

Salmon Kalsitoninin Antinosiseptif Etkisinde Histamin Reseptörlerinin Rolü*

Dikmen DÖKMECİ², Meryem AKPOLAT³, Turhan DOST³, Alev TUNCER³, İsmet DÖKMECİ¹

ÖZET

Amaç: Salmon kalsitonin (sCT) 'in analjezik etkisinin varlığı birçok çalışmada kanıtlanmıştır, fakat bu etkinin mekanizması tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Bununla birlikte, histaminin sCT'nin analjezik etkisinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışma sCT'nin analjezik etkisinde rol oynayan histamin reseptör tipini tayin etmek için yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hayvanlar her grupta 7 fare olacak şekilde 4 gruba ayrıldılar. I. gruba 5 µl intraserebroventriküler (i.c.v) yolla salin verildi ve kontrol grubu olarak ayrıldı. II. gruba i.c.v. yolla sCT (10 i.ü./kg) verildi. III. gruba intraperitoneal (i.p.) yolla H₁ reseptör antagonisti feniramin (30 mg/kg) ve IV. gruba da H₂ reseptör antagonisti ranitidin (100 mg/kg) verilmesinden 1 saat sonra her iki gruba da sCT (10 i.ü./kg, i.c.v.) verildi. Tüm gruplarda sCT verilmesinden sonraki 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda tail-flick latensileri değerlendirildi.

Bulgular: sCT'nin i.c.v. (10 i.ü./kg) injeksiyonu 60, 90 ve 120. dakikalarda ağrı eşikini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artırmıştır (p<0.05). Ranitidin sCT'nin analjezik etkisini azaltmasına rağmen, feniramin hiçbir etki göstermemiştir.

Sonuç: Bu sonuçlar sCT'nin analjezik etkisinin kısmen de olsa histaminerjik sistem ile ilişkili olduğunu ve bu ilişkide histamin H₂ reseptörlerinin görev aldığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Histamin, salmon kalsitonin, tail-flick testi.

SUMMARY

THE ROLE OF HISTAMINE RECEPTORS IN THE ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF SALMON CALCITONIN

Purpose: Although the analgesic effect of sCT has been proven in many previous studies, its mechanism of action is not yet completely elucidated. Nevertheless, the role of histaminergic system in the analgesic effect of sCT is known. This study was undertaken to determine the receptor type of histamine playing role in the analgesic effect of sCT.

Methods: Four groups of animals, each consisting of 7 albino mice, were included in the study. I. group received 5 µl of saline intracerebroventricularly (i.c.v.) and served as control for the other groups. Group II was treated only with sCT (10 iu/kg, i.c.v.). Groups III and IV, one hour after being injected with sCT (10 iu/kg, i.c.v.), were treated with pheniramine (30 mg/kg, i.p.), a histamine H₁ receptor antagonist, and ranitidine (100 mg/kg, i.p.), a histamine H₂ receptor antagonist, respectively. In all groups, tail-flick latencies were determined once before i.c.v. injection of sCT and again 30, 60, 90, 120 min after the injections.

Results: The i.c.v. injection of sCT at dose of 10 iu/kg significantly increased the pain threshold at 60, 90, 120 min (p<0.05). Although ranitidine attenuated the analgesic effect of sCT, pheniramine had no effect.

Conclusion: These results indicate that the analgesic effect of sCT is partly related to the histaminergic system and histamine H₂ receptors take place in this relationship.

Key Words: Histamine, salmon calcitonin, tail-flick test.

GİRİŞ

Kalsitonin (CT), tiroid bezinin parafoliküler hücreleri tarafından salgılanan 32 aminoasitli polipeptid bir hormondur ve kan

kalsiyum konsantrasyonunu ve kemiklerde de kalsiyum metabolizmasını düzenler (1).

Kalsitonin ve ilişkili substanslar; memeliler, kuşlar, balıklar ve E. coli, C. albicans,

* Bu çalışma "2nd European Congress of Pharmacology, 3-7 July 1999, Budapest / Hungary" da poster olarak sunulmuştur.

¹: Prof. Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji A.D

²: Yrd. Doç. Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji A.D

³: Araş. Gör. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji A.D

A. fumigatus gibi birçok prokaryotik hücreler dahil 15'ten fazla farklı türde bulunmuşlardır ve bunların bazılarının aminoasit sıraları belirlenmiştir. Salmon kalsitonin (sCT) ilk sentezlenen ve tedavide kullanılanıdır ve bunu domuz (pCT) ve yılan balığı (eCT) kalsitoninleri izlemiştir (3).

Farklı alanlardaki çalışmalara göre CT için bağlanma bölgesi, renal ve kemik hücresi plazma membranlarında, insan lenfosit hücre kültürlerinde, beyin ve spinal kord'da da bulunmuştur (3). Bu yüzden CT, sadece kemik üzerinde değil böbrek fonksiyonu, gastrointestinal sistem, pankreas ve safra kesesi, lenfositler ve monositler ve de santral sinir sistemi de dahil multisistemik bir etkiye sahiptir (3).

Salmon kalsitoninin analjezik etkisi birçok çalışma ile gösterilmiştir (1, 3, 4). Fakat hormonun analjezik ve antiinflamatuvar etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir ve bu etkilerin mekanizmasını açıklamak için pek çok çalışma yapılmıştır. Opioid ve non-opioid mekanizmalar ile ilgili çalışmalar da vardır (4). Opioidlerle yapılan çalışmalardan antinosiseptif etkinin opioid sistemden bağımsız olduğu gösterilmiştir. Non-opioid mekanizmalar ise serotonerjik, katekolaminerjik, hücre içine Ca^{+2} girişi, protein fosforilasyonu, siklooksijenaz inhibisyonu ve histamin etkileşimini içermektedir (3).

Önceki çalışmalar histaminin santral sinir sisteminde antinosisepsiyonun bir mediatörü olduğunu kanıtlamıştır (5-7). Biz de çalışmamızda sCT'nin antinosiseptif etkisinde histaminerjik sistemin muhtemel rolünü farklı iki histamin reseptör antagonisti kullanarak araştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvanlar

Çalışmamızda 25-30 g ağırlığında erkek BALB-c fareler (Eczacıbaşı) kullanıldı. Hayvanlar deney günü hariç, yiyecek ve suyu serbestçe almaları sağlanarak, standart ısı (22 ± 1 °C) ve 12 saatlik aydınlık/karanlık siklusu bulunan laboratuvar koşullarında barındırıldılar.

Nosiseptif eşiğin ölçülmesi

Radian ısı tail-flick test prosedürü D'Amour ve Smith'in (8) 1941'de geliştirdiği ve daha sonra da Dewey ve arkadaşlarının (9) 1970'de modifiye ettiği yöntemine göre, laboratuvarımızda bulunan tail-flick test aygıtı (Commat, 9604-A) ile değerlendirildi.

Hayvanlar tail-flick testi için kuyruk köklerinden 2 cm uzağa radian ısı (24 V, 150 W) gelecek şekilde yerleştirildiler. Radian ısı

lambası, tedavi edilmeyen farelerde kuyruklarını ışık kaynağından $\frac{1}{2}$ -4 saniyede çekecekleri şekilde ayarlandı. Farelerin kuyruklarında yanık oluşmaması için cut-off zamanı 10 saniye olarak belirlendi. Kuyruğun ventral yüzü radian ısıya tutuldu ve hayvanların kuyruk çekme süreleri aygıttan otomatik olarak kaydedildi.

Antinosiseptif verilerin analizi

Her hayvan için antinosiseptif skorlar, maksimum muhtemel etkinin yüzdesi (maximal possible effect = %MPE) olarak hesaplandı (10, 11).

(test latensi-kontrol latensi)

$$\% \text{ MPE} = \frac{\text{test latensi} - \text{kontrol latensi}}{\text{cut-off time} - \text{kontrol latensi}} \times 100$$

Deneyel prosedür

Hayvanlar her grupta 7 fare olacak şekilde dört gruba ayrıldılar. İlk gruba 5 µl salin i.c.v. yolla verildi ve kontrol grubu olarak ayrıldı. 2. gruba sadece sCT (10 iü./kg) i.c.v. yolla verildi. Grup 3'e histamin H_1 reseptör antagonisti feniramin (30 mg/kg, i.p.) ve grup 4'e histamin H_2 reseptör antagonisti ranitidin (100 mg/kg, i.p.) uygulandıktan 1 saat sonra, sCT (10 iü./kg, i.c.v.) enjekte edildi. Her grupta i.c.v. sCT enjeksiyonu yapılmadan önce ve enjeksiyondan 30, 60, 90 ve 120 dakika sonra tail-flick latensileri kaydedildi.

Salmon kalsitonin hayvanlara daha önceki deneylerimizde kullandığımız koordinatlardan (12) i.c.v. yolla enjekte edildi. Eter anestezisi altında bregmadan 0,8 mm anteriora, orta hattan 0,8 mm laterale ve kafa taşı yüzeyinden 3.0 mm ventrale olacak şekilde stereotaksi aygıtı yardımıyla i.c.v. koordinatlar belirlendi.

İlaçlar

Salmon kalsitonin (Miacalcic[®], Sandoz, İstanbul), feniramin maleat (Avil[®], Hoechst, İstanbul) ve ranitidin (Ulcuran[®], Abfar, İstanbul) kullanıldı. İlaç solüsyonları 10 grama 0.1 ml verilecek şekilde, deneyden hemen önce hazırlandı.

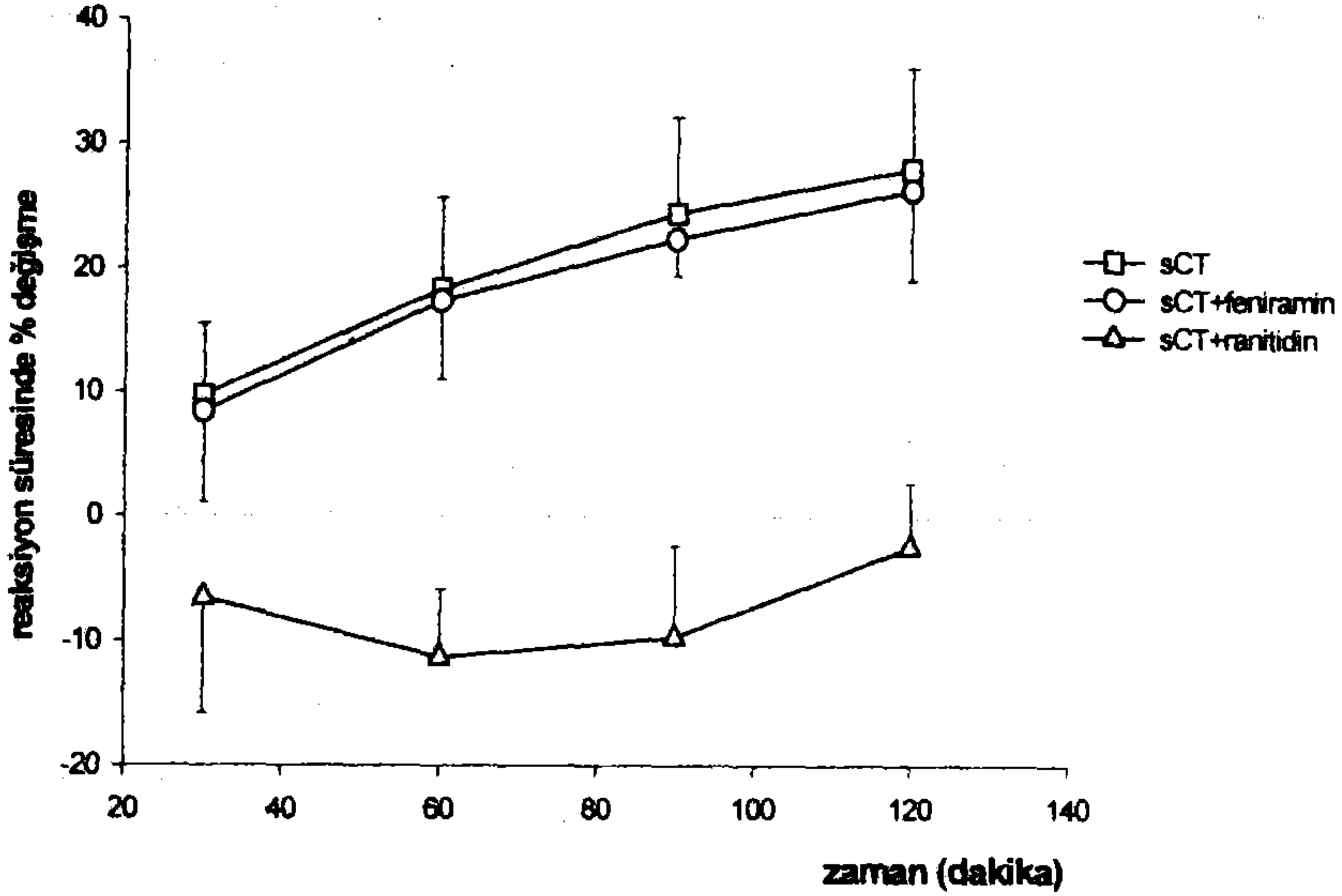
İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizinde, tekrarlayan ölçümler varyans analizi (ANOVA) kullanılarak yapıldı. Grup içi zaman farklılıklarını göstermek için Post-hoc testlerden Dunnet, gruplar arası farklılıkları göstermek için Post-hoc testlerden Student-Newman Keuls testi kullanıldı.

BULGULAR

Salmon kalsitoninin i.c.v. (10 i.ü/kg) injeksiyonu 60, 90 ve 120. dakikalarda ağrı eşiğini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artırdı ($p<0.05$). Ranitidin (100 mg/kg) i.p.

injeksiyonu sCT'nin antinosiseptif etkisini istatistiksel olarak azalttı ($p<0.01$), buna karşın feniraminin (30 mg/kg) i.p. injeksiyonu ölçüm sürelerinin hiçbirinde sCT'nin etkisini değiştirmedir, (Şekil).



Resim 1. Salmon kalsitonin nedenli antinosisepsiyon üzerinde feniramin ve ranitidin etkisi. Değerler ortalama \pm S.E.M. olarak verilmiştir (n = 7)

TARTIŞMA

Farklı alanlardaki çalışmalara göre sCT'nin böbrek fonksiyonu, gastrointestinal sistem, pankreas ve safra kesesi, lenfositler ve monositler ve santral sinir sistemi dahil birçok sistemde multisistemik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, kalsitonin için bağlanma bölgesi, renal ve kemik hücresi plazma membranlarında, insan lenfosit hücre kültürlerinde, beyin ve spinal kordda bulunmuştur (3).

Kalsitonin üreten parafoliküler C hücreleri embriyolojik olarak nöral krestten orijinini almaktadırlar. Bu hem insan, hem sıçan beyinin farklı bölgelerinde tanımlanan spesifik CT bağlanma yerleri gerçeğini ilginçleştirmektedir. Sıçanlarda sCT için spesifik bağlanma yerleri hipotalamusta en fazladır. İnsanda en yüksek konsantrasyonlar posterior hipotalamus, eminensiya media ve pituitar bezdedir, orta derecede ise substansiya nigra, anterior hipotalamus, globus pallidus ve inferior

kollikulusda ve en az da nükleus kaudatus, hipokampus, amigdala, serebellar kortektedir.

Kalsitonin için beyin farklı bölgelerindeki umulmadık bağlanma yerleri CT'nin santral sinir sistemi üzerindeki etkilerine dikkatimizi çekmiştir. Bunlar arasında prolaktin, tirotropin, luteinizan hormon gibi ön hipofiz hormonlarının sekresyonlarını değiştirmesi, yiyecek ve su alımının inhibisyonu, spontan ya da amfetamin nedenli lokomotor aktivitenin azalması gibi ilaç nedenli davranış değişiklikleri, analjezik ve antiinflamatuvar etkileri sayabilmekteyiz (3).

Kalsitoninin santral antinosiseptif etkisine ait ilk çalışma 1975'de yayınlanmış (13) ve daha sonra bu etkinin opioid sistemden bağımsız olabileceğine dair çalışmalar yapılmıştır (14). Raphe magnus, periakvaduktal gri madde, talamus, spinal nöronlar gibi bölgelerde CT bağlanma bölgelerinin fazla yoğunlukta olması araştırmacıları duyuşal stimulusun algılanımı, iletilmesi ve

düzenlenmesinde CT'nin analjezik etkisinin olup olmadığı yönünde araştırmaya yönlendirmiştir. Şu andaki genel görüş CT'nin analjezik aktiviteye sahip olduğudur ve bu hem insan (1, 3) hem de hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (3, 4, 10, 11, 13). Biz de laboratuvarımızda çeşitli ağrı modellerinde sCT'nin analjezik etkisini inceledik (15).

Kalsitoninin analjezik ve antiinflamatuar etkisi klinik çalışmalarla da desteklenmiştir ve günümüzde Paget hastalığı, postmenapozal osteoporozis, akut vertebral fraktür, metastatik kemik ağrısı, refleks sempatik distrofi, migren gibi hastalıklarda sCT kullanım endikasyonu bulunmaktadır (1).

Kalsitoninin etki mekanizması komplekstir. Bu konuda pek çok çalışma olmasına rağmen hormonun etki mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Opioidlerle ilişkisi çalışılmış ve antinosiseptif etkinin bu sistemden bağımsız olduğu gösterilmiştir. Non-opioid mekanizmalar ise serotonerjik, katekolaminerjik, hücreye Ca^{+2} girişi, protein fosforilasyonu, siklooksijenaz inhibisyonu ve histamin etkileşimini içermektedir (3).

Bulgular gösteriyor ki, mast hücreleri tarafından depo edilen ve salınan histamin, serotonin ve dopamin gibi biyojenik aminler, beyin fonksiyonlarının nöromodülatörü olarak önemli rol oynamaktadırlar (16). Son immunosito-kimyasal çalışmalar beyinde posterior hipotalamusun tuberomamiller nükleusunda histaminerjik nöronların varlığını ve bunların da hemen hemen tüm beyin bölgelerine efferent lifler gönderdiğini göstermiştir. Histamin reseptörlerinin üç tipi sadece nöronlarda değil, beyin damarları ve astrositlerde de yaygın bir şekilde dağılmıştır. Bu yaygın

histaminerjik nöron sistemi, beyin enerji metabolizması, lokomotor aktivite, nöroendokrin, otonomik ve vestibüler fonksiyonlar, yeme-içme, seksüel davranış ve analjezi gibi beyinin çeşitli aktivitelerini düzenler (17). İşte bir nöromodülatör olan histamin, santral sinir sisteminde antinosisepsiyonun bir mediatörüdür ve pek çok çalışmada histaminin sıçanlara (18-21) ve farelere (21, 22) intraserebro ventriküler uygulanmasından sonra analjezi oluşturduğu gösterilmiştir. H_1 ve / ya da H_2 reseptörleri; uygulanan testin tipine, beyine injeksiyon yapılan yere ya da türlere bağlı olarak histamin antinosisepsiyonuna aracılık edebilir (7,18,23,24). Intraventriküler ya da intraserebral histamin uygulanmasıyla antinosisepsiyon olduğu hot-plate (7,22,19, 21), tail-flick (18,22,23), paw-pressure test (20, 21) ve elektrofizyolojik ölçümlerle (20) gösterilmiştir.

Histamin reseptörlerinin, özellikle de histamin H_2 reseptörlerinin, morfinin etkilerinde de önemli rol oynadığı bilinmektedir (25) ve morfin antinosisepsiyonunun sıçanlarda beyin histamin H_2 reseptörlerinin aktivasyonu olduğu gösterilmiştir. Biz de çalışmamızda sCT'nin antinosiseptif etkisinin histaminerjik sistem ile ilişkili olabileceğini ve bu ilişkide de histamin H_2 reseptörlerinin görev aldığını gözlemledik.

Kalsitonin gibi nörotansin, substans P, VIP (*vazoaktif intestinal polipeptid*), CGRP (*kalsitonin geniyle ilişkili peptid*) ağrıyla ilişkili oldukları bildirilen non-opioid peptidlerdir (26) ve tüm bunlar opioid ve opioid benzeri ajanlardan farklı olarak, bilinen antinosiseptif ilaçlara karşı yeni ve alternatif bir yol açacaklardır.

KAYNAKLAR

1. Wisneski LA:Review of calcitonin: future perspectives and new opportunities in therapy. Bone and Minerale 1992; 16:213-216.
2. Copp DH, Davidson AFG and Cheney BA:Evidence for a new parathyroid hormone which lowers blood calcium. Proc. Canad. Fed. Biol. Soc. 1961; 4-17.
3. Braga PC:Calcitonin and its antinociceptive activity: Animal and human investigations 1975-1992. Agents Actions 1994; 41:121-131.
4. Martin MI, Goicoechea C, Colado MI and Alfaro MJ:Analgesic effect of salmon-calcitonin administered by two routes. Effect of morphine analgesia. Eur. J. Pharmacol. 1992; 224:77-82.
5. Ueda H: In vivo molecular signal transduction of peripheral mechanisms of pain. Jpn. J. Pharmacol. 1999; 79 (3):263-268.
6. Besson JM:The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. Drugs 1997; 53 (2):1-9.

7. Thoburn KK, Hough LB, Nalwalk JW and Mischer SA: Histamine-induced modulation of nociceptive responses. *Pain* 1994; 58 (1):29-37.
8. D'Amour FE and Smith DL: A method for determining loss of pain sensation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1941; 72:74-79.
9. Dewey WL, Harris LS, Howes JF and Nuite JA: The effect of various neurohumoral modulators on the activity of morphine and the narcotic antagonists in the tail-flick and phenyquinone test. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1941; 72:74-79.
10. Celeменти G, Amico-Roxas M, Rapisarda E, Caruso A, Prato A and Priolo G: The analgesic activity of calcitonin and the central serotonergic system. *Eur. J. Pharmacol.* 1985; 108:71-75.
11. Welch PS, Cooper CW and Dewey WL: Antinociceptive activity of salmon calcitonin injected intraventricularly in mice: Modulation of morphine antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986; 237:54-58.
12. Karadağ ÇH, Ulugöl A, Dökmeci D and Dökmeci I: The role of histamine H₁-receptors in the anticonvulsive effect of morphine against maximal electroconvulsive shock in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 1996; 71:109-112.
13. Pecile A, Ferri S, Braga PC and Olgiati VR: Effects of intracerebroventricular calcitonin in the conscious rabbit. *Experientia* 1975; 31:332-333.
14. Braga PC, Ferri S, Santagostino A, Olgiati VR and Pecile A: Lack of opiate receptor involvement in centrally induced calcitonin analgesia. *Life Sci.* 1978; 22: 971.
15. Dökmeci D, Özdemir F, Ulugöl A, Karadağ ÇH, Dökmeci İ ve Kokino S: Kronik adjuvant artritli sıçanlarda salmon kalsitonin ve bioptronun antinosiseptif etkilerinin karşılaştırılması. *Erciyes Tıp Dergisi* (baskıda).
16. Ulugöl A, Karadağ H, Dokmeci D, Dokmeci I: The role of H₁- and H₂-receptors in the effect of compound 48/80 in the asphyxiation and body temperature of mice. *Yonsei Med. J.* 1996; 37 (2):97-103.
17. Wada H, Inagaki N, Yamatodani A, Watanabe T: Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole-brain activity? *Trends-Neurosci.* 1991; 14 (9):415-418.
18. Bhattacharya SK and Parmar SS: Antinociceptive effect of intracerebroventricularly administered histamine in rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1985; 49:125-136.
19. Sibilìa V, Netti C, Guidobono F, Pecile A and Braga PC: Central antinociceptive action of histamine: Behavioral and electrophysiological studies. *Agents Actions* 1992; 36 (suppl. C):C350-C353.
20. Braga PC, Sibilìa V, Guidobono E, Pecile A and Netti C: Electrophysiological correlates for antinociceptive effects of histamine after intracerebral administration to the rat. *Neuropharmacology* 1992; 31:937-941.
21. Malmberg-Aiello P, Lamberti C, Ghelardini C, Giotti A and Bartolini A: Role of histamine in rodent antinociception. *Br. J. Pharmacol.* 1994; 111:1269-1279.
22. Chung YH, Miyake H, Kamei C and Tasaka K: Analgesic effect of histamine induced by intracerebral injection into mice. *Agents Actions* 1984; 15:137-142.
23. Netti C, Sibilìa V, Guidobono F, Villani P, Pecile A and Braga PC: Evidence for inhibitory role of central histamine on carrageenin-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology* 1994; 33:205-210.
24. Lamberti C, Bartolini A, Ghelardini C and Malmberg-Aiello P: Investigation into the role of histamine receptors in rodent antinociception. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1996; 53:567-574.
25. Gogas KR, Hough LB, Eberle NB, Lyon RA, Glick SD and Parsons ME: A role for histamine and H₂ receptors in opioid antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989; 259:476-484.
26. Chrubasik J, Chrubasik S and Martin E: Non-opioid peptides for analgesia. *Acta Neurobiol. Exp.* 1993; 53:289-296.