

**KAPLUMBAĞA VENTRİKÜL ŞERİTLERİ ÜZERİNDE  
İZOPROTERENOLÜN ETKİSİ\***

Dr. Atilla DİKMEN\*\*\*

Dr. Firuz BAYSAL\*\*

Bu çalışmada, izole ventrikül şeritleri üzerinde izoproterenolün etkisi incelendi. Preparat daha önce tarif edilen metoda göre hazırlandı. Ringer solüsyonu içeren ve ısısı 30°C de sabit tutulan izole organ banyosuna asıldı. Bir çift platin elektrod arasına yerleştirilen dokuya elektriksel uyarı tatbik edildi. Kasılmalar izotonik levye aracılığı ile isli kâğıta yazdırıldı. İzoproterenol kümülatif doz tekniği ile banyo ortamına uygulandı (Son konsantrasyon olarak  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  M). İlk ilave genellikle doza bağımlı pozitif inotropik cevap meydana getirdi. Bu etkiye karşı ikinci üçüncü ve dördüncü uygulamalarda taşiflaksi gözlemlendi. Bazı şeritlerde ilk kümülatif ilaç uygulamasından sonra negatif inotropik etkiler gözlemlendi. Aynı şeritler Buzdolabında bir veya iki gece takriben +10°C de muhafaza edilmelerine rağmen yaşamaya devam ettiler ve ilaca yeniden cevap verdiler. İkinci ve üçüncü gün de kullanılan bu şeritlerde taşiflaksi yeniden gözlemlendi.

Dengeleşme safhasında praktolol ( $3.78 \times 10^{-6}$  veya  $3.78 \times 10^{-5}$  M) ile ön muamele dokunun ilaca karşı duyarlığında anlamlı bir değişme yapmadı. İkinci gün de şerit izoproterenole cevap vermeğe devam etti.

Beta - adrenerjik agonistlerin bronş genişletici etkilerine karşı taşiflaksinin geliştiği bilinmektedir. Bir beta-adrenerjik agonist olan izoproterenol ile yapılan çalışmalarda ilacın kardiyovasküler etkilerine karşı da duyarsızlama (desensitization) oluştuğuna dair deliller elde

\* Bu çalışma Ç.Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı'nda yapılmıştır.

\*\* Ç. Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı Başkanı, Profesör.

\*\*\* Ondokuzmayıs Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı yardımcı doçenti.

edilmiştir. Üç saat 30 µM izoproterenol ile ön muameleye tabi tutulan kedi yavrusunun atriumunda izoproterenolün kronotrop, inotrop ve adenilat siklazı uyarıcı etkilerinde azalma olduğu gözlenmiştir (7). Kobayda sağ atrium, trakea şeritleri ve perfüze akciğer üzerinde yapılan bir çalışmada ise taşiflaksi müşahade edilememiştir (11). Sıçan izole toraks acrtası şeritlerinde yüksek konsantrasyonda tekrarlanan izoproterenol uygulaması sonucu damar şeritlerinde gevşeme yerine kasılma tarzında cevap oluşmuştur (6).

Son zamanlarda beta -adrenerjik reseptör agonistlerine karşı beta -adrenerjik reseptörlerde gelişen duyarsızlama hücre düzeyinde ayrıntılı olarak araştırılmıştır. İnsan astrositoma hücrelerinde işaretli cisim kullanılmak suretiyle yürütülen çalışma bu olayda birden fazla aşamanın söz konusu olduğunu göstermiştir (12). Erken safhada ilacın reseptöre olan afinitesinde değişiklik olmamakta, fakat reseptör - ilaç kompleksi ile adenilat siklaz arasında kenetsizleme (uncoupling) ortaya çıkmaktadır. Bu durumda reseptör yoğunluğunda belirgin bir değişiklik yoktur. Duyarsızlamanın ileri safhası ise membrandaki reseptörlerin sitoplazma içine geçişi (internalization) ve ortama dökülmeleri nedeniyle, dansitelerinde azalma gözlenmektedir (4).

Bu bilgilerin ışığında çalışmamızın amacı;

1. İzoproterenolün ventrikül şeritleri üzerindeki etkisine karşı taşiflaksin gelişip gelişmediğini gözlemek,

Taşiflaksi oluştuğu takdirde,

2. Zaman faktörünün taşiflaksin düzelmesinde katkısı olup olmadığını araştırmak,

3. Beta -adrenerjik reseptör antagonisti ile şeritleri bir süre ön temasda bırakarak, taşiflaksin geciktirilip geciktirilemeyeceğini saptamaktı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

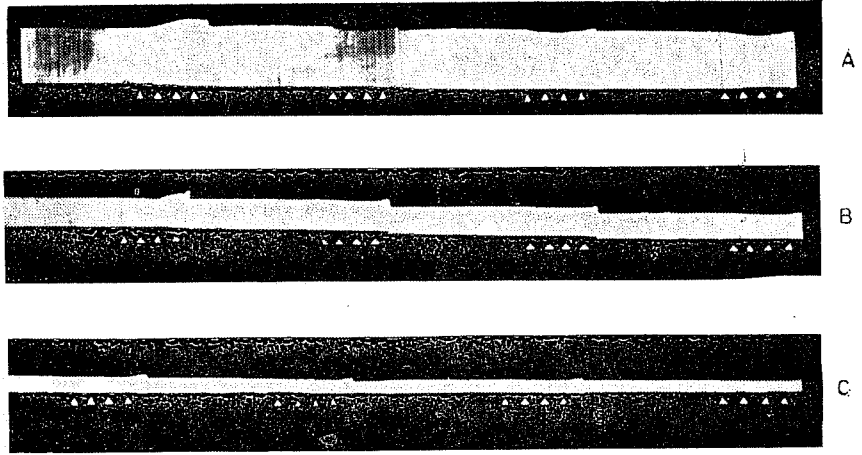
Her iki cinsten kara kaplumbağaları, deri altından 5 ml/kg % 25 lik uretan solüsyonu verilerek anestezi edildi. Daha önce tarif edilen bir yöntemle göre dış kabuğun ventral kısmı kesilerek açıldı (5). Kalp süratle çıkarıldı ve atrium dokusu ventrikülden ayrıldı. Ventrikülün ön ve arka yüzüne doğru horizontal olarak kesimler yapmak suretiyle 3-4 cm boyunda ve 0,3 cm eninde şeritler hazırlandı. Her hayvandan aynı anda hazırlanan iki şerit, ısı 30°C de sabit tutulan ve Ringer solüs-

yonu (NaCl 110, KCl 2.7, CaCl<sub>2</sub> 1.04, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05, MgCl<sub>2</sub> 0.1, NaHCO<sub>3</sub> 2.4 ve glukoz 11 mM) içeren iki ayrı banyo içine asıldı. Banyo ortamı devamlı olarak oksijenlendirilmekteydi. İki platin elektrot arasına yerleştirilen doku parçasına kare dalga şeklinde (9 mV, 1 — 2 ms, 0,75 Hz) elektriksel uyarı tatbik edildi. Cevaplar izotonik levye aracılığı ile isli kağıda yazdırıldı. İpteki gerginlik bir gram idi. Preparat banyo sıvısı içinde ve elektriksel uyarı altında iki saat dengeleşmeye bırakıldı. Bundan sonra banyo sıvısına sırası ile son konsantrasyon 10<sup>-11</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup> ve 10<sup>-8</sup> M olacak şekilde kümülatif İzoproterenol ilavesi yapıldı. Bu işlem birer saat ara ile dört defa tekrarlandı. İlacın her bir konsantrasyonu ile dokunun teması iki dakika idi. Dördüncü kümülatif izoproterenol uygulamasından sonra banyodan çıkarılan şerit, oksijenlendirilmiş Ringer solüsyonu içinde bir gece buz dolabında (takriben + 10°C) muhafaza edildi. Bu şekilde aynı doku parçası birbirini izleyen üç deney günü kullanılabilirdi. Bir başka deney gurubunda şeritlerin dengeleşmeye bırakıldığı banyo ortamı iki farklı konsantrasyonda (3.73 x 10<sup>-6</sup> veya 3.78 x 10<sup>-5</sup> M) praktolol içermekte idi. İki saat sonra doku normal solüsyon ile yıkandı. Yıkama işleminden 20 dakika sonra aynı tarzda kümülatif izoproterenol uygulamaları yapıldı. Bir gece buz dolabında muhafaza edilen aynı şeritlerde ikinci gün aynı deneyler tekrarlandı.

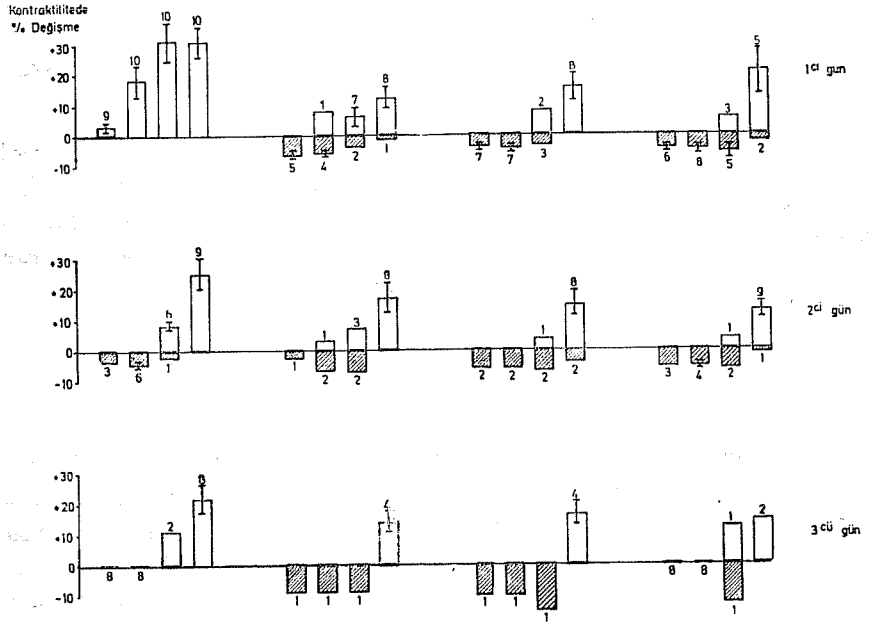
İzoproterenol (Starling - Wintrop) pH=3 olan distile su, praktolol (ICI) ise izopropil alkol içinde hazırlandı. İlaçsız ortamda şeritin kasılma boyu kontraktilitenin ölçüsü olarak kabul edildi. İlaç tatbikinden sonra meydana gelen değişiklikler bunun yüzdesi olarak ifade edildi. Sonuçlar Student t testi uygulanarak değerlendirildi.

## BULGULAR

İlk kümülatif izoproterenol uygulaması doza bağımlı pozitif inotropik etki hasil etti (Res. 1 A). Bunu izleyen ikinci, üçüncü ve dördüncü dozlarda gözlenen cevaplar ilk uygulama ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde küçüktü (P<0,05). Ayrıca ilk kümülatif ilaç tatbikinden sonra bazı şeritlerde negatif inotropik etkiler gözlemlendi. Son etkiler özellikle ilacın düşük dozlarında daha gelergin idi (Şek. 1). İkinci gün yapılan ilaç uygulamasında duyarlılığın bir ölçüde düzeldiği saptandı. Yine iki, üç ve dördüncü kümülatif dozlara alınan cevaplar ilk doza göre anlamlı olarak küçük bulundu (P<0.05). Preparat üçüncü gün de elektriksel uyarıya düzenli cevap vermeğe

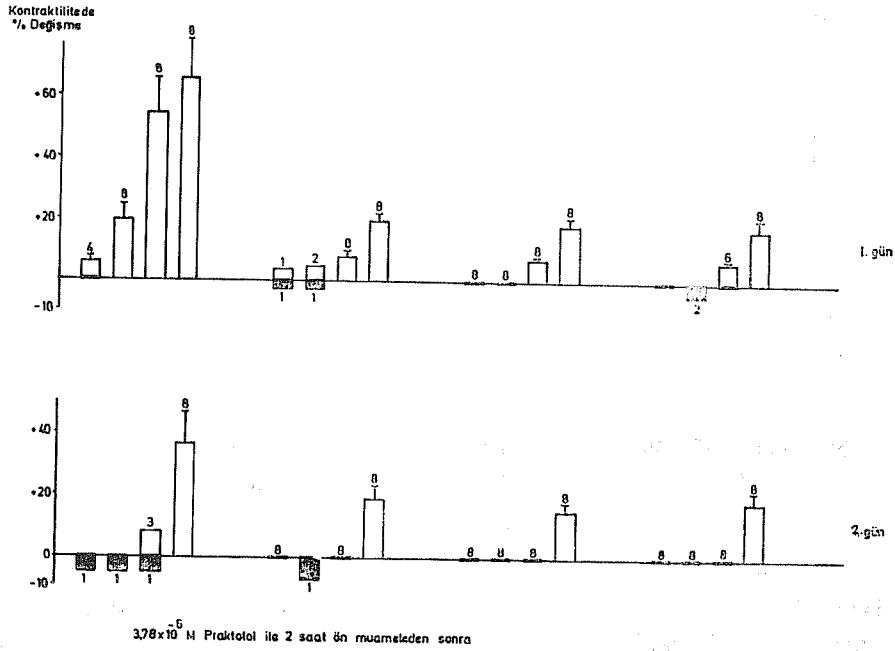


Resim 1: İzoproterenolun kaplumbağa ventrikül şeridi üzerinde gözlenen etkileri. A: Birinci gün, B: İkinci gün ve C: Üçüncü gün. Dört ilavelerde ( $\Delta$  ile gösterilmiş) birinci ilave  $10^{-11}$ , ikinci ilave  $10^{-10}$ , üçüncü ilave  $10^{-9}$  ve dördüncü ilave  $10^{-8}$  M banyo içerisindeki son izoproterenol konsantrasyonunu göstermektedir.



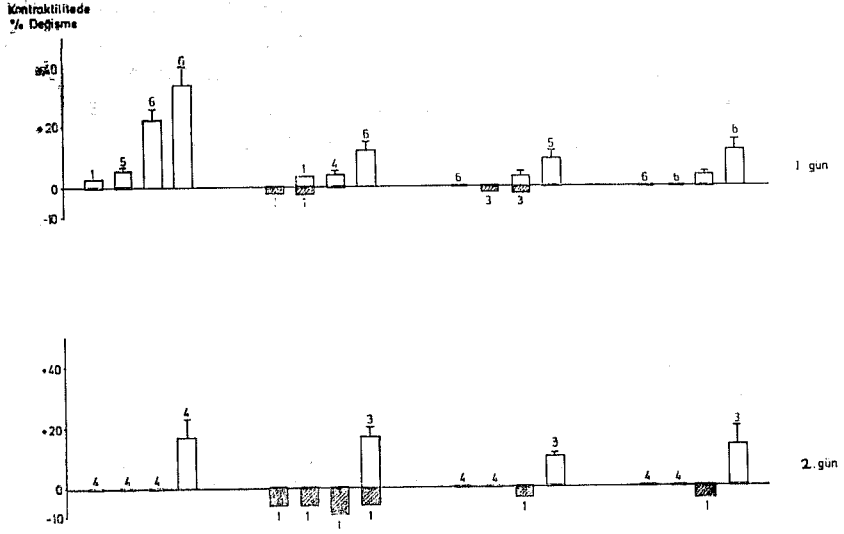
Şekil 1: İzoproterenolun birinci, ikinci ve üçüncü gün kaplumbağa ventrikül şeritlerinde gözlenen etkileri. Sütun grafikleri üzerinde kaydedilen rakamlar etkinin görüldüğü şerit sayısını vermektedir. Açık sütunlar, pozitif, taralı sütunlar negatif inotrop etkiyi göstermektedir. Birinci sütun  $10^{-11}$ , ikinci sütun  $10^{-10}$ , üçüncü sütun  $10^{-9}$  ve dördüncü sütun  $10^{-8}$  M izoproterenol konsantrasyonlarının etkilerini temsil etmektedir.

cevam etti. Bununla birlikte kasılma gücünün oldukça azaldığı ve ilaca karşı nisbeten duyarsız hale geldiği saptandı (Res. 1 C). İlaçın pozitif inotropik etki hasil ettiği şerit sayısı da azaldı. Üçüncü gün şeritlerden ikisinde kontraktilite çok azaldığından bunlar değerlendirmeden çıkarıldı. Negatif inotropik etki bazı şeritlerde ikinci ve üçüncü gün de görülmeğe devam etti. Bu grupta on şerit kullanıldı.



Şekil II:  $3.78 \times 10^{-6}$  M praktolol ile 2 saat ön muameleye maruz bırakılan ventrikül şeritlerinde izoproterenolün birinci ve ikinci gün gözlenen etkileri.

$3.78 \times 10^{-6}$  M praktolol inkübasyonundan sonra yapılan deneylerde kontrol gurubundaki bulgulara benzer sonuçlar elde edildi. Ancak burada ilk kümülatif doza alınan en büyük cevap kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde büyüktü ( $P < 0.05$ ). Bu deney serisinde de ilk kümülatif uygulamadan sonraki dozlarda cevapların azaldığı gözlemlendi. Diğer bir deyişle taşıflaksi olayı antagonist ile ön muameleden sonra da görülmeğe devam etti (Şek. II). Negatif etkinin ortaya çıkma eğiliminde azalma dikkati çekti. İkinci gün antagonist ile ön muameleye maruz bırakılan aynı şeritlerde, duyarlılığın bir ölçüde düzeldiği saptandı. Bu grupta sekiz şerit kullanıldı.



$3,78 \times 10^{-5}$  M Praktolol ile 2 saat ön muameleden sonra

Şekil III:  $3,78 \times 10^{-5}$  M praktolol ile 2 saat muameleye maruz bırakılan ventrikül şeritlerinde izoproterenolün birinci ve ikinci gün gözlenen etkileri

$3,78 \times 10^{-5}$  M praktolol inkübasyonundan sonra yapılan deneylerde, ilk kümülatif uygulama doza bağımlı pozitif inotropik cevap oluşturdu. Elde edilen en büyük cevap kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi. Bundan sonraki ilaç uygulamalarında taşiflaksi gözlemlendi (Şek. III). Aynı şeritte ikinci gün ilk kümülatif uygulamaya duyarlık belirgin idi. Bundan sonraki uygulamalarda taşiflaksi yine gözlemlendi. Nadir olarak negatif inotropik etkilerin müşahade edildiği bu deney gurubunda altı şerit kullanıldı.

## TARTIŞMA

İzoproterenolün kaplumbağa ventrikülünde doza bağımlı pozitif inotropik etki hasil etmesi beklenen bir durumdur. Aynı doku kullanılarak daha önce yapılan bir araştırmada izoproterenol etkisinin beta -adrenerjik reseptörler aracılığı ile geliştiği gösterilmiştir (14). Çalışmamızda izoproterenole karşı belirgin bir taşiflaksi gözlemlendi. Söz konusu bulgu daha önce yapılan in-vivo (3) ve in - vitro (7) araştır-

malarda gözlenen durumlara benzerlik göstermektedir. Preparatı bir gece bekletmek (+ 10°C) taşiflaksinin düzelmesinde yardımcı olmuştur. Ancak dokunun cevabında bir miktar azalma meydana gelmiştir. Bu durum soğğun reseptör yoğunluğunu azaltıcı etkisine bağlı olabilir. Başka dokularda yapılan çalışmalar böyle bir etkinin varlığını ortaya koymuştur (8, 9, 13). Şeritlerin üçüncü gün de elektriksel uyarıya düzenli cevap vermesi, preparatın in-vitro koşullara oldukça dayanıklı olduğunu göstermektedir. Taşiflaksi geliştikten sonra özellikle düşük agonist konsantrasyonlarında negatif inotropik etkilerin saptanması ilginçtir. İzole sıçan kalbinde yapılan bir çalışmada benzer durum gözlenmiştir (1). Beta<sub>1</sub>-adrenerjik reseptör antagonisti bu etkiyi ortadan kaldırmıştır. Çalışmamızda iki farklı konsantrasyonda praktolol ile ön muamele yapıldıktan sonra dokunun normal solüsyon içerisine alınması işlemi, duyarlıkta anlamlı bir azalma oluşturmamış ve taşiflaksi olayını inhibe etmemiştir. Antagonist etki dokunun yıkanması ile ilgili mekanizmalar üzerinde kalıcı bir etki meydana getirmemiş olabilir.

## SUMMARY

### The Effect of Isoproterenol on the Turtle Ventricular Strips

In this study, we have investigated the effect of isoproterenol on the ventricular strip of turtle prepared according to our method. This was described earlier. Briefly, strips about 3-4 cm long and 0.3 cm wide was obtained by cutting horizontally ventricular muscle. Strips thus prepared showed no spontaneous activity but were able to be electrically driven. The bath contained Ringer solution (NaCl 110, KCl 2.7, CaCl<sub>2</sub> 1.04, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.06, MgCl<sub>2</sub> 0.1, NaHCO<sub>3</sub> 2.4 and glucose 11 mM) and oxygenated. The temperature was maintained at 30°C. The strip was placed between a pair of electrodes embedded in-perspex, connected to stimulator which will deliver rectangular pulses of 1-2 msec duration. The other stimulation conditions were 9 mV and 0.75 Hz. Strips showed regular and consistent responses. Isotonic contraction were recorded by an isotonic lever which magnified them about 7 times on smoked drum. Tissue was equilibrated for about 1.5-2 hours. Isoproterenol (10<sup>-11</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup> and 10<sup>-8</sup> M) was added to the bath medium by using cumulative dose technique. First addition generally produced dose dependent positive inotropic effect. Tachyphylaxis to this effect was observed in the 2nd, 3rd and 4th applications. Some strips showed negative

inotropic responses after first cumulative addition. The same strips were also used in the second and third day. In spite of storing the strips one or two night in the refrigerator about at + 10°C, they survived and responded again to the drug. Tachyphylaxis was again observed.

Pretreatment with practolol ( $3.78 \times 10^{-6}$  or  $3.78 \times 10^{-5}$  M) during the equilibrium period did not significantly alter the sensitivity to the drug. Tachyphylaxis reappeared. Tissue was able to respond to the drug during second day.

#### KAYNAKLAR

1. Broadly, KJ.: Negative inotropic responses of the isolated heart of the rat to isoprenalin. *Brit. J. Pharmacol.* 45: 123, 1972.
2. Burnstock, G.: Evolution of the autonomic innervation of visceral and cardiovascular systems in vertebrates. *Pharmacol. Rev.* 21: 247, 1969.
3. Chang, HY., Klein, RM., Gunos, G.: Selective desensitization of cardiac beta-adrenoceptors by in vivo infusion of catecholamines in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221: 784, 1982.
4. Chuanc, DM., Costa E.: Evidence for internalization of the recognition site of beta-adrenergic receptors during receptor subsensitivity induced by (—) isoproterenol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 3024, 1979.
5. Dikmen, A., Önder, S., Baysal, F.: Geliştirdiğimiz bir metoda göre hazırlanan ventrikül şeritlerinde efedrinin etkisinin incelenmesi. *Ç. Ü. Tıp Fak. Dergisi* 7: 11, 1982.
6. Fleisch, JH., Titus, E.: The prevention of isoproterenol desensitization and isoproterenol reversal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 181: 425, 1972.
7. Kaumann, AJ., Birnbaumer, L.: Desensitization of kitten atria to chronotropic inotropic and adenylyl cyclase stimulating effects of (—) isoprenalin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 293: 199, 1976.
8. Lum, BKB., Kermani, MH., Heilman, RD.: Intestinal relaxation produced by sympathomimetic amines in the isolated rabbit jejunum. Selective inhibition by adrenergic blocking agents and by cold storage. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 154: 463, 1966.
9. McDougal, MD., West, GB.: The action of isoprenalin of intestinal muscle. *Archs. Int. Pharmacodyn. Ther.* 90: 86, 1952.



10. Perkins, JP.: Catecholamine - induced modification of the functional state of beta - adrenergic receptors. TIPS - 2 : 326, 1981.
11. Spilker, B., Tyll, J.: On the question of tachyphylaxis to isoproterenol in guinea pigs. J. Pharmacol. 36 : 293, 1976.
12. Su, YF., Harden, TK., Perkins, JP. : Isoproterenol induced desensitization of adenylate cyclase in human astrocytoma cells. J. Biol. Chem. 254: 38, 1979.
13. Tirri, R., Siltovuori, A.: Alpha adrenergic subsensitivity of isolated femoral arteria following short term cold acclimatization in rats. Experientia. 33 : 922, 1977.
14. Van Harn, GL., Emanus, TL., Meester, WD.: Adrenergic receptors in turtle ventricle myocardium. European J. Pharmacol. 24 : 145, 1973.

