

NÖROMÜSKÜLER İLETİDE KANAMİSİN - KALSİYUM ETKİLEŞMESİ

İsmet DÖKMECİ

*Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji
Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi.*

Necdet DOĞAN

*Gazi Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Farmakoloji ve
Toksikoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi.*

Güner ULAK

*Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Kürsüsü, Ana Bilim Dalı
Diyarbakır.*

Bigüm ÇARIKÇIOĞLU

*Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji
Ana Bilim Dalı.*

Ö Z E T

Kanamisin sıçan frenik sinir diafragma kas preparatının indirekt stimülasyonunda kontraksiyonları inhibe etmektedir. Bu inhibisyon neostigminle antagonize edilemediği halde kalsiyumla önlenebilmektedir. Nöromüsküler kavşakta kalsiyum-kanamisin arasında bir antagonizma bulunduğu görülmüştür. Kalsiyum, Kanamisin'in LD₅₀ değerini büyük ölçüde değiştirmektedir.

GİRİŞ

Aminoglikozid antibiyotiklerin nöromüsküler kavşakta iletimi bloke ettiği 1957 yılında *Vital Brazil* ve *Corrado*¹⁰ tarafından streptomisinle gösterilmiştir. Daha sonra çeşitli deney hayvanlarında bu konuda birçok araştırma yapılmıştır^{1,5,6,9}. 1969'da yine *Vital Brazil* ve ark.¹¹ bu grup ilâçların nöromüsküler iletimi bloke ederek solunum depresyonu oluşturduklarını ka-

nıtlamışlardır. *Albiero ve ark.*¹ tarafından bazı aminoglikozid antibiyotiklerin nöromüsküler iletme etkileri karşılaştırılmış ve kanamisin'in gentamisin'den daha zayıf blokaj oluşturduğu gösterilmiştir.

Son yıllarda aminoglikozid antibiyotiklerin oluşturduğu nöromüsküler blokajın önlenmesi konusundaki çalışmalar kalsiyum üzerinde yoğunlaştırılmıştır. Nöromüsküler kavşakta aminoglikozid antibiyotiklerin magnezyuma benzer etki gösterdikleri ve ekstrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun artırılmasıyla da inhibisyonun önenebileceği ileri sürülmüştür^{7,9,10}.

Bu çalışmamızda aminoglikozid antibiyotiklerden kanamisin'in sıçan frenik sinir-diafragma kası preparatında oluşturduğu iletim blokajının kalsiyumla etkileşmesini ve bu etkininin kürar benzeri olup olmadığını ortaya koymak istedik. Ayrıca literatürlerde değişik değerlerde belirtilen kanamisin'in farelerdeki LD₅₀ değerini *Behrens ve Karber* yöntemiyle² saptadık ve in vivo olarak kanamisin - Ca⁺⁺ etkileşmesini gösterebilmek amacıyla önceden Ca⁺⁺ verilmiş hayvanlarda kanamisin'in LD₅₀ değerindeki değişimleri göstererek kanamisin'in akut toksisite değerinin kalsiyumla değişip değişmediğini araştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

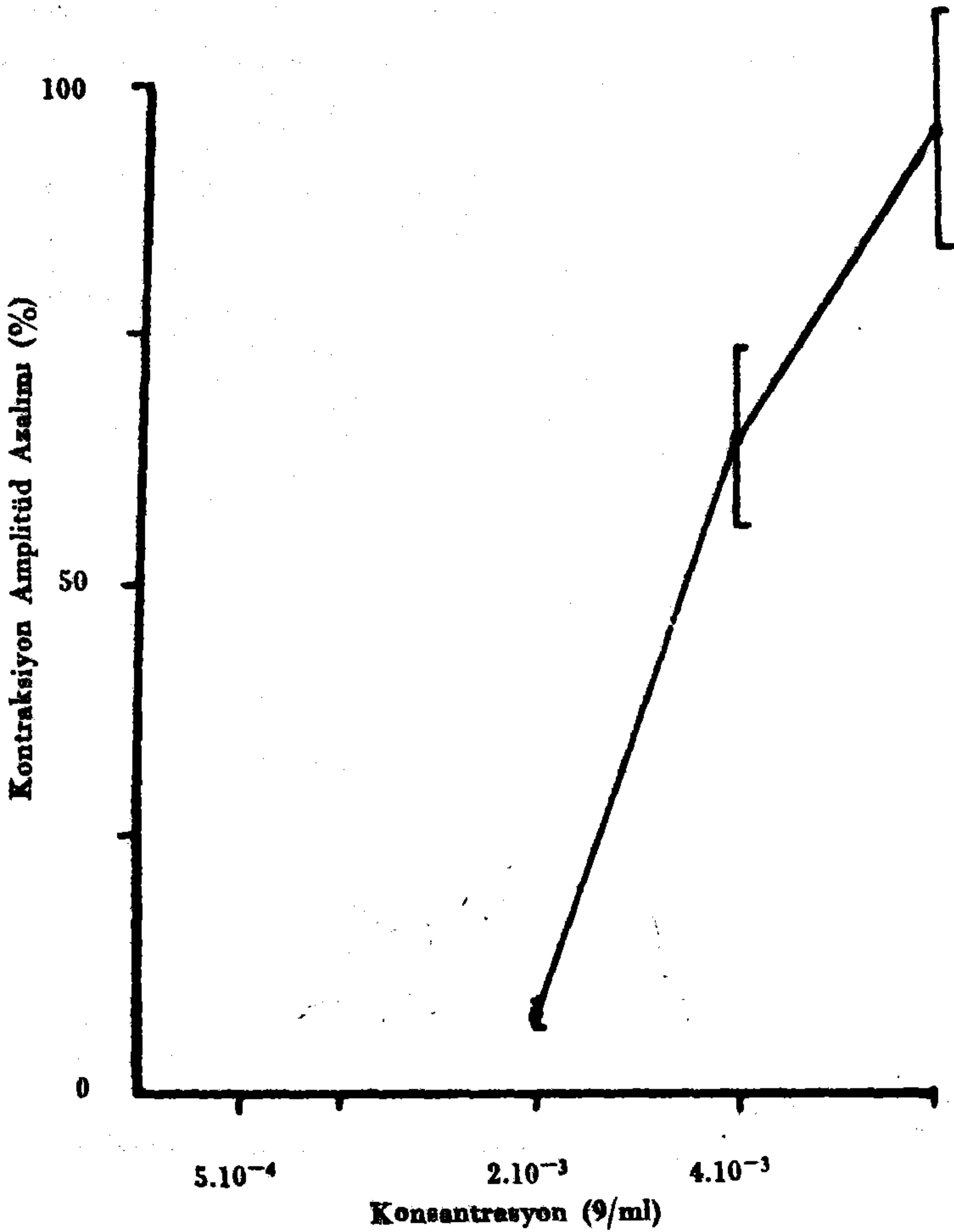
Araştırmamızda kullandığımız 12 adet frenik sinir - diafragma kası preparatı 260 ± 32 gr ağırlığındaki Swiss Albino türü sıçanlardan alınmıştır. Başına sert bir cisimle vurulduktan sonra boğaz bölgesi kesilerek kanı iyice akıtılan hayvanlarda son kostalar taban, frenik sinir ortada ve tendinöz kısım tepede olacak şekilde üçgen biçiminde kesilen diafragma, içinde Krebs solüsyonu bulunan ve % 95 O₂ ve % 5 CO₂ karışımıyla devamlı olarak oksijenize edilen 50 ml'lik bir izole organ banyosuna konulmuştur³. Preparata 1 gramlık istirahat gerilimi uygulanmıştır.

Sinir aracılığı ile kasın uyarılmasında (indirekt uyarım) platin uçlu bir elektrod kullanılmış ve sinir bir stimülatör (Palmer - Harris) yardımıyla 10 sn aralıklarla 1 msec süre ve 20 volt rektangüler puls şartlarında uyarılmıştır. Diafragma kası kontraksiyonları yatay bir uç kullanılarak isli kâğıda yazdırılmıştır. Preparat stabil duruma getirilmek amacıyla, uyarımlardan önce bir saat süreyle dinlenmeye bırakılmıştır.

Deneylerimizin bu bölümünde kanamisin sülfat 100 mg/ml, kalsiyum klorür 1/2 M ve neostigmin metil sülfonat 0.2 mg/ml konsantrasyonlarında hazırlanmıştır.

Kanamisin'in akut toksisitesinin kalsiyum tarafından değişip değişmediğini ortaya koymak amacıyla daha önce 24 saat aç bırakılmış 10'arlık 5 gruba ayrılmış erkek-dişi karışımı Swiss Albino farelerde kanamisin'in i. p. yoldan LD₅₀ değeri *Behrens* ve *Karber* metoduna göre saptandıktan sonra 10 dakika önce i. p. yolla 250 mg/kg CaCl₂ verilmiş farelere aynı yoldan kanamisin'in LD₅₀ dozu her grupta belirli bir oranda artacak şekilde 10'ar hayvanlık 5 ayrı gruba uygulanarak yeni bir LD₅₀ değeri bulundu.

Bir gruba uygulanan ilâç miktarı, grubu oluşturan farelerin ortalama ağırlığına göre saptanmıştır.



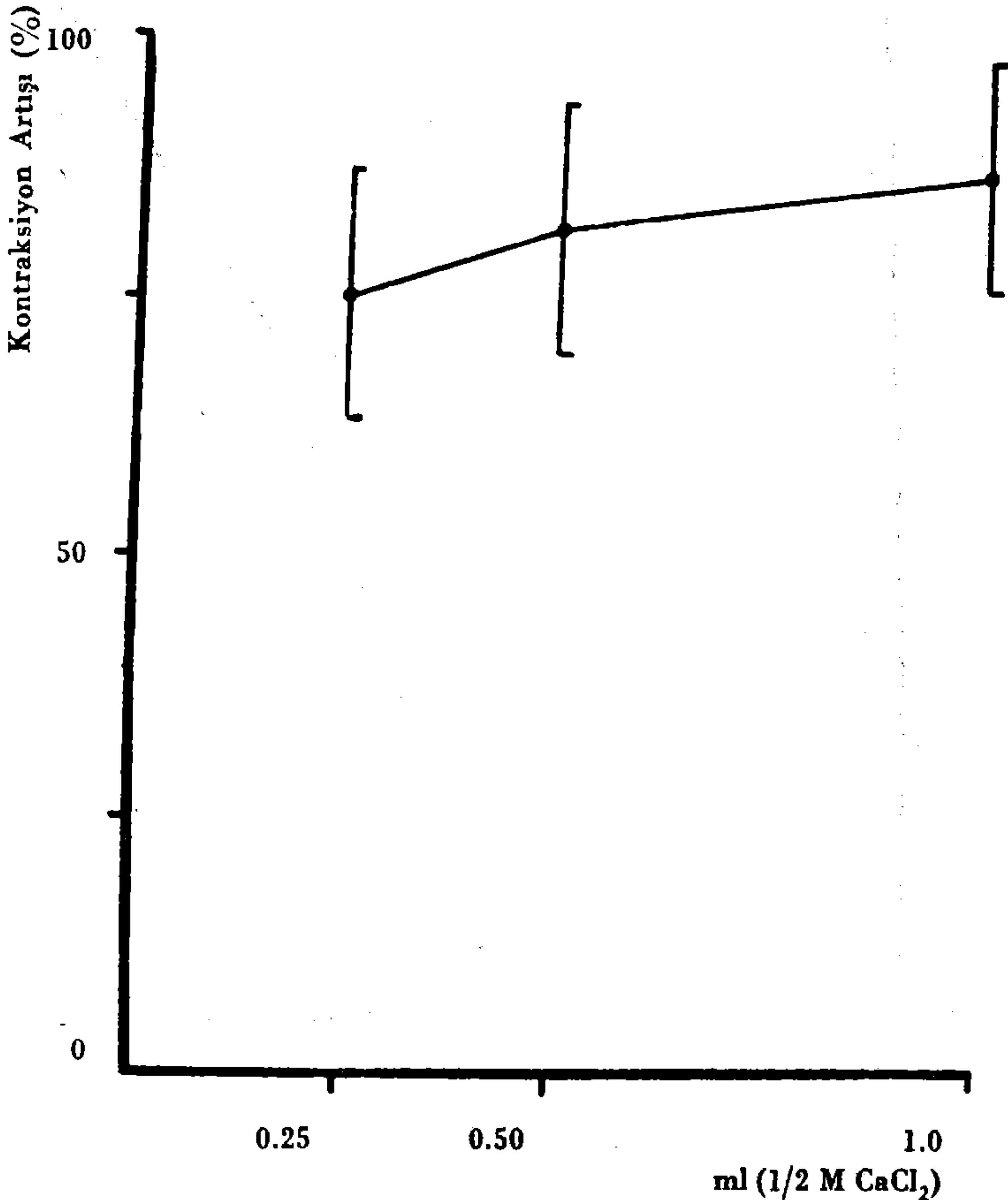
Şekil : 1. Kanamisin'in doz-yanıt eğrisi.

BULGULAR

1. Kanamisin - Kalsiyum etkileşmesinin frenik sinir - diafragma kası preparatında gösterilmesi :

a) Kanamisin frenik sinir - diafragma kası preparatının indirekt stimülasyonunda kontraksiyonları inhibe etmektedir. Besleyici sıvıya 2.10^{-3} g/ml konsantrasyonunda konan kanamisin kontraksiyonları ortalama $\%8 \mp 0,5$, 3.10^{-3} g/ml konsantrasyonunda $\%64 \mp 9$ ve 4.10^{-3} g/ml konsantrasyonda ise $\%95 \mp 12$ oranında azaltmaktadır (Şekil 1).

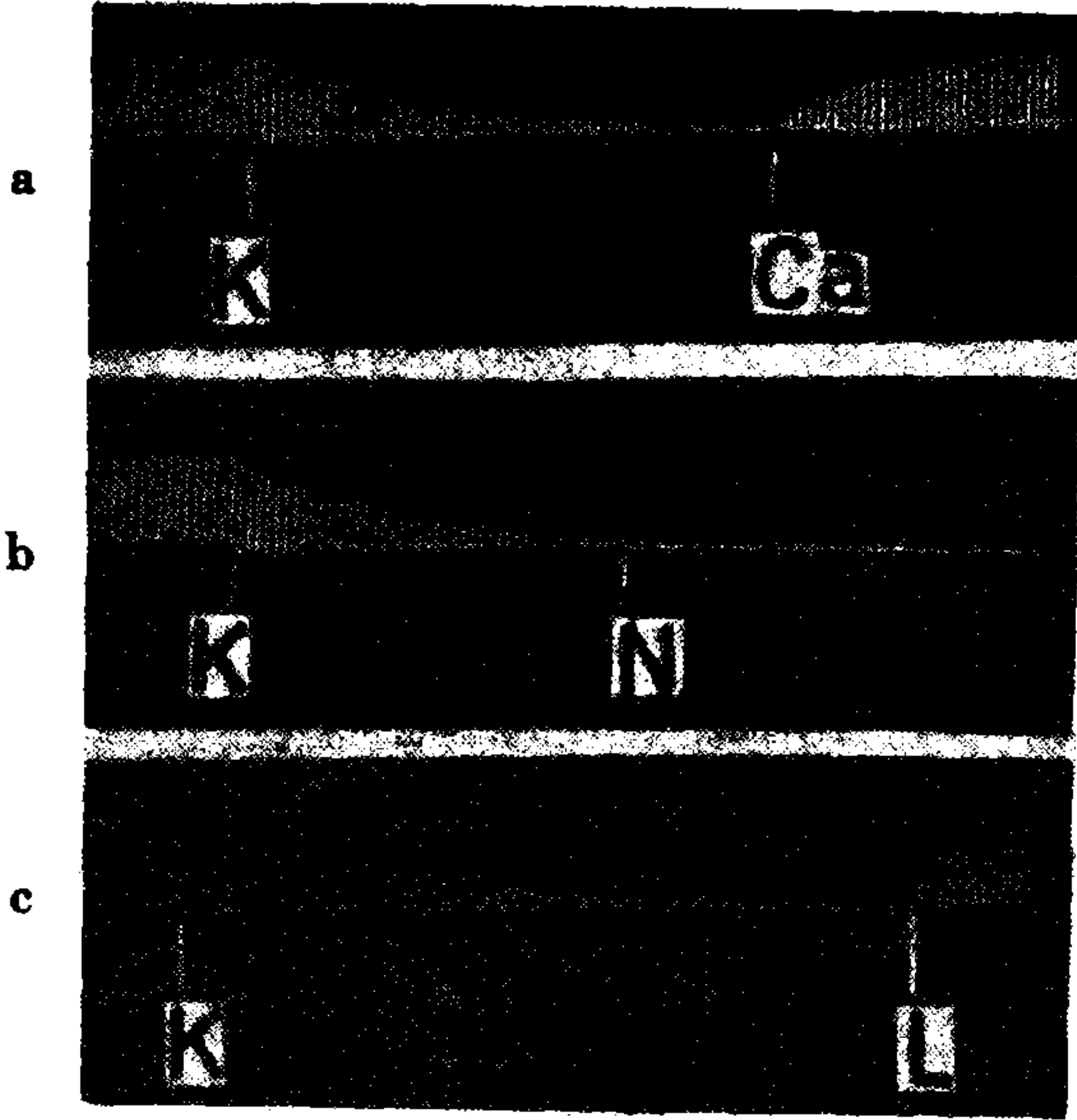
b) Kontraksiyon amplitüdünün kanamisin'le maksimum düzeyde azaltılmasından sonra besleyici sıvıya konan CaCl_2 , inhibisyonları verilen dozla ilişkili olarak ters çevirmektedir. 50 ml lik banyoya 1/2 M CaCl_2 'den 0.25 ml



Şekil : 2. Kanamisin inhibisyonuna CaCl_2 'ün etkisi.

verilmesi preparatın inhibisyonundan önceki kontraksiyon amplitüdünün % 74 \pm 12 sine, 0.5 ml % 83 \pm 12 sine ve 1.0 ml'de %87 \pm 11'ine tekrar ulaşmasını sağlamaktadır (Şekil 2).

c) Kanamisin'in oluşturduğu nöromüsküler inhibisyonun kürar tipi bir etki olup olmadığını anlamak için bir kolinesteraz inhibitörü olan Neostigmin'in 20 mic gr, 30 mic gr ve 40 mic gr'lık 3 ayrı dozu kanamisin inhibisyonundan sonra uygulandığında inhibisyonun ortadan kalkmadığı görüldü (Şekil 3/b). Neostigmin'in aynı dozları sıçan sinir diafragma preparatında d - tubokürarin'in LD₅₀'lık dozunun oluşturduğu inhibisyonu ters çevirebilmektedir.



Şekil : 3. Kanamisin (K) inhibisyonuna CaCl₂(Ca), Neostigmin (N) ve lavaj (L)'in etkileri.

Kanamisin inhibisyonundan sonra preparatın bir defa yıkanmasıyla inişiyal amplitüd ortalama 140 \pm 25 saniye sonra elde edilebilmektedir.

2. Kanamisin LD₅₀ değeri ve buna kalsiyum'un etkisi :

a) Aşağıda Tablo 1'de Kanamisin'in i. p. verilen dozları ve elde edilen ölüm sayıları gösterilmiştir. Bu değerler *Behrens* ve *Karber* formülünde yerlerine konularak kanamisin'in farelerdeki i. p. LD₅₀ değeri saptandı.

Tablo : 1.

Gruplar	A	B	C	D	E
Dozlar mg/kg	750	1000	1250	1500	1750
Ölüm sayısı	1	3	6	9	10
n	10	10	10	10	10
a	250	250	250	250	250
b	2	4,5	4,5	9,5	9,5
ab	500	1125	1875	2375	2375

$$LD_{50} = LD_{100} \frac{\sum ab}{n}$$

$$LD_{50} = 1750 \frac{5875}{10}$$

$$LD_{50} = 1162,5 \text{ mg/kg}$$

b) Önceden 150 mg/kg i.p. CaCl₂ verilmiş 10'arlık 5 gruba ayrılmış farelere kanamisin'in değişik dozları uygulanarak (Tablo 2) yeni bir LD₅₀ değeri saptandı.

Tablo : 2.

Gruplar	A	B	C	D	E
Dozlar mg/kg	1162,5	1300	1500	1750	2100
Ölüm sayısı	1	2	4	7	10
n	10	10	10	10	10
a	137,5	200	250	350	350
b	1,5	3	5,5	8,5	8,5
ab	206,25	600	1375	2975	2975

$$LD_{50} = LD_{100} \frac{\sum ab}{n}$$

$$LD_{50} = 2100 \frac{2975}{10}$$

$$LD_{50} = 1802,5 \text{ mg/Kg}$$

c) Deneylerimizin bu bölümünde 10'arlık 5 gruba ayrılmış farelere önceden verilen $CaCl_2$ dozlarını arttırarak kanamisin'in LD_{50} (1162,5 mg/kg)'sinden ileri gelen ölüm sayılarını gözledik (Tablo 3).

Tablo : 3.

Önceden Verilen $CaCl_2$ Dozları mg/kg	Ölüm Sayısı	Hayvan Sayısı
150	1	10
250	4	10
350	6	10
450	8	10
550	10	10

TARTIŞMA VE SONUÇ

Prado ve *ark.*⁹ çeşitli aminoglikozid antibiyotiklerin oluşturduğu blokajın ortama katılan Ca^{++} iyonlarıyla önlendiğini göstermişlerdir. Yazarlar asetilkolin rilizi için kalsiyumun spesifik reseptörlerle birleşmesi gerektiğini ileri sürmekte ve aminoglikozid antibiyotiklerin de bu reseptörlerle reverzibl kompleksler kurarak kalsiyumun reseptörlere afinitesini azalttığını belirtmektedirler.

Biz de bu çalışmamızda kanamisin'le kalsiyum arasındaki benzer etkileşmeyi gördük. Kanamisin'in oluşturduğu nöromusküler blokajın kavşak öncesi

mekanizmalarla ilgili olduğu düşünülebilir. Bilindiği gibi Ca^{++} motor nöronlarda asetilkolin açığa çıkmasına sebep olarak nöromusküler aralığa dökülmekte ve fizyolojik olarak çizgili kasın kontraksiyonunu sağlamaktadır⁴. Kanamisin'in oluşturduğu inhibisyonun dışardan Ca^{++} vererek ortadan kalkması, etkileşmenin sinir plağı veziküllerinde olduğunu göstermektedir.

*Vital Brazil ve ark.*¹¹, kedi siyatik sinir tibialis arteriyör kası preparatında gentamisin'in oluşturduğu blokajın neostigminle önlendiğini göstermişlerdir. Ancak biz bu çalışmamızda in vitro olarak frenik sinir-diafragma preparatında kanamisin'in sebep olduğu blokajın neostigmin'in değişik dozlarıyla ortadan kalkmadığını gördük. Bu durumda nöromusküler kavşakta kanamisin'in gentamisinden farklı bir etkisinin olduğu ortaya çıkmaktadır.

Kanamisin'in LD_{50} değeri önceden terapötik dozda $CaCl_2$ verilmiş hayvanlarda %55 oranında artmaktadır. Bu da gösteriyor ki, kanamisin'in fatal etkisi nöromusküler blokajla ilgilidir. Daha önce hayvanlara verilen kalsiyum kanamisin'in toksik etkisine karşı koyabilmektedir. Ancak kalsiyum bu etkisini normal dozlarda göstermektedir. Çünkü ortamda kalsiyumun dozları arttığında kanamisinin toksik etkisinde de belirgin bir artış olmaktadır.

RÉSUMÉ

L'INTERACTION NEUROMUSCULAIRE ENTRE KANAMYCINE ET CALCIUM

La kanamycine inhibe en effet les contractions provoquées par la stimulation indirecte de la préparation du nerf phrenique-diaphragme de rat. Cette inhibition est bloquée par le calcium alors qu'elle n'est pas antagonisée par la neostigmine. On a constaté qu'il existe une antagonisme entre calcium et kanamycine au niveau du jonction neuro-musculaire de rat. En outre le calcium peut modifier considérablement la LD_{50} de la kanamycine chez les souris.

SUMMARY

INTRODUCTION OF KANAMYCIN AND CALCIUM ON NEUROMUSCULAR CONDUCTION

Kanamycin inhibits contractions induced by indirect stimulation in phrenic nerve-diaphragm preparation of rat. Although this inhibition can not antagonized with Neostigmine, it can prevented by calcium. We have concluded that there is an antagonism between calcium and kanamycin at neuromuscular junction.

Moreover calcium considerably modified LD_{50} of Kanamycine for mice.

KAYNAKLAR

- 1 — ALBIERO, L., BOMONTE, F., ONGINI, E. and PARRAVICINI, L.: *Comparison of neuromuscular effects and acute toxicity of some aminoglycoside antibiotics.* Arch. Int. Pharmacodyn., **233**: 343 - 350, 1978.
- 2 — BEHRENS, N., und KARBER, C. : *Wie sind Reihenversuche für biologische Auswertungen am zweckmässigsten Anzuordnen.* Arch. exp. Path. Pharmac., **177**: 379, 1935.
- 3 — BULBRING, E. : *Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat,* Br. J. Pharmac. Chemother. **1**: 36-61, 1946.
- 4 — DÖKMECİ, İ. : *Farmakoloji,* Diyarbakır Üniv. Tıp Fak. Yay., 1979.
- 5 — DRETCHEN, K. L., GERGIS, S. D., SOKOLL, M. D. and LONG, J. P. : *Effect of various antibiotics on neuromuscular transmission.* Eur. J. Pharmacology, **18**: 201-203, 1972.
- 6 — DRETCHEN, K. L., SOKOLL, M. D., GERGIS, S. D. and LONG, J. P. : *Relative effects of streptomycin on motor nerve terminals and endplate.* Eur. J. Pharmac., **22**: 10 - 16, 1975.
- 7 — JINDAL, M. N. and DESPHANDE, V. R. : *Neuromuscular blockade by streptomycin and dihydrostreptomycin.* Brit. J. Pharmacol., **15**: 506-509, 1960.
- 8 — PITTINGER, C. and ADAMSON, R. : *Antibiotic blockade of neuromuscular function.* A. Rev. Pharmac., **12**: 169 - 184, 1972.
- 9 — PRADO, W. A., CORRADO, A. P. and MARSEILLAN, R. F. : *Competitive antagonism between calcium and antibiotics at the neuromuscular junction.* Arch. Int. Pharmacodyn., **231**: 297-307, 1978.
- 10 — VITAL BRAZIL, O. and CORRADO, A. P. : *The curariform action of streptomycin.* J. Pharmacol. exp. Ther., **120**: 452-259, 1957.
- 11 — VITAL BRAZIL, O. and PRADO - FRANCESCHI, J. : *The neuromuscular blocking action of gentamisin,* Arch. Int. Pharmacodyn., **179**: 65-77, 1969.