nimodipin ve nikardipinin etkile-

ri araştırıldı.

## MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada, her iki seksten albino sıçanlar (200-250 g) kullanıldı. Karotis arterleri kesilerek öldürüldü. Karın açılıp, mide ile birlikte özofagusun 1,5 cm'lik kısmı dışarıya alındı. Gastro-özofagal sfinkter bölgesinden yaklaşık 10 mm boyunda ve 3,5 mm eninde transvers şerit hazırlandı. Preparat 25 ml Krebs-Henseleit solüsyonu içeren, 37°C de ısıtılan ve %95 O<sub>2</sub>-%5 CO<sub>2</sub> karışımı ile gazlandırılan organ banyosuna asıldı. 1 g gerilim uygulanarak 90 dakika süreyle dinlenmeye bırakıldı. Bu süre içerisinde preparat her 15 dakikada normal besleyici solüsyonla yıkandı. Agonist ve antagonistlere verilen cevaplar izotonik bir levye aracılığıyla 10 kez büyütülerek isli kağıda kaydedildi.

Doku normal Krebs solüsyonunda önce 10<sup>-4</sup>M asetilkolin ile kasıldı. Plato fazı oluştuktan sonra, antagonistlerden biri kümülatif konsantrasyonda (10<sup>-9</sup>-10<sup>-4</sup>M) uygulandı. Maksimum gevşeme cevabı elde edildikten sonra, preparat yıkanarak 0,77 mM Na<sub>2</sub>-EDTA içeren Ca<sup>2+</sup>'suz solüsyona alındı. 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Doku tekrar 10<sup>-4</sup>M asetilkolin ile kasıldı. Maksimum kasılma cevabından sonra, aynı antagonist kümülatif konsantrasyonda uygulandı. Her dokuda sadece bir kalsiyum antagonisti denendi. Son olarak aynı uygulama, banyoya felodipin, nimodipin ve nikardipin solventi ilave edilerek yapıldı.

Krebs-Henseleit solüsyonunda antagonistlerin oluşturduğu gevşeme cevapları, agonistle elde edilen maksimum kasılma cevabının %'si olarak değerlendirildi. Elde edilen değerler ortalama±standart hata şeklinde belirlendi. Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel analizi Student'in "t" testi ile hesaplandı (9). Grup içi analizlerde eşleştirilmiş, gruplar arası analizlerde ise eşleştirilmemiş test uygulandı. P değerinin 0.05'den küçük bulunması durumunda ortalamalar arasındaki fark anlamlı kabul edildi.

Kullanılan Krebs-Henseleit solüsyonunun içeriği mM olarak şöyledir; NaCl 118.00, KCl 4.70, CaCl<sub>2</sub> 1.60, MgSO<sub>4</sub> 1.20, NaHCO<sub>3</sub> 24.90, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.20, Glukoz 11.10

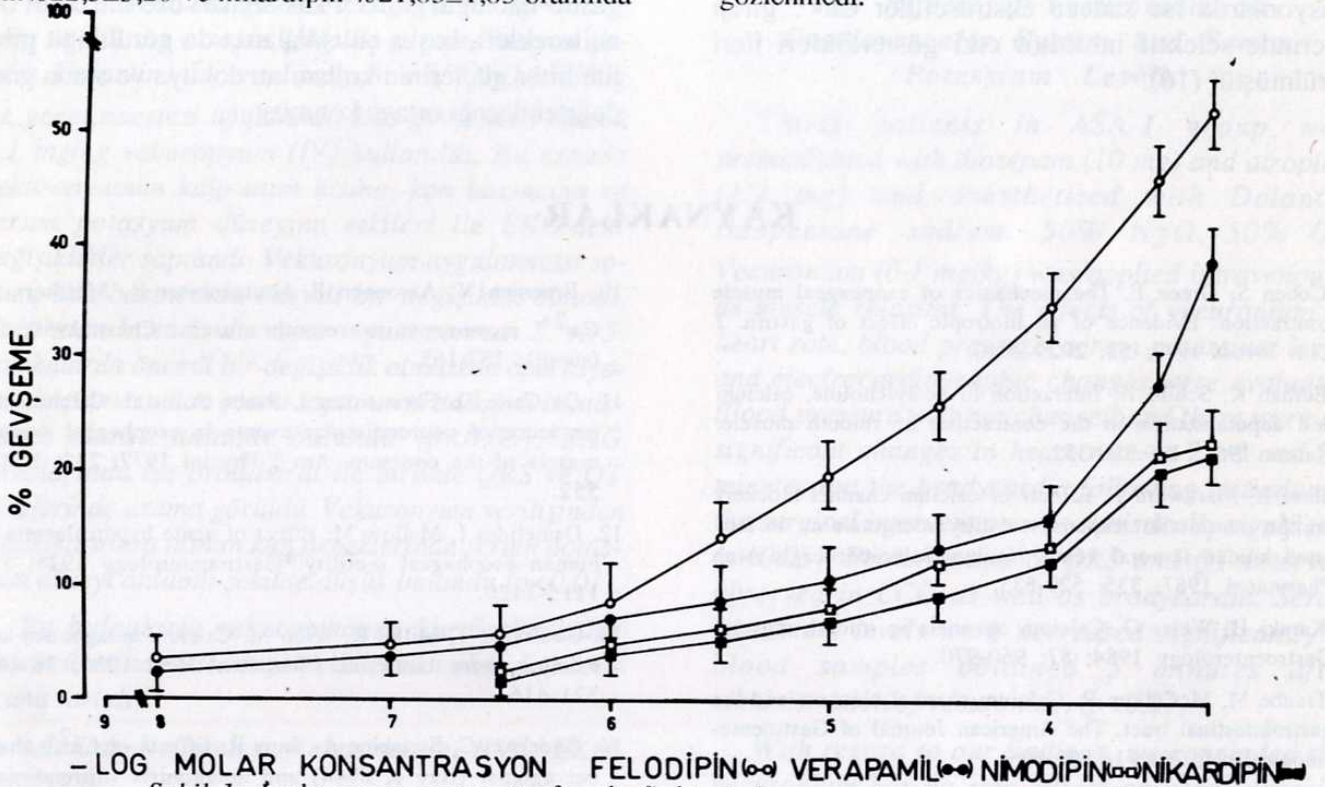
Kullanılan agonist ve antagonistler: Asetilkolin HCl (Haver), Verapamil (Schering), Nikardipin (Sandoz), Nimodipin (Bayer), Felodipin (Hässle).

## BULGULAR

İzole sıçan gastro-özofagal sfinkterinde aynı dokuda normal ve  $Ca^{2+}$ 'suz solüsyonda  $10^{-4}M$  konsantrasyonda uygulanan asetilkolin, konsantrasyona bağımlı ve tekrarlanabilir nitelikte kasılmalar meydana getirdi. Normal solüsyonlu ortamda kümülatif konsantrasyonda uygulanan felodipin bu kasılmaları %51,5±3,34, verapamil %38,28±3,59, nimodipin %22,5±3,20 ve nikardipin %21,85±1,83 oranında

anlamli olarak inhibe etti ( $p<0.05$ ) (Şekil-1). Kullanılan kalsiyum kanal blokörlerinin inhibitör güç sıralaması felodipin>verapamil> nimodipin= nikardipin şeklinde bulundu ( $p<0.05$ ).

Aynı kalsiyum kanal blokörlerinin  $Ca^{2+}$ 'suz ortamda söz konusu kasılmaları inhibe etmediği görüldü. Felodipin, nimodipin ve nikardipin solventi ile yapılan kontrollerde solvante bağı bir etki gözlenmedi.



Şekil-1: İzole sıçan gastro-özofagal sfinkterinde normal solüsyonda asetilkoline bağı kasılmalarda felodipin, verapamil, nimodipin ve nikardipinin oluşturduğu gevşeme cevapları.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

İzole sıçan gastro-özofagal sfinkterinde yapılan bu çalışmanın normal solüsyon kullanılarak yürütülen bölümünde asetilkolinle oluşturulan kasılma cevaplarının felodipin, verapamil, nimodipin ve nikardipinle anlamli olarak inhibe edildiği saptanmıştır. Buna karşın, kalsiyumsuz ortamda yapılan çalışmalarda, belirtilen kalsiyum antagonistleri asetilkoline bağı kasılma cevaplarını etkilememiştir.

Birçok düz kaslı yapıda olduğu gibi, sıçan gastro-özofagal sfinkterinde de eksitasyon-kontraksiyon ketininin sağlanabilmesi için sitoplazmik  $Ca^{2+}$  düzeyinin artması gerekir. Bu artış hücre  $Ca^{2+}$  depolarından ve/veya ekstraselüler ortamdan kalsiyum kanalları ile hücreye giren  $Ca^{2+}$ 'la sağlanır (10,11). Nitekim, insanda yapılan yapılan bir çalışmada,

$Ca^{2+}$  infüzyonunun özofagusta kasılma amplitüdünü artırdığı saptanmıştır (12). Buna ilaveten, izole sıçan gastro-özofagal sfinkterinde yapılan bir çalışmada spontan olarak gerçekleşen veya agoniste bağı olarak oluşan kasılmaların kalsiyum kanal blokörleri ile azaltıldığı görülmüştür (5).

Kalsiyum kanal blokörlerinin inhibitör etkilerinin derecesi türe ve çalışılan dokuya göre değişmektedir. Örneğin; sıçan ve kobay gastrointestinal düz kasında yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada, kascı ajan olarak asetilkolin kullanılmış ve verapamil ile dazodipinin inhibitör etkinliğinin kobayda daha belirgin olduğu bulunmuştur (13). Benzer şekilde, Anderson ve arkadaşları (14) nikardipin, nifedipin, nimodipin ve nisoldipin ile yaptıkları bir çalışmada; tavşan aortasında nikardipinin, rat aortasında ise nisoldipinin yüksek  $K^{+}$ 'a bağı

kasılmaları daha güçlü bir şekilde inhibe ettiği göstermişlerdir.

Sunulan bu çalışmada kalsiyum antagonistlerinin belirtilen konsantrasyonlarında  $Ca^{2+}$ 'suz ortamda etki yapmadıkları görülmüştür. Yapılan araştırmalarda verapamil ve diltiazemin intraselüler  $Ca^{2+}$  rilizini de azalttıkları (15), ancak bu etkinin yüksek konsantrasyonlarda meydana geldiği, düşük konsantrasyonlarda ise sadece ekstraselüler  $Ca^{2+}$  girişi üzerinde selektif inhibitör etki gösterdikleri ileri sürülmüştür (16).

Akalazia, gastro-özofagal sfinkterin gevşeyemesi ile karakterize bir sindirim sistemi hastalığıdır. Kalsiyum kanal blokörlerinin bu hastalıkta da kullanılabilirlikleri birçok çalışmada ortaya konmuştur. Etkisi en çok araştırılanlardan nifedipinin in vitro köpek özofagusunda asetilkoline bağlı kasılmaları azalttığı, aynı ilacın sublingual kullanımının LES basıncında düşmeye neden olduğu bildirilmiştir (17). Sunulan bu çalışmada, kullanılan antagonistlerin gastro-özofagal sfinkter kasılmaları üzerine etkili olabilecekleri, başka çalışmalarda da görüldüğü gibi, inhibitör güçlerinin kullanılan dokuya ve ajana göre değişebileceği ortaya konmuştur.

## KAYNAKLAR

1. Cohen S, Green F. The mechanics of esophageal muscle contraction. Evidence of an inotropic effect of gastrin. *J Clin Invest* 1973; 52: 2029-2040.
2. Edman K, Schild H. Interaction of acetylcholine, calcium and depolarization in the contraction of smooth muscle. *Nature* 1961; 190:350-352.
3. Glusa E, Markward F. Effects of calcium channel blockers on the contractile response to dihydroergotamine in isolated human femoral veins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1987; 335: 529-533.
4. Karaki H, Weiss G. Calcium channels in smooth muscle. *Gastroenterology* 1984; 87: 960-970.
5. Traube M, McCallum R. Calcium channel blockers and the gastrointestinal tract. *The American Journal of Gastroenterology* 1984; 79: 11: 892-895.
6. Anderson K, edvinson L, MacKenzie E, Skärby T, Young A. Influence of extracellular calcium and calcium antagonists on contraction induced by potassium and prostaglandin  $E_{2\alpha}$  in isolated cerebral and mesenteric arteries of the cat. *Br J Pharmacol* 1983; 79: 135-140.
7. Castell D. Calcium-channel blocking agents for gastrointestinal disorders. *Am J Cardiol* 1985; 55: 210B-213B.
8. Richter J, Dalton C, Buice R, Castell D. Nifedipine: a potent inhibitor of contractions in the body of the human esophagus. *Gastroenterology* 1985; 89: 549-554.
9. Goldstein A. Biostatistics and introductory text. New York: The Mc Millan Co, 1971.
10. Breemen V, Aaronson P, Loutzenhiser R, Meisneri K.  $Ca^{2+}$  movements in smooth muscle. *Chest* 1980; 78 (suppl): 157-165.
11. De Carle D, Christensen J, Szabo A, et al. Calcium dependence of neuromuscular events in esophageal smooth muscle of the opossum. *Am J Physiol* 1977; 232: E547-552.
12. Danielides I, Mellow M. Effect of acute hypercalcemia in human esophageal motility. *Gastroenterology* 1978; 75: 1115-1120.
13. Godfraind T, Miller R, Wibo M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol Rew* 1986; 38 (4): 321-416.
14. Anderson C, Scriabine A, Janis R. Effects of  $Ca^{2+}$  channel agonist (Bay K 8744) and antagonists (nitrendipine, nisoldipine, verapamil and diltiazem) on  $Ca^{2+}$  uptake by rabbit aortic rings. *Fed Proc* 1984; 43: 550.
15. Raddino R, Poli E, Ferrari R, Visioli O. Effects of calcium entry blockers not connected with calcium channels inhibition. *Gen Pharmacol* 1987; 18 (4): 431-436.
16. Cerrina J, Advenier C, Renier A, Floch A, Duroux P. Effects of diltiazem and other  $Ca^{2+}$  antagonists on guinea-pig tracheal muscle. *European Journal of Pharmacology* 1983; 94: 241-249.
17. Golenhofen K, Weiser H, Siewert R. Phasic and tonic types of smooth muscle activity in lower esophageal sphincter and stomach of dog. *Acta Hepato-Gastroenterol* 1979; 26: 227-234.