

ASETİKOLİNİN İZOLE KURBAĞA AKCİĞER ŞERİTLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNE YÖNELİK KARŞILAŞTIRMALI BİR ÇALIŞMA

A Comparative Study on the Effects of Acetylcholine on Frog Lung Tissue

Sühendan ADIGÜZEL^{1,2}, Ramazan UZUN²

¹Çukurova Üniversitesi,
Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı,

²Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi
Başkanlığı,
Zehir Araştırma Müdürlüğü,
ANKARA

İletişim:
Sühendan ADIGÜZEL
Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi
Başkanlığı,
Zehir Araştırma Müdürlüğü,
ANKARA
Tel : 0 312 458 24 60
Faks : 0 312 458 23 95
e-posta: suhendana.adiguzel@rshm.gov.tr

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, parasempatomimetik etkili bir nörotransmitter olan asetilkolinin, tatlı su kurbağasının (*Amfibia*) akciğer dokusunda intrinsek tonus üzerindeki etkilerinin, fizostigmin içeren ve içermeyen ortamlarda değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Kurbağa akciğer dokusuna 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 M konsantrasyonlarında asetilkolin uygulamaları, fizostigmin içermeyen gruplarda ve 10^8 , 5×10^8 ve 10^7 ve 5×10^7 M konsantrasyonlarında fizostigmin içeren gruplarda olmak üzere tek doz tekniği ve kümülatif teknik kullanılarak yapılmış. Oluşan kasılma ve gevşemeler değerlendirilmiştir.

Bulgular: Tek doz asetilkolin uygulamalarında intrinsek tonus üzerine ek bir kasılma elde edilmiş ve bu kasılma kararlılığını korumuştur. Kümülatif tekniğin uygulandığı deneylerde asetilkolinin sebep olduğu kasılma konsantrasyona bağımlı olarak artış göstermiştir. Fizostigminli ortamlarda ise intrinsek tonus üzerine gelişen asetilkolinin yol açtığı kasılmalar kararlılığını koruyamamıştır. Kümülatif asetilkolin uygulamalarının yapıldığı fizostigminli ortam deneylerinde ise fizostigmin içermeyen ortamda yapılan asetilkolin uygulamalarına benzer sonuçlar elde edilmiş; ancak, kasılma boyları daha küçük bulunmuştur.

Sonuç: Otonom sinir sisteminin birçok nörotransmitterinden biri ve somatik sinir sisteminin tek nörotransmitteri olan asetilkolinin etki mekanizmalarının ortaya çıkarılması ile ilacın etkötör hücre ve / veya gangliyon hücreleri üzerindeki etki güçlerinin farklı olabileceğini ve bu farklılığın ortaya çıkabileceği söylenebilir. Ancak farkın gerçek nedeninin ortaya konulabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Asetilkolin, fizostigmin, intrinsek tonus

ABSTRACT

Objective: The effects of acetylcholine, a parasympathomimetic agent, and acetylcholine plus physostigmine were determined on intrinsic tone of the frog lung tissue.

Method : Acetylcholine was applied to the frog lung tissue *in vitro* at 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 M concentrations in the presence of physostigmine at 10^8 , 5×10^8 , 10^7 and 5×10^7 M concentrations and without physostigmine by using single or cumulative dose techniques. Isometric contractions and relaxations observed during the experiments were measured time- dependently.

Results : During the experiments in which single dose technique was used, acetylcholine caused an additional contraction on intrinsic tone while the contraction did not show any tendency to decrease in monitoring period. The experiments in which cumulative dose during technique was used, a dose-dependent increase was observed in acetylcholine induced contractions. On the other hand, in the presence of physostigmine, the tonus due to acetylcholine exerted a decline with time similar to those in the presence of physostigmine. However, the amplitude of the contractions caused by acetylcholine was smaller than those in the absence of physostigmine.

Conclusion: Acetylcholine, which is one of many neurotransmitters in the autonomic nervous system and the only neurotransmitter used in the somatic nervous system could have a different effect on effector cell and on ganglion. However further studies are necessary to show this.

Key Words: Acetylcholine, physostigmine, intrinsic tone.

GİRİŞ

Vücut fonksiyonlarını düzenleyen ve kontrol eden temel sistemler; sinir sistemi ve endokrin sistemidir. Bu iki sistemdeki temel farklılık, bilginin iletilme şeklindedir. Endokrin sistemde iletim, esas olarak kan dolaşımına salınan kimyasal maddelerle olur. Oysa sinir sisteminde sinir lifleri boyunca bir elektriksel iletim söz konusudur. Ancak sinir hücreleri arasındaki bu iletimde de sinir uçlarından salıverilen çok küçük miktarlardaki transmitter veya "nöromediyatör" adı verilen kimyasal maddeler rol alır. Salıverilen kimyasal aracı sinaps aralığını geçer ve özel reseptörlere bağlanarak sinir hücrelerini etkiler (1). Sinir ucu ile kontrol edilen organ hücresi arasında (nöroefektör kavşak) iletimi sağlayan kimyasal aracı, sempatik sistemde noradrenalin; parasempatik sistemde ise asetilkolin (ACh)'dir. O nedenle sempatik sisteme adrenerjik sistem, parasempatik sisteme de kolinerjik sistem adı verilir. Bu kimyasal araçlar, kendilerine özgü reseptörleri aktive ederek etkilerini gösterirler. Bu reseptörler de adrenerjik veya kolinerjik reseptörler adını alır. Adrenerjik reseptörler fonksiyonları bakımından alfa ve beta reseptörler olarak ikiye ayrılır. Kolinerjik reseptörler de nikotinik ve muskarinik reseptörler olarak gruplandırılır. Ancak kolinerjik sistemde sinir ucunun etkilediği efektör hücredeki reseptörler, genellikle muskarinik tiptedir. Asetilkolin, düz kaslar ve enterik sinir sistemi salgı hücrelerinde eksitator etki gösteren birincil transmitterdir (1, 2). Asetilkolin parasempatik ve kolinerjik sinirler üzerine etkili önemli bir nörotansmitter olmasına rağmen etkisi çok kısa sürdüğünden tedavide ilaç olarak pek kullanılmaz (3-5). Fizostigmin ise doğal olarak oluşan bir karbamattır ve tersier amin yapısındadır. Tedavide kullanımını Miyastenia Gravis hastalığı ile sınırlıdır (2). Vücutta etkisini asetilkolinesterazın substratı olarak gösteren fizostigminin oluşturduğu enzim-substrat bileşiği asetilkolinesterazı geçici olarak inhibe ederek kolinerjik aktivitenin artmasına sebep olur (1). Diğer taraftan kolinerjik reseptörlere bağlanarak asetilkolinin etkilerini taklit eden karbakol ve betanekol gibi sentetik esterler vardır. Karbakol, hem muska-

rinik hem de nikotonik etkiler gösteren bir maddedir (6).

Tatlı su kurbağası (*Amfibia*)'nın, akciğer dokusunda asetilkolinin, fizostigmin içeren ve içermeyen ortamlarda oluşturduğu cevaplar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu çalışmada, elde edilen verilerle, vücutta çok önemli bir nörotansmitter olan asetilkolinin etkilerinin efektör hücre ve / veya gangliyon hücreleri üzerindeki etki güçlerinin ortaya konulması ve ileri çalışmalara katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanı

Çalışmada ağırlıkları 20 ± 5 g olan tatlı su kurbağası kullanılmıştır. Kurbağa gazlı bez ile yakalanarak içinde eter emdirilmiş pamuk bulunan bir kavanoza konularak uyutulmuştur. Makas ile gözlerin birleştiği çizginin arkasından kesilerek kurbağalar dekapite edilmiştir (7). Daha sonra, sırt ortasındaki vertebral kanala stile sokularak *medulla spinalis* harap edilmiştir.

Organ Banyosu Çalışmaları

Sağ ve sol akciğerler bütün olarak çıkarılmış, akciğerler, Ringer solüsyonu (RS) (102.5 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1.19 mM $NaHCO_3$ ve 2.77 mM Glukoz) içerisine alınmıştır. Sağ ve sol akciğerlerden uzunlamasına alınan şeritler ($1,52$ cm), sıcaklığı 25 °C de sabit tutulan ve sürekli oksijen (% 95 O_2 ; % 5 CO_2) verilen organ banyosuna konulmuştur (7). Şeritlere, $0,5$ g tansiyon uygulanmış ve Ringer solüsyonunda üç saat inkübasyon sonunda oluşan intrensek tonus 10 dk süre ile kaydedilmiştir (7). Organ şeritlerinin sebep olduğu izotonik kasılmalar kimograf ile 810 kez büyütülerek kaydedilmiştir.

Asetilkolin ve Fizostigmin Uygulamaları

Tek doz Asetilkolin uygulamaları 10^{-6} ($n=6$), 10^{-5} ($n=7$), 10^{-4} ($n=7$), 10^{-3} ($n=7$) M konsantrasyonlarında, kümülatif uygulamalar ise fizostigminsiz ve 10^{-8} , 5×10^{-8} ve 10^{-7} ve 5×10^{-7} M konsantrasyonlarında fizostigmin içeren ortamlarda yapılmıştır. Bunun sonunda, asetilkolinin meydana getirdiği kasılmalar ve gevşemeler kaydedilmiştir.

Her asetilkolin konsantrasyonu için ayrı bir grup oluşturulmuştur. Uygulamayı takiben organ şeritleri normal Ringer ile yıkanmış ve bir saat süresince tonusdaki düzleme izlenmiştir. İkinci grupta ise fizostigminli ortamlarda kümülatif asetilkolin uygulamalarının etkisi gözlenmiştir. Her bir konsantrasyonun temas süresi 15 dk olacak şekilde ortama sırasıyla 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M konsantrasyonlarında asetilkolin ilave edilmiştir.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Tek ve kümülatif doz uygulama tekniği ile elde edilen intrensek tonus cevapları Adıgüzel (8) tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak değerlendirilmiştir. Kümülatif tekniğin kullanıldığı deney gruplarında, her dozun 15. dakikasında oluşan intrensek tonus ölçümleri mm olarak ifade edilmiştir. Her bir konsantrasyondaki veriler $X_1 - X_2$, $X_2 - X_1$ ve $X_3 - X_2$ formülü ile oluşan kasılma ve gevşemeler Adıgüzel (8) tarafından tanımlanan ölçüte uygun olarak belirlenmiştir.

İstatistiksel Analiz

Ölçümlerde elde edilen değerler mm olarak ifade edilmiştir. Çalışmada, tek doz ACh uygulamasından elde edilen gevşeme/kasılma değerleri ile fizostigminli ortamda farklı konsantrasyondaki asetilkolin uygulamasından elde edilen gevşeme/kasılma değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında iki yönlü tekrarlı ölçümlü varyans analizi (two-way repeated measure ANOVA) kullanılmıştır. Burada ölçülen gevşeme ve kasılma değerleri için farklı dozların, sürenin, ayrıca doz ile sürenin birlikte etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı araştırılmıştır.

Fizostigminli ortamda her bir farklı konsantrasyonda ölçülen değerlerin, kontrol grubu olarak kabul edilen tek doz ACh uygulamasına göre anlamlı bulunan ortalama farklılıkları, ileri karşılaştırma (post hoc) testi olan Dunnett testi ile araştırılmıştır. Ayrıca ortalama gevşeme değerleri açısından farklılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunan zaman dilimleri, LSD (Limiting Dose for Stimulation) testi ile irdelenmiştir. Çalışmada $p < 0.01$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel de-

ğerlendirmede SPSS istatistik paket programı kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmada toplam 35 su kurbağası kullanılmış ve kurbağalar gruplara rasgele olarak dağıtılmıştır. Çalışmanın istatistiksel olarak değerlendirmesinde tercih edilen iki yönlü tekrarlı ölçümlü varyans analizinin uygulanması için öncelikle verilerin normal dağılıma uyumu incelenmiş ve küresellik (sphericity) varsayımı da mauchly küresellik testi ile irdelenmiştir.

Asetilkolinin Etkisi

Tek doz asetilkolin ile fizostigminli ortamda 10^{-6} M konsantrasyondaki asetilkolin uygulamalarının farklı zaman dilimlerinde hesaplanan ortalama gevşeme değerleri (standart sapma) Tablo 1'de verilmiştir. Bu serideki tüm deneylerde asetilkoline bağlı kasılmalar maksimuma ulaştıktan sonra 20 dakikalık izleme süresince zamanla orantılı bir azalma eğilimi gözlenmiştir. Asetilkolin uygulamasının 20. dakikasında preparatın normal kurbağa Ringer solüsyonu ile yıkanması tüm şeritlerde gevşemeye neden olmuştur (Tablo 1). Bunun sonucunda preparat tonusunun, başlangıçta fizostigminli ortamda intrensek tonusun altına indiği görülmüştür. Zaman dilimleri açısından ortalama gevşeme değerleri arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0.01$). Farklılığı yaratan ortalamaların hangi zaman dilimine ait olduğunun incelenmesinde, LSD testi kullanılmıştır. Test sonucunda, birinci dakikaya ait 4.28 mm olan ortalama gevşeme değerinin, diğer zaman dilimlerde elde edilen ortalama ölçümlerden farklı olduğu görülmüştür. Ayrıca, Tablo 1'in alt satırında yer alan ortalamalara göre, gevşeme miktarının 10. dakikadan itibaren arttığı, 40 dakikadan sonra ise, hafif bir düşüşe geçtiği söylenebilir. Çalışmada, dozlar açısından ortalama farklar da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Burada, kontrol grubu olarak ele alınan 10^{-6} M asetilkolin konsantrasyonuna göre, farklılığı yaratan dozun araştırılmasında, Dunnett testi uygulanmıştır. Elde edilen verilerden istatistiksel olarak tek anlamlı fark, 10^{-8} M fizostigmin

Tablo 1. Tek doz asetilkolin ile fizostigminli ortamda 10^{-6} M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasındaki gevşemelerin zamana göre seyri

UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE GEVŞEME ÖLÇÜMLERİ (mm)							ORTALAMA GEVŞEME (mm)
	1	10	20	30	40	50	60	
ACh- 10^{-6} (n=7)	7.17 (0.16)**	12.67 (0.17)	13.33 (0.17)	12.33 (0.23)	13.31 (0.12)	12.16 (0.24)	13.05 (0.12)	12.005
Fiz- 10^{-8} (n=7)	2.78 (0.56)	8.28 (0.89)	9.28 (0.55)	9.28 (0.60)	9.71 (0.63)	8.85 (0.41)	8.85 (0.43)	8.150*
Fiz- 5×10^{-8} (n=6)	2.98 (0.34)	10.66 (0.64)	14.66 (0.88)	14.80 (0.62)	14.52 (0.42)	12.66 (0.64)	12.06 (0.80)	11.763
Fiz- 10^{-7} (n=6)	5.33 (0.65)	12.16 (0.55)	13.83 (0.52)	13.66 (0.53)	13.16 (0.66)	12.33 (0.85)	11.33 (0.76)	11.690
Fiz- 5×10^{-7} (n=6)	3.16 (0.58)	16.16 (0.81)	13.83 (0.52)	14.83 (0.51)	13.53 (0.65)	13.83 (0.58)	13.66 (0.62)	12.719
ORTALAMA GEVŞEME (mm)	4.28	12.08	12.98	12.98	12.84	11.96	11.79	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma

konsantrasyonu ile kontrol grubu arasında gözlenmiştir. Doz ve sürenin birlikte etkileşimi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$).

Diğer taraftan, tek doz asetilkolin ile fizostigminli ortamda 10^{-5} M konsantrasyonundaki asetilkolin uygulamalarının farklı zaman dilimlerinde hesaplanan ortalama gevşeme değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Burada 20. dakika ile 40. dakikadaki ölçümler dışında diğer tüm ikili zaman dilimlerine ait ölçümlerde ortalama farklar anlamlı çıkmıştır ($p < 0.01$). Dozlar açısından ortalama farklar da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Yapılan ileri karşılaştırmalar neticesinde, ortalama dozların tümünün kontrol grubundan farklı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, doz ve sürenin birlikte etkileşimi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). 10^{-5} M asetilkolin ile gözlenen bulgulara benzer şekilde en küçük kasılma en yüksek konsantrasyonda fizostigmin (5×10^{-7} M) içeren ortamda gözlenmiştir. Bu deneysel serilerde kullanılan tüm şeritlerde asetilkoline bağlı kasılmalar maksimuma ulaştıktan sonra azalma eğilimi göstermiştir. Yirminci dakikada Ringer solüsyonu ile ya-

pılan yıkama, şeritlerde gevşemeye neden olmuştur (Tablo 2).

Tek doz asetilkolin ile fizostigminli ortamda 10^{-4} M konsantrasyonundaki asetilkolin uygulamalarının zaman dilimleri açısından ortalama gevşeme değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Burada, uygulanan ikili karşılaştırmalar sonucunda 10., 40. ve 50. dakikalara ait ölçümlerin benzer olduğu, bunun dışındaki zaman dilimlerine ait ortalama değerlerin farklı olduğu görülmüştür (Tablo 3). Dozlar açısından ortalama farklar da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Burada Dunnett testine göre, fizostigminli ortamda 10^{-4} M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasından elde edilen ortalama gevşemelerin tümünün kontrol grubuna ait ortalama değerden farklı olduğu söylenebilir. Doz ve sürenin birlikte etkileşimi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Tüm deneylerde gelişen bu gevşeme sonucu şeritlerin tonusu fizostigminli ortamda başlangıçta oluşan intrensek tonüsün altına indiği görülmüştür.

Fizostigminli ortamda 10^{-3} M konsantrasyonundaki asetilkolin uygulamalarının farklı zaman dilimlerin-

Tablo 2. Tek doz asetilkolin ile Fizostigminli ortamda 10^5 M konsantrasyonundaki asetilkolin uygulamalarının farklı zaman dilimlerinde hesaplanan ortalama gevşeme değerleri

UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE GEVŞEME ÖLÇÜMLERİ (mm)							ORTALAMA GEVŞEME (mm)
	1	10	20	30	40	50	60	
ACh- 10^5 (n=7)	5.07 (0.25)**	6.28 (0.22)	6.57 (0.18)	6.71 (0.22)	7.01 (0.24)	7.14 (0.19)	6.85 (0.19)	6.522
Fiz- 10^8 (n=7)	3.98 (0.64)	12.33 (0.69)	15.66 (0.75)	18.16 (1.07)	17.66 (0.75)	17.08 (0.92)	16.33 (1.15)	14.462*
Fiz- 5×10^8 (n=6)	5.04 (0.81)	12.57 (0.95)	15.71 (1.15)	15.42 (1.14)	15.01 (1.34)	14.42 (1.68)	14.42 (1.68)	13.233*
Fiz- 10^7 (n=6)	8.06 (0.89)	18.42 (1.32)	19.29 (1.03)	18.71 (1.27)	18.43 (0.85)	17.43 (1.26)	17.57 (1.19)	16.845*
Fiz- 5×10^7 (n=6)	10.14 (0.87)	19.29 (0.64)	20.01 (0.75)	19.57 (0.97)	19.09 (1.25)	18.43 (0.73)	17.57 (1.19)	17.729*
ORTALAMA GEVŞEME (mm)	6.46	13.781	15.450	15.719	15.442	14.902	14.552	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma

de hesaplanan ortalama gevşeme değerleri Tablo 4'de verilmiştir.

Zaman dilimleri açısından ortalama gevşeme değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Burada, 10^4 M konsantrasyonundaki asetilkolin, zaman dilimlerinin her birinde hesaplanan ortalama gevşeme değerleri 10^3 M konsantrasyonundaki asetilkolin uygulamasından elde edilen ortalama gevşeme değerlerinden daha küçük olduğu görülmüştür (Tablo 3, 4). Uygulanan ikili karşılaştırmalar sonucunda 40. ve 50. dakikalara ait ölçümlerin istatistiksel olarak aynı olduğu, bunun dışındaki zaman dilimlerine ait ortalama değerlerin tümünün farklı olduğu görülmüştür. Dozlar açısından ortalama farklar da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Tablo 4'ün son kolonunda verilen ortalama değerlere bakıldığında, 10^4 M asetilkolin konsantrasyonu ile 10^7 ve 5×10^8 M fizostigmin uygulamasındaki ortalama dozların yakın değerler olarak çıkmasına rağmen, Dunnett testine göre, fizostigminli ortamda 10^3 M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasından elde edilen ortalama gevşemelerin tümünün kontrol grubuna ait ortalama değerden farklı olduğu istatistiksel

olarak saptanmıştır ($p < 0.01$). Doz ve sürenin birlikte etkileşimi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$).

Tek doz tekniğinin uygulandığı bütün asetilkolin konsantrasyonları intrensek tonus üzerinde ek bir kasılmaya sebep olmuş ve bu kasılma 20 dakikalık izleme süresince kararlılığını korumuştur (Tablo 5; Şekil 1, 2).

Farklı fizostigminli ortamlarda tek doz 10^6 M konsantrasyonundaki asetilkolin uygulamalarının farklı zaman dilimlerinde hesaplanan ortalama kasılma değerleri (s.sapma) Tablo 5'de verilmiştir. Zaman dilimleri açısından ortalama gevşeme değerleri arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0.01$). LSD test sonucunda, sadece 3. ve 7. dakikada ölçülen ortalama kasılma değerleri farksız çıkmış; diğer tüm ikili farklar anlamlı bulunmuştur. Ayrıca, Tablo 5'in alt satırında yer alan ortalamalardan kasılma miktarının 7. dakikaya dek artışta olduğu ve 9. dakikadan itibaren ise düşüşe geçtiği söylenebilir. Çalışmada, dozlar açısından ortalama farklar da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Burada, en düşük ortalama değer; 10^8 M fizostigminli ortamda elde

Tablo 3. Tek doz asetilkolin ile fizostigminli ortamda 10^{-4} M konsantrasyonundaki asetilkolin uygulamalarının farklı zaman dilimlerinde hesaplanan ortalama gevşeme değerleri

UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE GEVŞEME ÖLÇÜMLERİ (mm)							ORTALAMA GEVŞEME (mm)
	1	10	20	30	40	50	60	
ACh- 10^{-4} (n=7)	16.01 (0.33)**	16.86 (0.13)	16.01 (0.17)	15.50 (0.46)	15.80 (0.12)	16.01 (0.11)	16.16 (0.01)	16.063
Fiz- 10^{-8} (n=7)	12.01 (0.71)	27.71 (0.92)	26.57 (1.14)	27.14 (0.79)	26.14 (1.10)	25.43 (0.93)	24.43 (0.75)	24.206*
Fiz- 5×10^{-8} (n=6)	14.32 (0.50)	29.85 (0.71)	35.52 (1.11)	35.97 (0.39)	35.58 (1.34)	35.88 (0.81)	35.97 (0.99)	31.855*
Fiz- 10^{-7} (n=6)	17.29 (0.76)	38.10 (0.76)	45.20 (0.73)	40.00 (0.79)	35.50 (0.77)	34.10 (0.74)	37.44 (0.76)	35.376*
Fiz- 5×10^{-7} (n=6)	16.50 (0.71)	25.50 (0.70)	25.60 (0.65)	25.30 (0.63)	25.30 (0.73)	26.60 (0.59)	25.10 (0.61)	24.271*
ORTALAMA GEVŞEME (mm)	15.243	27.604	29.780	28.782	27.665	27.605	27.799	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma

Tablo 4. Fizostigminli ortamda 10^{-3} M konsantrasyonda tek doz asetilkolin uygulamasındaki gevşemelerin zamana göre seyri

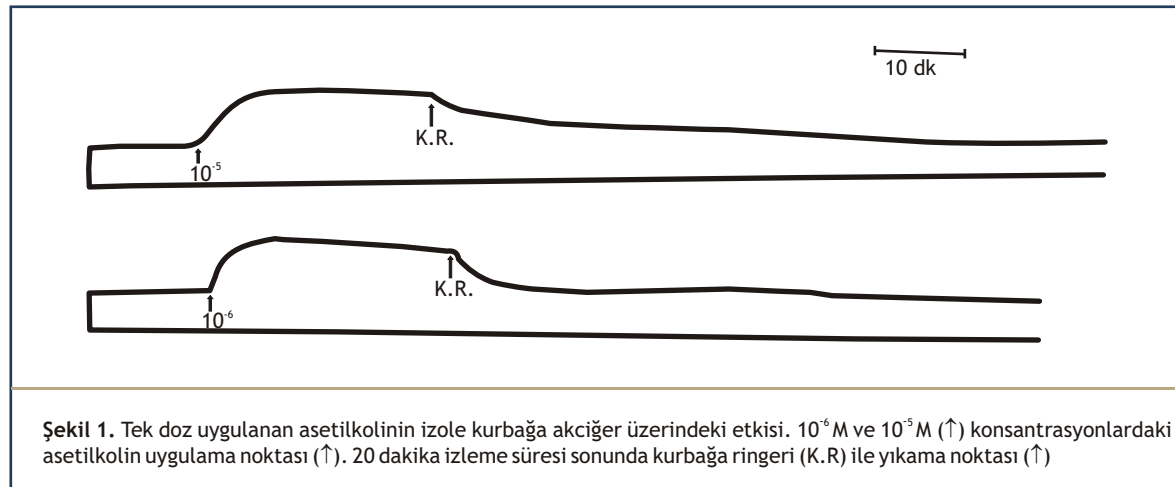
UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE GEVŞEME ÖLÇÜMLERİ (mm)							ORTALAMA GEVŞEME (mm)
	1	10	20	30	40	50	60	
ACh- 10^{-3} (n=7)	12.11 (0.32)**	14.33 (0.14)	13.66 (0.21)	12.51 (0.31)	12.87 (0.28)	13.33 (0.20)	14.01 (0.19)	13.261
Fiz- 10^{-8} (n=7)	17.70 (0.65)	24.70 (0.64)	22.43 (0.69)	20.29 (0.59)	17.84 (0.53)	19.57 (0.56)	20.29 (0.60)	20.402*
Fiz- 5×10^{-8} (n=6)	14.85 (0.97)	25.57 (0.60)	25.29 (0.60)	23.00 (0.60)	21.71 (0.68)	20.43 (0.54)	20.29 (0.60)	21.592*
Fiz- 10^{-7} (n=6)	13.10 (0.60)	16.17 (0.55)	17.33 (0.53)	16.00 (0.47)	15.33 (0.54)	13.67 (0.59)	13.50 (0.49)	15.014*
Fiz- 5×10^{-7} (n=6)	11.17 (0.49)	16.50 (0.66)	17.00 (0.47)	16.50 (0.66)	15.50 (0.49)	16.17 (0.57)	16.50 (0.77)	15.619*
ORTALAMA GEVŞEME (mm)	13.788	19.453	19.141	17.660	16.652	16.632	16.917	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma

Tablo 5. Fizostigminli ortamlarda tek doz 10^6 M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasındaki kasılmaların zamana göre seyri

UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE KASILMA ÖLÇÜMLERİ (mm)									ORTALAMA KASILMA (mm)
	1	3	5	7	9	9	12	16	20	
ACh- 10^6 (n=7)	7.32 (0.08)**	12.82 (0.08)	13.22 (0.12)	13.33 (0.16)	13.32 (0.12)	13.32 (0.12)	11.82 (0.20)	10.03 (0.15)	10.17 (0.08)	11.370
Fiz- 10^8 (n=7)	5.14 (0.05)	9.71 (0.29)	10.34 (0.18)	10.41 (0.25)	10.14 (0.08)	10.14 (0.08)	8.71 (0.13)	7.57 (0.10)	6.14 (0.36)	8.338*
Fiz- 5×10^8 (n=6)	9.52 (0.08)	16.80 (0.32)	17.78 (0.32)	16.37 (0.23)	14.52 (0.26)	14.52 (0.26)	12.17 (0.12)	10.63 (0.26)	9.32 (0.17)	12.991*
Fiz- 10^7 (n=6)	8.83 (0.35)	16.08 (0.04)	16.65 (0.51)	15.57 (0.41)	14.08 (0.08)	14.08 (0.08)	11.17 (0.30)	9.77 (0.32)	6.52 (0.33)	11.856*
Fiz- 5×10^7 (n=6)	9.17 (0.25)	18.52 (0.44)	19.17 (0.39)	18.17 (0.49)	16.17 (0.62)	16.17 (0.62)	13.02 (0.15)	11.03 (0.31)	10.33 (0.22)	14.020*
ORTALAMA KASILMA (mm)	4.28	14.786	15.432	14.770	13.645	13.645	11.376	9.808	8.495	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma



Şekil 1. Tek doz uygulanan asetilkolinin izole kurbağa akciğer üzerindeki etkisi. 10^6 M ve 10^5 M (↑) konsantrasyonlardaki asetilkolin uygulama noktası (↑). 20 dakika izleme süresi sonunda kurbağa ringeri (K.R) ile yıkama noktası (↑)

edilmiştir. 5×10^8 M ve 10^7 M fizostigminli ortamlarda elde edilen değerler 10^6 M konsantrasyondaki kasılma değerlerine yakın olsa da, Dunnett testine göre, fizostigminli ortamda 10^6 M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasından elde edilen ortalama kasılma değerlerinin tümünün kontrol grubuna ait ortalama değerden farklı olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır ($p < 0.01$). Ayrıca, doz ve sürenin birlikte etkileşimi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$).

Fizostigminli ortamlarda tek doz 10^5 M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasındaki kasılmaların zaman dilimleri açısından ortalama kasılma değerleri arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.01$). LSD test sonucunda, sadece 1. ve 9. dakikada ölçülen ortalama kasılma değerleri farksız çıkmış ($p = 0.017$); diğer tüm ikili farklar anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Çalışmada, dozlar açısından ortalama farklar da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Dunnett testine göre, fizostig-

Tablo 6. Fizostigminli ortamlarda tek doz 10^5 M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasındaki kasılmaların zamana göre seyri

UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE KASILMA ÖLÇÜMLERİ (mm)									ORTALAMA GEVŞEME (mm)
	1	3	5	7	9	12	16	18	20	
ACh- 10^5 (n=7)	4.57 (0.11)**	4.01 (0.11)	7.61 (0.12)	7.61 (0.12)	7.71 (0.18)	6.36 (2.81)	7.29 (0.13)	2.29 (0.13)	7.03 (0.13)	6.614
Fiz- 10^8 (n=7)	10.58 (0.42)	17.02 (0.53)	18.33 (1.14)	18.03 (0.92)	15.83 (0.83)	9.83 (0.65)	10.67 (0.66)	10.37 (0.88)	10.02 (0.77)	14.014*
Fiz- 5×10^8 (n=6)	9.54 (0.51)	16.81 (0.96)	17.83 (1.03)	16.36 (1.06)	14.59 (1.10)	12.16 (0.90)	10.60 (0.60)	9.84 (0.86)	9.36 (0.68)	13.569*
Fiz- 10^7 (n=6)	8.83 (0.65)	16.06 (0.44)	16.63 (0.94)	15.54 (0.69)	14.04 (1.14)	11.16 (1.01)	9.74 (0.90)	8.07 (0.58)	6.59 (0.51)	12.411*
Fiz- 5×10^7 (n=6)	9.16 (0.65)	18.54 (1.39)	19.16 (1.27)	18.16 (0.76)	16.16 (0.74)	13.07 (1.08)	11.09 (0.79)	10.59 (0.63)	10.30 (0.66)	14.584*
ORTALAMA KASILMA (mm)	8.537	14.489	15.912	15.141	13.667	10.515	9.876	8.230	8.658	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma

fizostigmin (5×10^{-7} M) içeren ortamda gözlenmiştir. Bu deneysel serilerde kullanılan tüm şeritlerde asetilkoline bağlı kasılmalar maksimuma ulaştıktan sonra azalma eğilimi göstermiştir. Yirminci dakikada kurbağa Ringer solüsyonu ile yapılan yıkama, şeritlerde gevşemeye neden olmuştur (Tablo 8). Tüm deneylerde gelişen bu gevşeme sonucu şeritlerin tonusunun, fizostigminli ortamda başlangıçta oluşan intrensek tonüsün altına indiği görülmüştür. Fizostigmin içeren ortamda 10^3 M asetilkolin, tüm deney serilerinde uygulamanın beşinci veya yedinci dakikalarında maksimuma ulaşan bir kasılmaya neden olmuştur (Tablo 8). En yüksek fizostigmin konsantrasyonu (5×10^{-7} M) içeren ortamda 10^3 M asetilkoline bağlı kasılma boyu, daha düşük konsantrasyonlarda fizostigmin içeren ortamlarda gözlenenlere göre daha az olarak bulunmuştur. Fizostigminli ortamda kümülatif asetilkolin uygulamalarının yapıldığı deney serilerinde (Şekil 3) fizostigmin içermeyen ortamda yapılan asetilkolin uygulamalarına benzer sonuçlar elde edilmesine karşın, kasılma boyları küçük bulunmuştur. 10^8 M fizostigmin içeren ortamlara kümülatif asetilkolin uygulaması, konsantrasyona

bağımlı kasılmalara neden olmuştur. $10^6, 10^5, 10^4$ ve 10^3 M asetilkolinin sebep olduğu ortalama kasılma boyları sırası ile $7 \pm 0,61$; $12 \pm 1,9$; $16,57 \pm 2,68$; $17,8 \pm 2,78$ mm olarak belirlenmiştir.

Kasılma maksimuma ulaştıktan sonra hiçbir şekilde gevşeme tarzında cevap gelişmemiştir. X_1-X , X_2-X_1 ve X_3-X_2 parametreleri için hiç bir asetilkolin konsantrasyonunda negatif değer gözlenmemiştir. 5×10^{-8} M fizostigmin içeren ortamda kümülatif asetilkolin uygulaması ile elde edilen sonuçlar daha düşük konsantrasyondaki fizostigmin içeren ortamdaki sonuçlara benzerlik göstermiştir. Kasılma boylarında, konsantrasyona bağımlı bir artışın olduğu izlenmiştir.

10^6 , 10^5 , 10^4 ve 10^3 M asetilkolin konsantrasyonlarının sebep olduğu kasılmalar sırasıyla; 3.71 ± 0.89 , 6.85 ± 0.98 , 1.28 ± 1.78 ve 12.42 ± 1.96 mm olarak kaydedilmiştir. Hiçbir şeritte kasılma boyu maksimuma ulaştıktan sonra gevşeme tarzında bir yanıt görülmemiştir, " X_1-X , X_2-X_1 ve X_3-X_2 " parametreleri için hiçbir konsantrasyonlarda negatif değer görülmezken, 10^7 M fizostigmin içeren ortamda kümülatif asetilkolin uygulamasının, yine konsantrasyona bağımlı olarak artan kasılmalara yol

Tablo 7. Fizostigminli ortamlarda tek doz 10^{-4} M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasındaki kasılmaların zamana göre seyri

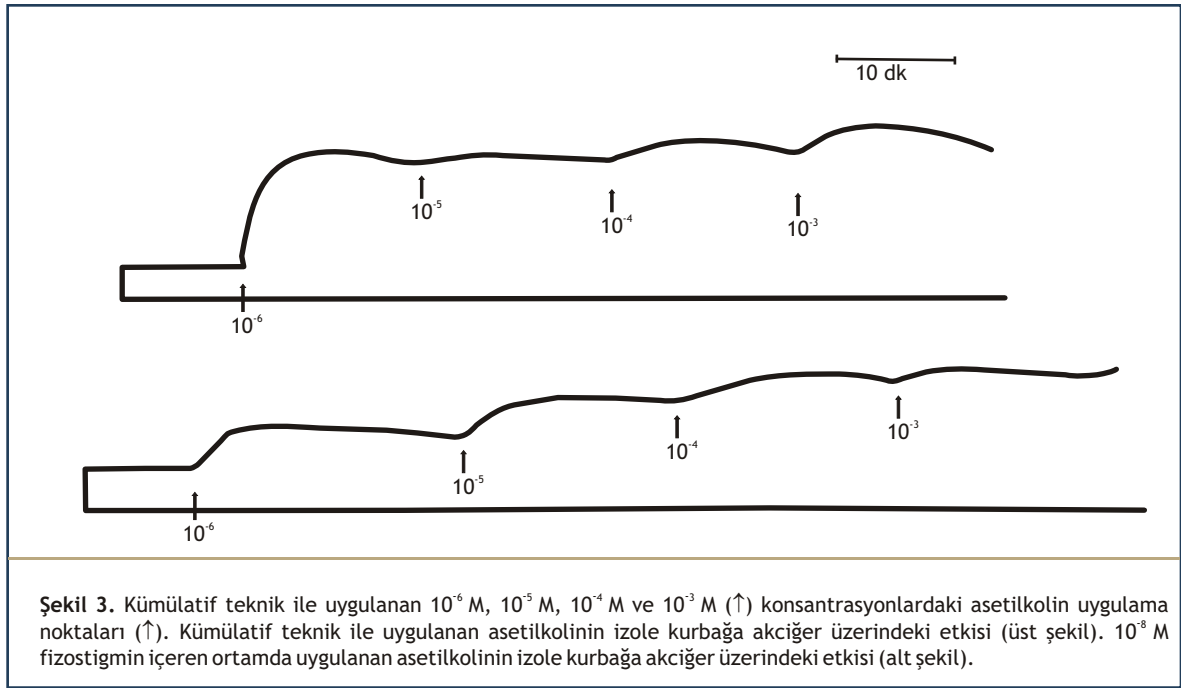
UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE KASILMA ÖLÇÜMLERİ (mm)									ORTALAMA GEVŞEME (mm)
	1	3	5	7	9	12	16	18	20	
ACh- 10^{-4} (n=7)	8.71 (0.13)**	12.81 (0.09)	14.44 (0.21)	14.83 (0.16)	15.08 (0.18)	14.51 (0.11)	14.51 (0.11)	14.21 (0.09)	14.23 (0.08)	13.706
Fiz- 10^{-8} (n=7)	13.09 (0.64)	18.29 (0.64)	18.70 (0.46)	18.70 (0.46)	18.43 (0.53)	17.86 (0.54)	17.37 (0.64)	16.44 (0.37)	16.14 (0.50)	17.224*
Fiz- 5×10^{-8} (n=6)	13.32 (0.53)	20.33 (1.59)	21.83 (0.29)	21.82 (0.31)	19.25 (1.27)	16.38 (0.88)	14.57 (1.09)	13.50 (0.53)	12.17 (0.74)	17.019*
Fiz- 10^{-7} (n=6)	11.39 (0.80)	15.77 (0.74)	16.04 (0.75)	15.67 (0.63)	14.86 (0.82)	13.39 (0.55)	12.30 (0.56)	11.76 (0.89)	10.99 (0.67)	13.573
Fiz- 5×10^{-7} (n=6)	5.22± 0.75	7.82 (2.72)	9.55 (0.52)	9.80 (0.60)	9.30 (1.11)	8.32 (1.11)	7.98 (0.60)	7.35 (0.73)	6.67 (0.58)	8.00*
ORTALAMA KASILMA (mm)	10.344	15.004	16.114	16.163	15.384	14.091	13.347	12.653	120.38	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma

Tablo 8. Fizostigminli ortamlarda tek doz 10^{-3} M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasındaki kasılmaların zamana göre seyri

UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE KASILMA ÖLÇÜMLERİ (mm)									ORTALAMA KASILMA (mm)
	1	3	5	7	9	12	16	18	20	
ACh- 10^{-3} (n=7)	9.03 (0.13)**	13.31 (0.30)	14.09 (0.18)	14.01 (0.15)	14 (0.13)	14.03 (0.01)	13.81 (0.10)	13.51 (0.09)	13.31 (0.18)	13.235
Fiz- 10^{-8} (n=7)	9.11 (0.60)	13.31 (0.86)	13.86 (0.71)	13.99 (1.21)	12.70 (0.51)	13.03 (1.14)	12.43 (0.85)	12.17 (0.91)	11.43 (0.57)	12.448
Fiz- 5×10^{-8} (n=6)	12.43 (0.89)	17.71 (1.54)	19.14 (1.29)	18.81 (0.74)	17.86 (0.75)	16.49 (0.73)	16.46 (0.78)	14.41 (0.73)	14.59 (0.63)	13.569*
Fiz- 10^{-7} (n=6)	8.30 (0.63)	11.83 (0.92)	12.31 (0.85)	12.53 (0.73)	12.23 (0.69)	10.82 (0.66)	9.82 (0.68)	9.32 (0.79)	8.82 (0.88)	16.433*
Fiz- 5×10^{-7} (n=6)	5.35 0.81	9.00 (0.61)	9.50 (1.00)	9.67 (0.73)	9.67 (0.80)	8.30 (0.61)	8.00 (0.83)	7.50 (0.76)	7.00 (0.66)	8.220*
ORTALAMA KASILMA (mm)	8.844	13.035	13.780	13.803	13.291	12.532	12.103	11.383	11.029	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma



açığı görülmüştür. Kasılma boyları, düşük asetilkolin konsantrasyonundan yük-sek konsantrasyona doğru sırası ile 4.16 ± 0.3 , 6.33 ± 0.95 , 10.66 ± 0.91 ve 12.83 ± 1.24 mm olarak tespit edilmiştir. Kasılma maksimuma ulaştıktan sonra gevşeme tarzında yanıt hiçbir şeritte gözlenmemiştir. X_1-X , X_2-X_1 ve X_3-X_2 parametrelerinde negatif değer tespit edilmemiştir. 5×10^{-7} M fizostigmin içeren ortamda kümülatif asetilkolin uygulaması, konsantrasyona bağımlı olarak artan kasılmalar oluşturmuştur. Ortalama kasılma boyları küçük asetilkolin konsantrasyonundan büyüğe doğru sırası ile 6.14 ± 0.85 , 7.8 ± 1.6 , 10.4 ± 2.05 , 11.4 ± 2.05 mm olarak bulunmuştur. Kasılma maksimuma ulaştıktan sonra sadece bir şeritte, 10^{-5} M asetilkolin konsantrasyonuna verilen cevapta gevşeme ve X_1-X parametresi için negatif değer saptanmıştır.

TARTIŞMA

Kurbağa akciğer şeritlerinde dengelenme periyodu sırasında ortaya çıkan tonus artışı daha önce yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir (7, 8). Karbakolün izole kurbağa akciğer şeritleri üzerine etkisi (8) ile bu çalışmadaki asetilkolin uygulamalarında

elde edilen sonuçlar, birbirine benzerlik göstermektedir. Asetilkolinin akciğer organ şeritleri üzerinde hâkim olan kasıcı etkisi efektör hücre membranındaki muskarinik resöptörlerin aktivasyonuna bağlı olabilir (9, 10). Bu etkinin doza bağımlılık göstermemesi, kullanılan en düşük asetilkolin konsantrasyonunda maksimum cevaba ulaşıldığını düşündürülebilir. Ancak, bir kolinesteraz inhibitörü olan fizostigminli (11) ortamda, 10^{-6} M asetilkoline verilen kasılma tarzındaki cevaplarda fizostigmin konsantrasyonlarına bağımlı anlamlı artışlar saptanmıştır, fakat kasılmaların maksimuma ulaştıktan sonra kararlılığını koruyamadığı gözlenmiştir. Bu durum asetilkolinin biyofazda kolinesteraz tarafından hızlı bir şekilde yıkılmasının, maksimum cevaba ulaşılmasında kısıtlayıcı bir faktör olabileceğine, ayrıca kontraktilden cevaptan sorumlu mekanizmalardan daha yavaş gelişen gevşetici bir mekanizmanın da aktive edildiğine işaret edebilir.

Fizostigminli ortamda asetilkoline bağlı kasılmaların kararlılığını koruyamamasının, başlangıçta oluşan intrinsek tonüsün *in vitro* koşullarda süreklilik göstermemesinden kaynaklandığını düşünmek mümkün değildir. Zira tek doz karbakol kullanılan de-

neylerde (8), preparat Ringer solüsyonu ile yıkandıktan sonra bir saatlik izleme süresince tonusun, başlangıçta gelişen intrinsek tonüsün altına inmediği bildirilmiştir (8). Bu gözlem, en azından deney süresince, intrinsek tonusta bir azalma olmadığını göstermiştir. Diğer yandan organ şeritlerinin fizostigmin içeren ortamdan normal Ringer solüsyonu içerisine alınması, tonusun başlangıçta gelişen intrinsek tonusun altına inmesine neden olmuştur.

Bu farklı durum başlangıçtan itibaren ortamda bulunan fizostigminin intrinsek tonusu daha belirgin hale getirdiğini düşündürmektedir. Fizostigminli ortamda, tek doz olarak uygulanan 10^{-5} M ve daha yüksek asetilkolin konsantrasyonlarına verilen kasılma tarzındaki cevaplar fizostigmin konsantrasyonlarına bağımlı olarak azalmıştır. Bu gözlem gevşetici mekanizmaların daha güçlü aktive edildiğini, dolayısı ile kontraktıl cevabın boyutlarında bir azalmaya sebep olduğunu düşündürmüştür. Fizostigminli ortamda, asetilkolinin kümülatif uygulandığı deneylerde de, tek doz tekniğinin uygulandığı deneylerdekilere benzer sonuçlar alınmıştır. Diğer taraftan karbakol uygulamalarından (8) farklı olarak X_2 - X_1 , X_3 - X_2 değerlerinde belirgin bir negatiflik saptanamamıştır. Bu durum karbakol ile asetilkolin arasındaki tek fark gibi gözükmektedir. Bu nedenle, her iki ilacın efektör hücre ve/veya gangliyon hücreleri üzerindeki etki güçlerinin farklı olabileceğini ve bu farklılığın ortaya çıkabileceği söylenebilir. Ancak farkın gerçek nedeninin ortaya konulabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Mycek M.J., Harvey R.A., Champe P.C., Otonomik Sinir Sistemine etkili İlaçlar. Lippincott's Illustrated Reviews Pharmacology. In Eds: Mycek M.J., Harvey R.A., Champe P.C. 1998; Chapter 2: 27-55.
2. Bertram G. Katzung, Basic and Clinical Pharmacology, 9. Baskı, Mc Graw Hill Education, Asia, International Edition 2004.
3. O'Rourke S.T., Flavahan N.A., Vanhout P.M., Characterization of muscarinic receptors in canine bronchial smooth muscle. *Eur J Pharmacol.*, 1987; 140: 117-20.
4. Campbell G., Halles C.J., Rogers D.C., Fine structural and cytochemical study of innervation of smooth muscle in an amphibian (*Bufo marinus*) lung before and after denervation. *Cell Tissue Res.* 1978; 194(3): 419-32.
5. Clague R.U., Eglen R.M., Strachan A.C., Whiting R.L., Action. of agonists and antagonists at muscarinic receptors present on. ileum and atria *in vitro*. *Br.J. Pharmacol.* 1985; 86(1):163-70.
6. Kayaalp S.O., Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 3. cilt, 5. Baskı, Feryal Matbaası, Ankara, 1990.
7. Öğülener N., Önder S., Atçı S., Göçmen C., Şirindirik E., Dikmen A., Baysal F., İzole kurbağa akciğer şeritleri ve izoprenalin. *Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi.* 1992.
8. Adıgüzel S., Karbakolün izole kurbağa akciğer şeritleri üzerindeki etkileri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi.* 2007; 64 (2) : 41-6.
9. Sheng, H., Ishii, K., Murad, F., Generation of an endothelium-derived relaxing factor-like substance in bovine tracheal smooth-muscle. *American Journal of Physiology.* 1991; 260 L 489 L493.
10. Tucker JF, Brave SR, Charalambous L, Hobbs AJ, Gibson A., L-N-nitro arginine. inhibits non-adrenergic non-cholinergic relaxations of guinea-pig isolated tracheal smooth muscle. *Br.J.Pharmacol.* 1990; 100: 663-4.
11. Taylor P., Anticholinesterase Agents. Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, A.F. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies, and P. Taylor, Eds., New York, NY: Pergamon Pres. 1990; 100-19.