

## İZOLE TAVŞAN DETRUSOR KASINDA KARBAKOL'E BAĞLI KASILMANIN KALSİYUM İLE İLİŞKİSİ VE BAZI MUSKARİNİK ANTAGONİSTLERİN İNHİBİTÖR ETKİLERİ

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

\* S.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı

### ÖZET

İzole tavşan detrusor kasında yapılan bu *in vitro* çalışmada; kalsiyumsuz ortamda karbakol ile kasılan dokular üzerine uygulanan kalsiyumla elde edilen cevaplara, verapamilin inhibitör etkisi ile normal solüsyonlu ortamda aynı agoniste bağlı kasılmalar üzerine atropin, amitriptilin ve maprotilinin gevşetici etkileri araştırıldı.

0.1 mM EGTA içeren kalsiyumsuz ortamda  $10^{-6}$  M konsantrasyonda karbakole bağlı oluşan kasılma cevapları, ortama ilave edilen kalsiyum ( $10^{-4}$  -  $3 \times 10^{-3}$  M) ile doza bağımlı bir şekilde anlamlı olarak arttı ( $p < 0.05$ ). Bu artış,  $10^{-6}$  ve  $10^{-5}$  M verapamil varlığında kontrole göre sırasıyla %  $69.75 \pm 5.52$  ve %  $42.89 \pm 4.13$  oranında bulundu. Çalışmanın normal solüsyonla yürütülen bölümünde ise, aynı konsantrasyonda karbakol ile meydana gelen kasılma cevapları, kümülatif konsantrasyonda ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M) uygulanan atropin, amitriptilin ve maprotilin tarafından inhibe edildi.

Bulgular, kullanılan dokuda karbakole bağlı kasılmada ekstraselüler kalsiyum yanında intraselüler kalsiyumun da kullanıldığını göstermektedir. Ayrıca kullanılan antagonistlerin karbakole bağlı kasılmaları anlamlı olarak inhibe ettiğini ve  $IC_{50}$  değerlerine göre güç sıralamasının atropin > amitriptilin > maprotilin şeklinde olduğunu ortaya koymaktadır ( $p < 0.05$ ).

Anahtar Kelimeler: Kalsiyum iyonu, karbakol, atropin, amitriptilin, maprotilin, detrusor kası, *in vitro*.

### SUMMARY

#### *The Relation Of Carbachol-Induced Contraction With Calcium And The Inhibitor Effects Of Some Muscarinic Antagonists In Isolated Rabbit Detrusor Muscle.*

In this *in vitro* study, the inhibitory effect of verapamil on the responses obtained with calcium on the carbachol induced contractions. In  $Ca^{2+}$ -free medium and the relaxation effects of atropin, amitriptyline and maprotiline on the same contraction in the medium with normal solution in isolated rabbit detrusor muscle.

In  $Ca^{2+}$ -free medium with 0.1 mM EGTA, the carbachol-induced contractions were significantly increased by adding of  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  -  $3 \times 10^{-3}$  M) dose dependently ( $p < 0.05$ ). This increase was found to be as  $69.75 \pm 5.52$  % and  $42.89 \pm 4.13$  % in the presence of  $10^{-6}$  M and  $10^{-5}$  M verapamil, respectively. In the other part of study carried out using normal solution, the carbachol ( $10^{-6}$  M) induced contractions were inhibited by cumulative addition ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M) of atropin, amitriptyline and maprotiline.

Results suggest that, intracellular calcium was used as well as extracellular calcium for contractions due to carbachol in this tissue. In addition, the antagonists significantly inhibited the contractions induced with carbachol and according to  $IC_{50}$  these antagonists were following order of potency atropin > amitriptyline > maprotiline ( $p < 0.05$ ).

Key Words: Calcium ion, carbachol, atropin, amitriptyline, maprotiline, detrusor muscle, *in vitro*.

## GİRİŞ

Mesane düz kasında muskarinik reseptörlerin, aktivasyonu fazik ve tonik komponentten oluşan bifazik kasılma cevapları meydana getirmektedir (1,2). Yapılan birçok çalışmada, söz konusu kasılmanın özellikle fazik kısmının kalsiyum antagonistleri tarafından veya kalsiyumsuz ortamda tamamen ortadan kaldırılmaması, bu kasılmanın esas olarak intraselüler kalsiyuma bağlı olduğunu göstermektedir (3,4). Asetilkolin ve karbakole bağlı kasılmaların tonik fazında intraselüler kalsiyumun rolü oldukça azdır. Tonik kasılma genelde, ekstraselüler kalsiyum ve voltaja bağımlı kanallar aracılığı ile olmaktadır (5). Bir grup araştırmacı düz kasta karbakole bağlı tonik kasılma cevabının meydana gelmesi ile ilgili hipotezlerinde; karbakolün spesifik G proteinine bağlanmak suretiyle muskarinik reseptörleri uyarıp G-protein - fosfolipaz C'yi aktive ettiğini, bunun da membran fosfolipitlerinden diacylglycerol (DAG)'ü oluşturduğunu belirterek bu son faktörün de kısmen protein-kinaz C (PKC)'yi aktive etmesiyle kısmen de ATP duyarlı potasyum kanallarını inaktive ederek voltaja bağımlı kalsiyum kanallarının açılmasına, böylece kalsiyum influksuna neden olarak düz kas hücre membranının depolarize olduğunu belirtmişlerdir.

Mesane düz kasında kalsiyumsuz ortamda muskarinik agonistle meydana gelen kasılma, intraselüler depolardan kalsiyumun mobilizasyonu sonucu oluşmakta ve bu cevap ekstraselüler kalsiyum ilavesiyle artırılmaktadır. Valerie ve arkadaşları (6), kobay detrusor düz kasında yaptıkları bir çalışmada, kalsiyumsuz ortamda karbakole bağlı kasılmanın kalsiyumlu ortamda elde edilen kasılmaya oranla % 35 oranında azaldığını bunun da kalsiyum ilavesiyle artırıldığını göstermişlerdir.

Kalsiyum antagonistleri voltaja bağımlı kalsiyum kanallarını bloke ederek kalsiyum girişini engellerler. Bu etkilerini damar dışı düz kaslı yapılarda da meydana getirmektedirler. Nitekim Fovaeus ve arkadaşları (7), bu antagonistlerin mesane motilitesi ve üretra düz kası üzerine olan güçlü inhibitör etkilerini çeşitli türlerde ortaya koymuşlardır.

Tedavide antidepresan olarak kullanılan ilaçların bu etkileri yanında, çoğunun antikolinergik etkiye de sahip olduğu bilinmektedir. Bunlardan amitriptilin, doxepin ve imipramin muskarinik reseptörleri non-selektif bir şekilde bloke ederler (8). Kobay mesanesinde yapılan bir çalışmada, karbakole bağlı kasılmanın inhibisyonunda, kullanılan ilaçlara ait güç sıralamasının atropin=propantein > oksibutin > heksahidroksiladifenidol > disiklamin > terodilin > imipramin şeklinde olduğu gösterilmiştir (6).

Sunulan bu in vitro çalışmada, tavşan detrusor düz kasında karbakole bağlı kasılmanın kalsiyum iyonu ile ilişkisi ve bu kasılma üzerine atropin ile antidepresan ilaçlardan amitriptilin ve maprotilinin inhibitör etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOD

Çalışmada 2-2.5 kg ağırlığında her iki sekse ait Yeni Zelanda türü tavşanlar kullanıldı. Hayvanlar karotis arterleri kesilerek öldürüldü. Karın açılıp, mesane dışarıya alındı. Detrusor kasından yaklaşık 10 mm boynuda ve 2-3 mm eninde transvers şeritler hazırlandı. Preparatlar, normal Krebs-Henseleit solüsyonu içeren 25 ml'lik organ banyosuna asıldı. Ortam ısı 37° C'e ayarlanıp, % 95 O<sub>2</sub>-% 5 CO<sub>2</sub> karışımı ile sürekli gazlandırıldı. 1 g gerilim uygulanarak, 60 dakika süreyle dinlenmeye bırakıldı. Bu süre içinde preparatlar her 15 dakikada bir normal solüsyonla yıkandı. İlaçlara verilen cevaplar izometrik olarak osilografa (Harvard) kaydedildi.

Dinlenme süresinin bitiminde doku, 0.1 mM EGTA içeren Ca<sup>2+</sup>, suz solüsyona alınarak 60 dakika süreyle inkübe edildi. Bu sürenin bitiminde doku, 10<sup>-6</sup> M konsantrasyonda karbakol ile kasıldı. Kasılma stabil hale geldikten sonra, ortama kümülatif konsantrasyonda Ca<sup>2+</sup> (10<sup>-4</sup> - 3x10<sup>-3</sup>M) ilave edilerek oluşan cevaplar gözlemlendi. Doku normal solüsyonla yıkandı. Kontrol amacı ile yapılan bu işlemler, aynı dokuda agoniste bağlı kasılma üzerine 15 dakika süreyle inkübe edilen verapamilin 10<sup>-6</sup> veya 10<sup>-5</sup> M konsantrasyonu varlığında yapılarak, söz konusu antagonistin bu kasılmaları inhibe etme gücü araştırıldı.

Çalışmanın diğer bir bölümünde ise, doku normal solüsyonda 10<sup>-6</sup> M karbakol ile kasıldı.

Plato fazı oluştuktan sonra, ortama kümülatif konsantrasyonda ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$ M) atropin, amitriptilin veya maprotilin uygulanarak gevşeme cevapları gözlemlendi. Her dokuda sadece bir antagonist denendi.

EGTA içeren  $Ca^{2+}$ 'suz ortamda verapamil uygulanmadan önce  $Ca^{2+}$  ilavesiyle karbakole verilen maksimum cevap 100 kabul edilip, verapamil varlığında elde edilen kasılmalar bunun %'si olarak değerlendirildi. Normal solüsyonlu ortamda yapılan çalışmada kullanılan antagonistlere ait  $IC_{50}$  değerleri hesaplanarak inhibitör güçlerinin mukayesesi yapıldı.

Elde edilen değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak belirlendi ve ortalamalar arasındaki farkın anlamlılık derecesi Student'in 't' testi ile hesaplandı (9), P değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı kabul edildi.

Deneylerde kullanılan normal Krebs-Henseleit solüsyonunun içeriği mM olarak şöyledir: NaCl 118,  $MgSO_4$  1.5, KCl 4.7,  $CaCl_2$  2.5,  $NaHCO_3$  25.0,  $KH_2PO_4$  1.20 ve Glukoz 11.10.

Çalışmada kullanılan ilaçlar: Karbakol klorid (Sigma), verapamil (Schering), atropin (Sigma), amitriptilin (Roche) ve maprotilin (Ciba).

## BULGULAR

İzole tavşan detrusor kasında  $Ca^{2+}$ 'suz ve normal solüsyonlu ortamda  $10^{-6}$  M konsantrasyonda uygulanan karbakol, tekrarlanabilir nitelikte kasılmalar oluşturdu.

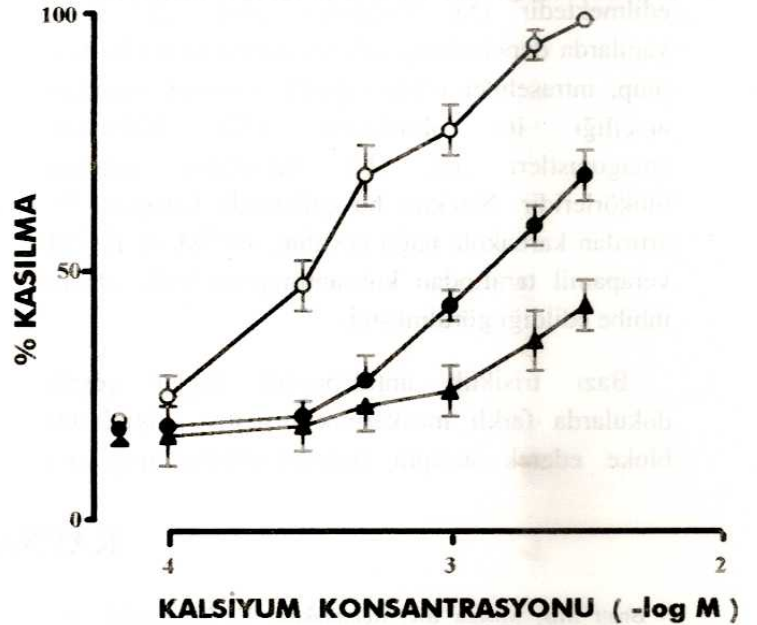
$Ca^{2+}$ 'suz ortamda agonist varlığında kümülatif konsantrasyonda ilave edilen  $Ca^{2+}$ 'a bağlı maksimum kasılma kontrole göre,  $10^{-6}$  M konsantrasyonda verapamilli ortamda  $69.75 \pm 5.52$  ve  $10^{-5}$  M konsantrasyonunda ise,  $42.89 \pm 4.13$  oranında meydana geldi (Şekil 1). Verapamilin farklı iki konsantrasyonuna bağlı inhibisyon oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ).

Normal solüsyonlu ortamda karbakole bağlı kasılmalar üzerine uygulanan atropin, amitriptilin ve maprotilin söz konusu kasılmaları % 100 oranında inhibe ettiler (Şekil 2). Bu antagonistlere ait  $IC_{50}$

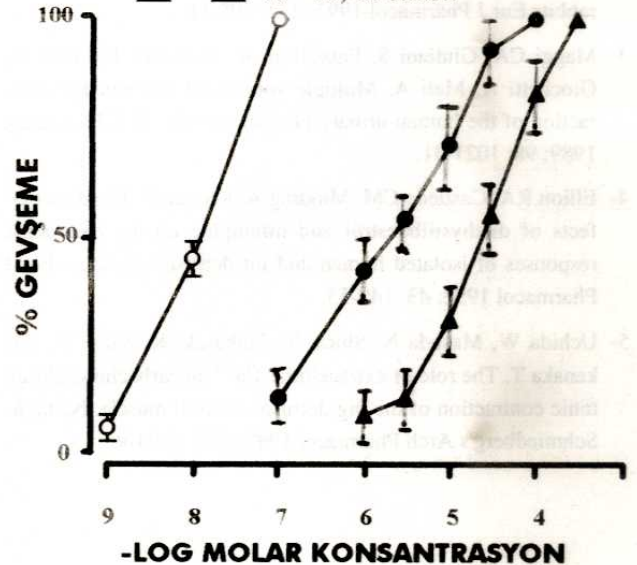
değerleri karşılaştırıldığında, inhibitör güç sıralamasının atropin > amitriptilin > maprotilin şeklinde meydana geldiği görüldü ( $p < 0.05$ ) (Tablo 1).

Tablo 1: Normal solüsyonlu ortamda karbakole bağlı kasılma üzerine kullanılan antagonistlerin  $IC_{50}$  değerleri

Antagonist	$IC_{50}$ (M)	n
Atropin	$1.37 \pm 0.30 \times 10^{-8}$	7
Amitriptilin	$4.78 \pm 2.20 \times 10^{-6}$	7
Maprotilin	$2.64 \pm 0.54 \times 10^{-5}$	7



Şekil 1: Kalsiyumsuz ortamda karbakol ile meydana gelen kasılma üzerine ilave edilen  $Ca^{2+}$ 'a bağlı maksimum cevaplara (○—○) verapamil ( $10^{-6}$  M), (▲—▲)  $10^{-5}$  M'in etkisi.



Şekil 2: Karbakol ile kasılan dokuda atropin (○—○), amitriptilin (●—●) ve maprotilin (▲—▲)'e verilen gevşeme

## TARTIŞMA

Destrusör düz kasında yapılan bu in vitro çalışmada; kalsiyumsuz ortamda karbakole bağlı kasılma, kalsiyum ilavesiyle artırılmış ve bu cevap verapamil ile konsantrasyona bağlı olarak inhibe edilmiştir. Mesane düz kasında karbakol ile meydana gelen bifazik kasılmaların genellikle M<sub>3</sub>-tipi muskarinik reseptörler aracılığı ile olduğu gösterilmiştir (10,11). Bu kasılmanın fazik kısmı inositol trifosfat (IP<sub>3</sub>) aracılı intraselüler kalsiyum depolarını kullanırken, tonik kısmının ise, voltaja bağımlı kanallar aracılığı ile olduğu kabul edilmektedir (5). Kalsiyum iyonu düz kaslı yapılarda depolarizasyondan sorumlu temel katyon olup, intraselüler ortama girişi kalsiyum kanalları aracılığı ile olmaktadır (12). Kalsiyum antagonistleri ise, bu kanalların selektif blokörleridir. Nitekim bu çalışmada kalsiyum ile artırılan karbakole bağlı cevabın, 10<sup>-6</sup>M ve 10<sup>-5</sup>M verapamil tarafından konsantrasyona bağlı olarak inhibe edildiği görülmüştür.

Bazı trisiklik antidepresan ilaçlar çeşitli dokularda farklı muskarinik reseptör subtiplerini bloke ederek atropin benzeri etkiler meydana

getirmektedirler. Nomura ve arkadaşları (13), muskarinik reseptör subtipleriyle trisiklik antidepresanlar arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla selektif M<sub>2</sub> - reseptör antagonisti [<sup>3</sup>H] AF-DX 116 ve non-selektif muskarinik antagonist [<sup>3</sup>H] NMS ile mukayeseli olarak sıçan beyni ve kalbinde yaptıkları bir çalışmada, amitriptilin ve imipraminin M<sub>2</sub>-tipi muskarinik reseptörler üzerine etkili olduğunu göstermişlerdir. Amitriptilin ile sıçan serebral korteksi ve tavşan vas deferensinde yapılan başka bir çalışmada ise, bu ajanın M<sub>1</sub>-tipi muskarinik reseptörleri bloke ettiği bildirilmiştir (14). Sunulan bu in vitro çalışmada karbakol ile oluşturulan kasılma, atropin yanında amitriptilin ve maprotilin ile de inhibe edilmiştir. Yukarıda belirtilen çalışmalarda da görüldüğü gibi karbakole bağlı kasılmaların inhibisyonunun muskarinik reseptörlerin blokajı ile meydana geldiğini söylemek mümkündür.

Sonuç olarak; kullanılan bu dokuda karbakol ile meydana gelen kasılmanın intra- ve ekstraselüler kalsiyum ile ilişkili olduğu ve bu kasılmanın amitriptilin ve maprotilinle atropine benzer bir şekilde inhibe edildiği ortaya konmuştur.

## KAYNAKLAR

- 1- Bhatt MB, Mishra SK, Rauiprakash V. Differential susceptibility of cholinergic and non cholinergic neurogenic responses to calcium channel blockers and low Ca<sup>2+</sup> medium in rat urinary bladder. Br J Pharmacol 1989; 96: 837-42.
- 2- Yosida M, Nishi K, Machida J, Sakiyama H, Ikeda K, Uedo S. Effects of phorbol ester on lower tract smooth muscle in rabbits. Eur J Pharmacol 1992; 222: 205-11.
- 3- Maggi CA, Giuliani S, Patacchini R, Turini D, Barbanti G, Giochetti A, Meli A. Multiple sources of calcium for contraction of the human urinary bladder muscle. Br J Pharmacol 1989; 98: 1021-31.
- 4- Elliott RA, Castlede CM, Miodrag A, Kirwan P. The direct effects of diethylstilboestrol and nifedipine on the contractile responses of isolated human and rat detrusor muscles. Eur J Pharmacol 1992; 43: 149-55.
- 5- Uchida W, Masuda N, Shirai Y, Shibasaki K, Satoh N, Takenaka T. The role of extracellular Ca<sup>2+</sup> in carbachol-induced tonic contraction of the pig detrusor smooth muscle. Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol 1992; 261: 1204-9.
- 6- Lowe JC, Noronha-Blob L. Effect of extracellular Ca<sup>2+</sup> on cholinergic, KCl and phorbol ester-mediated phosphoinositide turnover and guinea-pig urinary bladder contraction. Eur J Pharmacol 1991; 195: 273-9.
- 7- Fovaeus M, Andersson K-E, Batra S, Morgan E, Sjögren C. Effects of calcium, calcium channel blockers and Bay K 8644 on contractions induced by muscarinic receptor stimulation of isolated bladder muscle from rabbit and man. J Urol 1987; 137: 798.
- 8- Synder SH and Yamamura HI. Antidepressants and the muscarinic acetylcholine receptor. Arch Gen Psychiatry 1977; 34: 236-39.
- 9- Goldstein A. Biostatics and Introductory Text The Mc Millan Co., New York, 1971.
- 10- Tobin G, Sjögren C. In vivo and in vitro effects of muscarinic receptor antagonists on contractions and released of [<sup>3</sup>H] acetylcholine in the rabbit urinary bladder. Eur J Pharmacol 1995; 28 (1): 1-8.

- 11-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.
- 12-Tsien RW, Hess P, Mc Cleskey EW and Rosenberg RL. Calcium channels: Mechanism of selectivity permeation and block. *Ann Rev Bioph Chem.* 1987; 1b: 265-90.
- 13-Nomura S, Zorn SH and Enna SJ. Selective interaction of tricyclic antidepressants with a subclass of rat brain cholinergic muscarinic receptors. *Life Sci.* 1987; 40: 1751-60.
- 14-Choi A, Mitchelson F. Variation in the affinity of amitriptyline for muscarine receptor subtypes. *Pharmacology.* 1994; 48 (5): 293-300.