

## NÖROMÜSKÜLER İLETİDE KANAMISİN - KALSIYUM 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.

### ÖZET

Kanamisin sıçan frenik sinir diafragma kas preparatının indirekt stimülasyonunda kontaksiyonları inhibe etmektedir. Bu inhibisyon neostigminle antagonize edilemediği halde kalsiyumla önlenebilmektedir. Nöromüsküler kavşakta kalsiyum-kanamisin arasında bir antagonizma bulunduğu görülmüştür. Kalsiyum, Kanamisin'in LD<sub>50</sub> değerini büyük ölçüde değiştirmektedir.

### GİRİŞ

Aminoglikozid antibiyotiklerin nöromüsküler kavşakta iletiyi bloke ettiği 1957 yılında Vital Brazil ve Corrado<sup>10</sup> tarafından streptomisinle gösterilmiştir. Daha sonra çeşitli deney hayvanlarında bu konuda birçok araştırma yapılmıştır<sup>1,3,6,9</sup>. 1969'da yine Vital Brazil ve ark.<sup>11</sup> bu grup ilaçların nöromüsküler iletiyi bloke ederek solunum depresyonu oluşturduklarını ka-

nıtlamışlardır. *Albiero* ve ark.<sup>1</sup> 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 yoğunlaştırmıştır. Nöromüsküler kavşakta aminoglikozid antibiyotiklerin magnezyuma benzer etki gösterdikleri ve ekstrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun artırılmasıyla da inhibisyonun önlenebileceği ileri sürülmüştür<sup>7,9,10</sup>.

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 LD<sub>50</sub> değerini Behrens ve Karber yöntemiyle<sup>2</sup> saptadık ve in vivo olarak kanamisin - Ca<sup>++</sup> etkileşmesini gösterebilmek amacıyla önceden Ca<sup>++</sup> verilmiş hayvanlarda kanamisin'in LD<sub>50</sub> değerindeki değişimleri göstererek kanamisin'in akut toksisite değerinin kalsiyumla değişip değişmediğini araştırdık.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

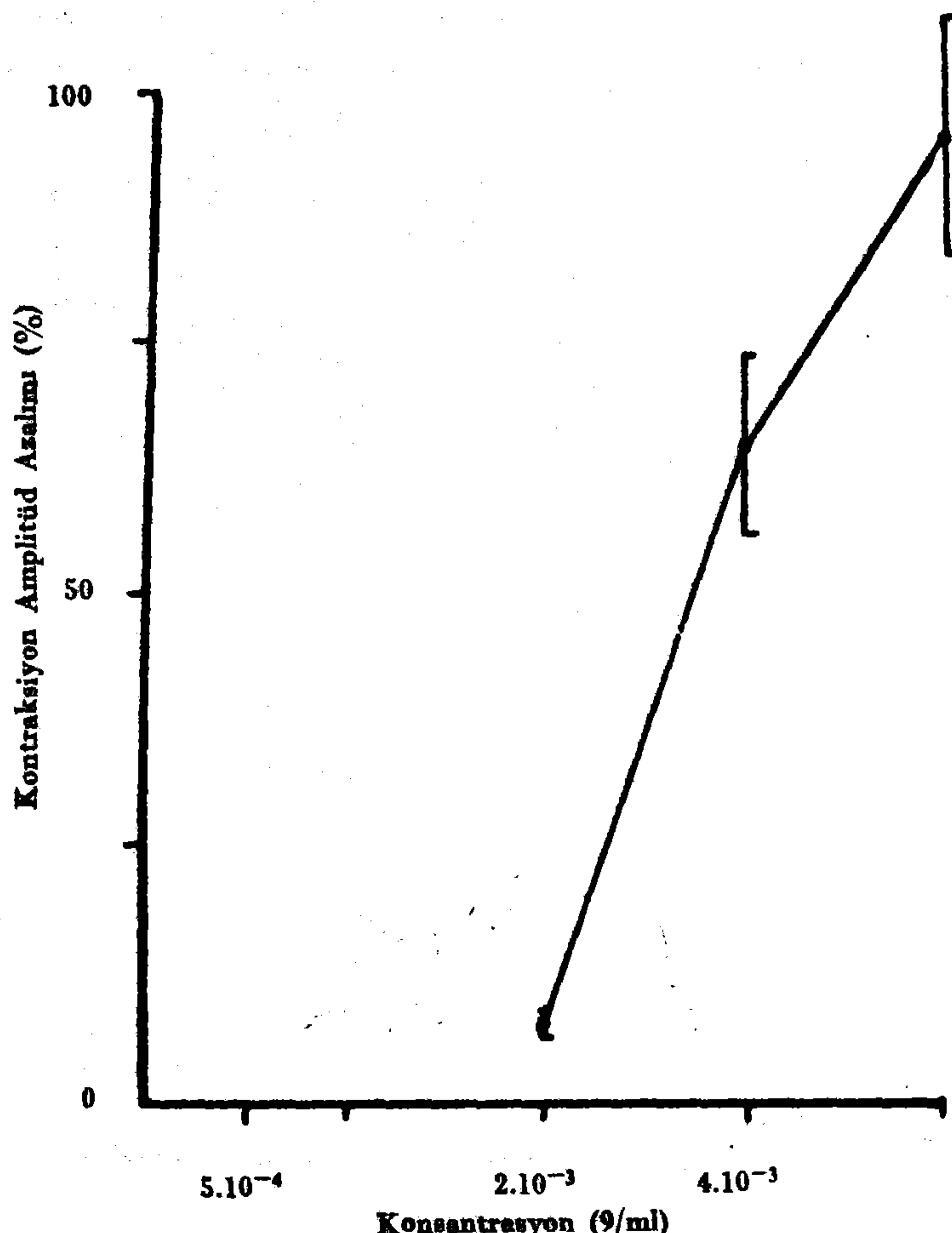
Araştırmamızda kullandığımız 12 adet frenik sinir - diafragma kası preparatı 260 ± 32 gr ağırlığındaki Swiss Albino türü sıçanlardan alınmıştır. Başına sert bir cisimle vurulduktan sonra boğaz bölgesi kesilerek kanı iyice akıtılan hayvanlarda son kostalar taban, frenik sinir ortada ve tendinöz kısım tepede olacak şekilde üçgen biçiminde kesilen diafragma, içinde Krebs solüsyonu bulunan ve % 95 O<sub>2</sub> ve % 5 CO<sub>2</sub> karışımıyla devamlı olarak oksijenize edilen 50 ml'lik bir izole organ banyosuna konulmuştur<sup>3</sup>. Preparata 1 gramlık istirahat gerilimi uygulanmıştır.

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

Deneyselimizin 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 karişımı Swiss Albino farelerde kanamisin'in i. p. yoldan  $LD_{50}$  değeri Behrens ve Karber metoduna göre saptandıktan sonra 10 dakika önce i. p. yolla 250 mg/kg CaCl<sub>2</sub> verilmiş farelere aynı yoldan kanamisin'in  $LD_{50}$  deizi her grupta belirli bir oranda artacak şekilde 10'ar hayvanlık 5 ayrı gruba uygulanarak yeni bir  $LD_{50}$  değeri bulundu.

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



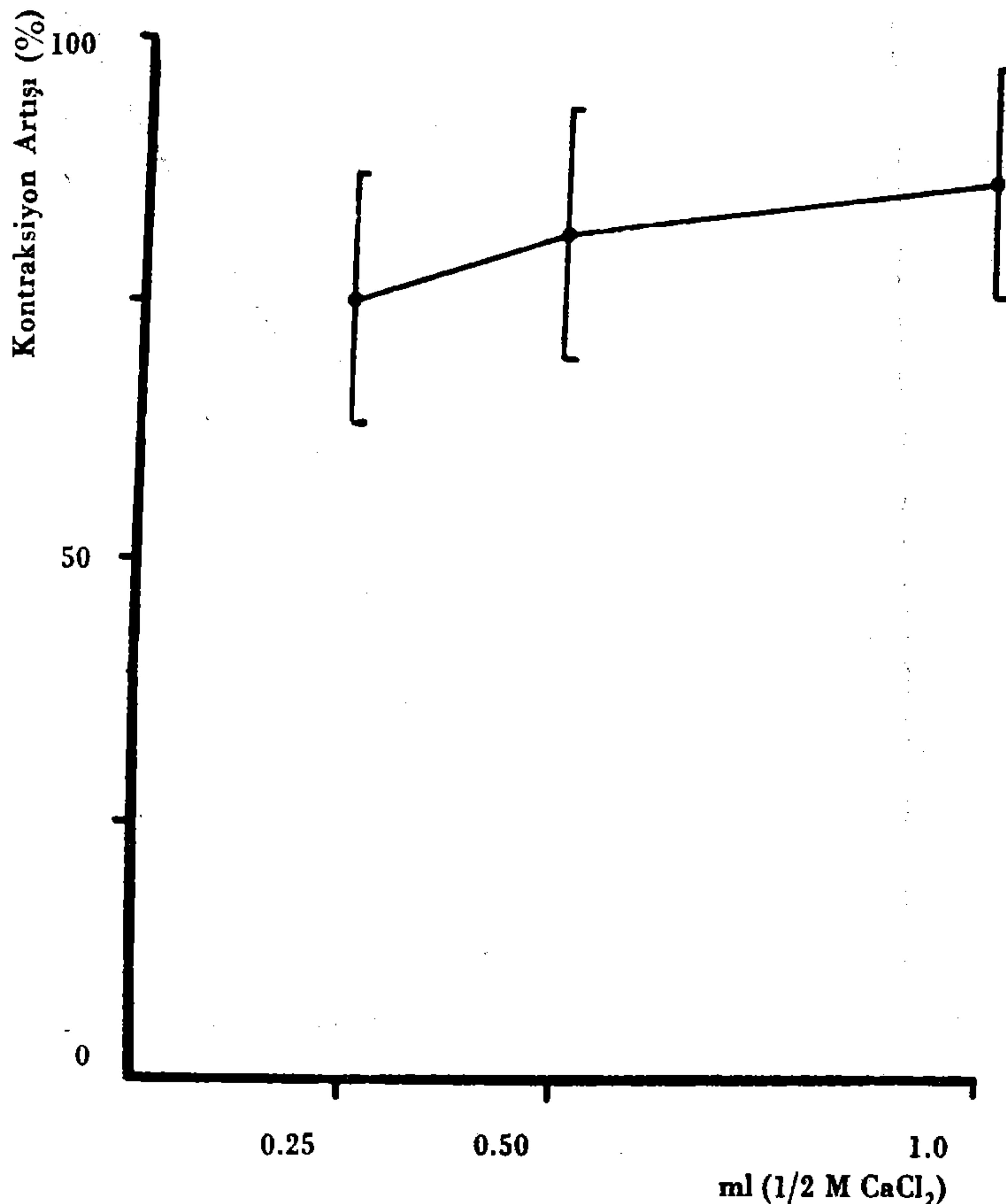
Şekil : 1. Kanamisin'in dosyanıt eğrisi.

## BULGULAR

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

a) Kanamisin frenik sinir - diafragma kası preparatının indirekt sti-mülasyonunda kontraksiyonları inhibe etmektedir. Besleyici sıvıya  $2 \cdot 10^{-3}$  g/ml konsantrasyonunda konan kanamisin kontraksiyonları ortalama  $\% 8 \pm 0,5$ ,  $3 \cdot 10^{-3}$  g/ml konsantrasyonunda  $\% 64 \pm 9$  ve  $4 \cdot 10^{-3}$  g/ml kon-santrasyonda ise  $\% 95 \pm 12$  oranında azalmaktadır (Şekil 1).

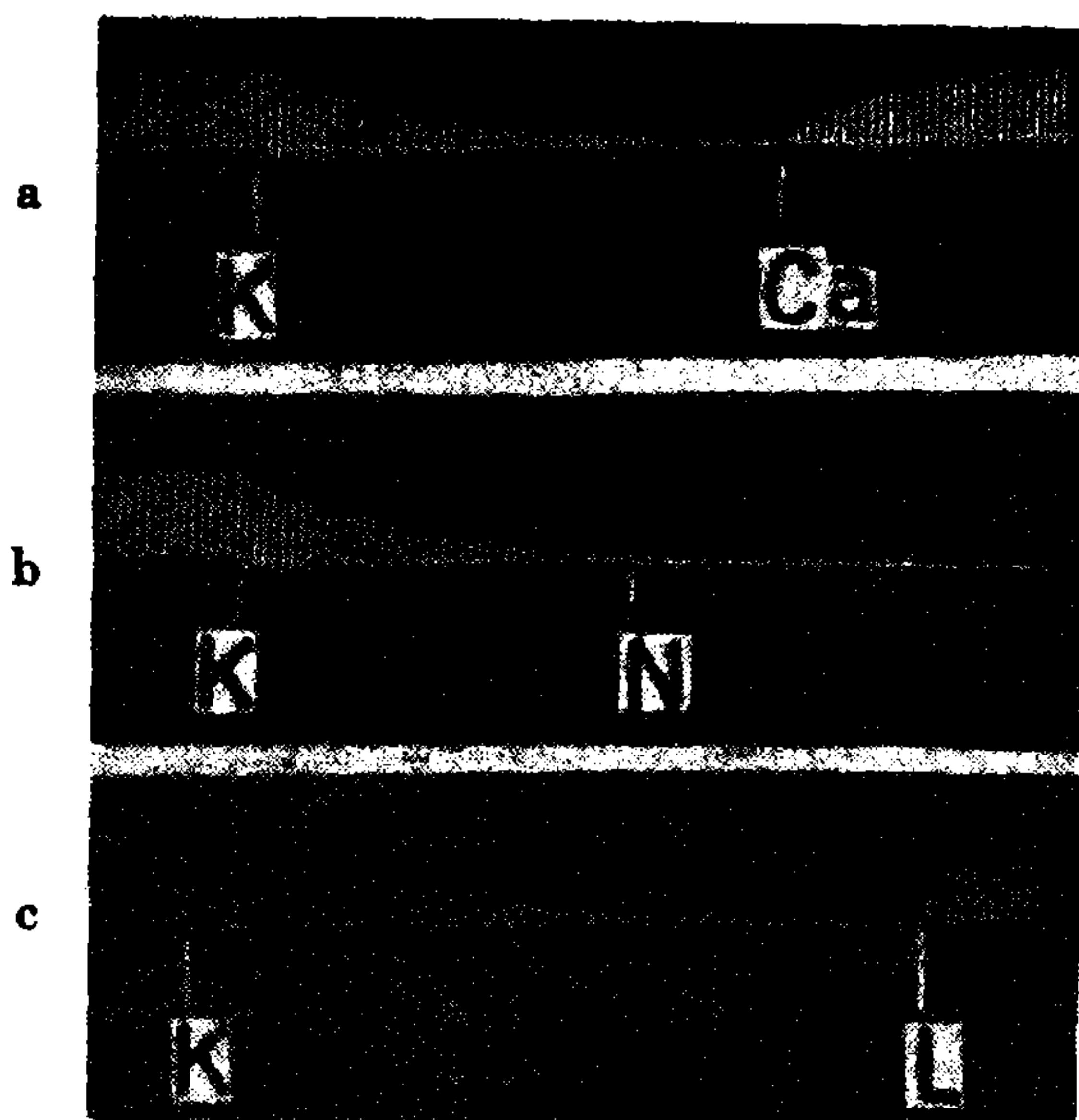
b) Kontraksiyon amplitüdünün kanamisin'le maksimum düzeyde azaltılmasından sonra besleyici sıvıya konan  $\text{CaCl}_2$ , inhibisyonları verilen dozla ilişkili olarak ters çevirmektedir. 50 ml lik banyoya  $1/2$  M  $\text{CaCl}_2$ 'den 0.25 ml



Şekil : 2. Kanamisin inhibisyonuna  $\text{CaCl}_2$ 'ün etkisi.

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

c) Kanamisin'in oluşturduğu nöromusküler 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 LD<sub>50</sub>'lık dozunun oluşturduğu inhibisyonu ters çevirebilmektedir.



Şekil : 3. Kanamisin (K) inhibisyonuna CaCl<sub>2</sub>(Ca), Neostigmin (N) ve lavaj (L)'nın etkileri.

Kanamisin inhibisyonundan sonra preparatın bir defa yıkanmasıyla inisiyal amplitüd ortalama 140 ± 25 saniye sonra elde edilebilmektedir.

## 2. Kanamisin LD<sub>50</sub> 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. LD<sub>50</sub> değeri saptandı.

## DÖKMECİ-NÖROMÜSKÜLER İLETİ VE KANAMISİN

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	4,5	9,5
ab	500	1125	1875	2375	

$$LD_{50} = LD_{100} - \frac{\Sigma ab}{n}$$

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

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

b) Önceden 150 mg/kg i.p.  $\text{CaCl}_2$  verilmiş 10'arlık 5 gruba ayrılmış farelere kanamisin'in değişik dozları uygulanarak (Tablo 2) yeni bir  $LD_{50}$  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	
b	1,5	3	5,5	8,5	
ab	206,25	600	1375	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  $\text{CaCl}_2$  dozlarını arttırarak kanamisin'in  $LD_{50}$  ( $1162,5 \text{ mg/kg}$ )'inden ileri gelen ölüm sayılarını gözledik (Tablo 3).

Tablo : 3.

Önceden Verilen $\text{CaCl}_2$ 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.<sup>9</sup> çeşitli aminoglikozid antibiyotiklerin oluşturduğu blokajın ortama katılan  $\text{Ca}^{++}$  iyonlarıyla önlendiğini göstermişlerdir. Yazalar 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  $\text{Ca}^{++}$  motor nöronda asetilkolin açığa çıkmasına sebep olarak nöromusküler aralığa dökülmekte ve fizyolojik olarak çizgili kasın kontraksiyonunu sağlamaktadır<sup>4</sup>. Kanamisin'in oluşturduğu inhibisyonun dışardan  $\text{Ca}^{++}$  vererek ortadan kaldırması, etkileşmenin sinir plağı veziküllerinde olduğunu göstermektedir.

*Vital Brazil* ve ark.<sup>11</sup>, kedi siyatik sinir tibialis arteriyör kası preparatında gentamisinin oluşturduğu blokajın neostigminle önlediğini 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  $\text{LD}_{50}$  değeri önceden terapötik dozda  $\text{CaCl}_2$  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 phrénique-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  $\text{LD}_{50}$  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  $\text{LD}_{50}$  of Kanamycin 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. Pharmak., **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 — DÖKMEÇİ, İ. : *Farmakoloji,* Diyarbakır Univ. Tip 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 streptomycine 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.