

FİZYOLOJİK NÜMUNELERDE ACETYLCHOLİNE MİKTARININ BİYOLOJİK YOLLA TAYİNİNDE M. RECTUS ABDOMİNİS'İN MÜTEADDİD DEFALAR KULLANILMASI

Ahmet NOYAN, D.V.M., Ph.D.

İkeda ve arkadaşları (8) kobay *ilem*'unda *circumferential* gerilme neticesi Acetylcholine miktarının azaldığını tesbit ettiler. Bu araştırmacılar *ileum* parçasını gerilmeye maruz bıraktıktan sonra kuru buz ile dondurup kum ile ezdiler ve barsak dokusunun acetylcholine miktarını tayin ettiler.

Biz, izole edilmiş barsak parçası, izole organ banyosunda ritmik kontraksiyonlarına devam ederken, lumenine hava vererek gerdikten sonra banyo sıvısı içindeki acetylcholin miktarını kurbağa *rectus abdominis* kası ile tayin ediyorduk. Bu çalışma sırasında bir gün kurbağamız tükendi; halbuki ertesi günü deneylerimize devam etmemiz gerekiyordu. O gün deneylerde kullandığımız *rectus abdominis* kasını Ringer eriyiği içinde buz dolabında (4° C) 24 saat muhafaza ederek ertesi gün acetylcholine tayini için tekrar kullanmayı denedik. Elde edilen sonuç, bir gün evvel kas taze iken elde edilen sonuçlardan daha mükemmeldi. Bu olay karşısında, bir tek kurbağa *rectus abdominis* kasını acetylcholine tayini için müteaddid defalar kullanılması mümkün olup olmayacağını araştırdık.

MATERYAL VE METOD

Kurbağa (*Rana esculenta*) dekapite edildikten sonra kurbağa tahtasına sırt üstü yatırılıp ayakları toplu iğnelerle tesbit edildi. Karın derisi median hat üzerinden kesilip iki tarafa doğru disseke edildi. Her iki *m. rectus abdominis* bir arada olmak üzere *pelvis* kemiğine ekli oldukları yerden ayrıldılar. Diğer uçlarının bağlı olduğu *pectoral cartilago*'nun bir kısmı, kaslara ekli olarak, kesildi. İki kasın birleştiği median hat üzerinden kesilerek sağ ve sol *m. rectus abdominis*'ler birbirinden ayrıldılar. Kasların her iki ucuna birer parça incc iplik bağlandı ve kaslar 1: 100 000 nisbetinde eserine sulphate taşıyan kurbağa Ringer eriyiğinde 30 dakika bırakıldılar.

Kullanılan kurbağa Ringer eriyiğinin terkibi şöyle idi: Na Cl 9 g.; K Cl 0.42 g.; Ca Cl₂ 0.24 g.; Na HCO₃ 0.50 g.; dextrose 1 g.; Çekilmiş su 1000 smk. Memeli hayvan Ringer eriyiği olan bu eriyiğin 100 smk'ü çekilmiş su ile 140 smk'e tamamlanarak kurbağa Ringer eriyiği hazırlandı (2).

Bu kurbağa Ringer'in bir litresine 0.01 gram eserine sulphate ilâve edilerek (1: 100 000) eserine'li Ringer hazırlandı.

Otuz dakika eserine'li Ringerde kalan kas, 10 smk'lük bir tüp içine yerleştirildi. Kasın bir ucu (sabit uç) tübün içindeki hava borusuna bağlandı. Öteki ucu (serbest uç) Palmer Fabrikası mamûlatı Gimbal yazdırıcı ucuna bağlandı ve acetylcholine etkisi altında kasılan kasın hareketi isli kâğıt üzerine yazdırıldı. Deney devamınca tübün içine küçük habbeler halinde hava verildi. Bütün deneyler oda derecesinde yapıldılar.

Standart acetylcholin eriyikikleri için evvelâ 0.1 g. acetylcholine chloride 100 smk. Ringer içinde eritilerek 10⁻³ ana eriyik hazırlandı. Bu ana eriyikten 10⁻⁴ den 10⁻¹⁰ a kadar olan standart eriyikler, aşağıda terkibi verilmiş olan bikarbonatsız Ringer içinde hazırlandılar. Bikarbonatsız Ringer:

% 1 Ca Cl₂' den 1.00 smk.

% 1 K Cl' den 0.75 smk.

% 0.6 Na Cl ile 100 smk.'e tamamlandı.

Standart ana eriyik hergün yeniden hazırlandı. Diğer standartlar tecrübe-ye başlanacağı zaman hazırlandılar.

Standart eriyikler 10⁻¹⁰ nisbetinden başlanarak 10⁻⁵ e kadar sıra ile tatbik edildiler. Her standart eriyik kas ile 90 saniye temasta bırakıldı ve sonra boşaltıldı. Kas bir defa, tübün içine kurbağa Ringer,i koyup hemen boşaltılmak suretiyle acetylcholine bulaşığından temizlendi. Sonra tübün içi eserine'li Ringer ile dolduruldu ve kontraksiyon yapmış kasın gevşeyip yazdırıcı ucun esas hatta inmesi için 15 dakika beklendi. Yazdırıcı uç 15 dakikadan evvel esas hatta inebilse dahi iki deney arasında mutlaka 15 dakika aralık verildi. Böyle yapılmakla kasın bir sonraki standart eriyiğe daha iyi reaksiyon verdiği görüldü.

Her kasın günde bir defa 10⁻¹⁰ dan 10⁻⁵ e kadar acetylcholine eriyiklerine gösterdiği reaksiyonlar traselerle tesbit edildi ve bu şekilde her kas en az bir hafta müddetle her gün deneye alındı. Her günkü deneyden sonra kaslar âletten çıkarılıp Ringer eriyiği içinde buz dolabında (4° C) muhafaza edildiler. Deney yapılacağı zaman kas buz dolabından çıkarıldı; eserine'li Ringerde 30 dakika bırakıldıktan sonra acetylcholine'in miktarı tayinleri için kullanıldı.

SONUÇLAR

Deneylere ait bir seri trase numunesi ŞEKİL 1' de gösterilmiştir. Bu traseler birinci günden altıncı güne kadar aynı kasın reaksiyonlarını göstermektedirler. Her gün 10^{-10} dan 10^{-6} e kadar standart acetylcholine eriyiklerinin etkileri verilmiştir.

Traselerden görüldüğü gibi, birinci gün kasın 10^{-10} acetylcholine'e gösterdiği reaksiyon pek hafiftir. Fakat bundan sonraki konsantrasyonların yavaş, yavaş merdiven varî bir artış göstermesi sebebiyle, çeşitli konsantrasyonların mukayesesi mümkündür (ŞEKİL 1).

İkinci gün, bilhassa küçük dozlara, kasın gösterdiği reaksiyonlar fevkalâdedir ve çeşitli dozların mukayesesi gayet kolaylıkla yapılabilir (ŞEKİL 1).

Üçüncü gün 10^{-10} ve 10^{-9} aynı reaksiyonu gösterdiler; fakat kontraksiyon yüksekliği birinci günden çok iyidir. Esasen *rectus abdominis* kasının bu derece küçük dozlara aynı reaksiyonu göstermesi sık rastlanan bir olaydır.

Dördüncü gün küçük dozlara karşı kontraksiyon yüksekliği biraz düşmüş olmakla beraber çeşitli dozların mukayese imkânı iyidir (ŞEKİL 1)

Beşinci ve altıncı günlerde küçük dozların yarattığı kontraksiyonlar git-tikçe azalmışlar fakat gene de birinci günden daha iyi, hiç değilse onun kadar iyidir.

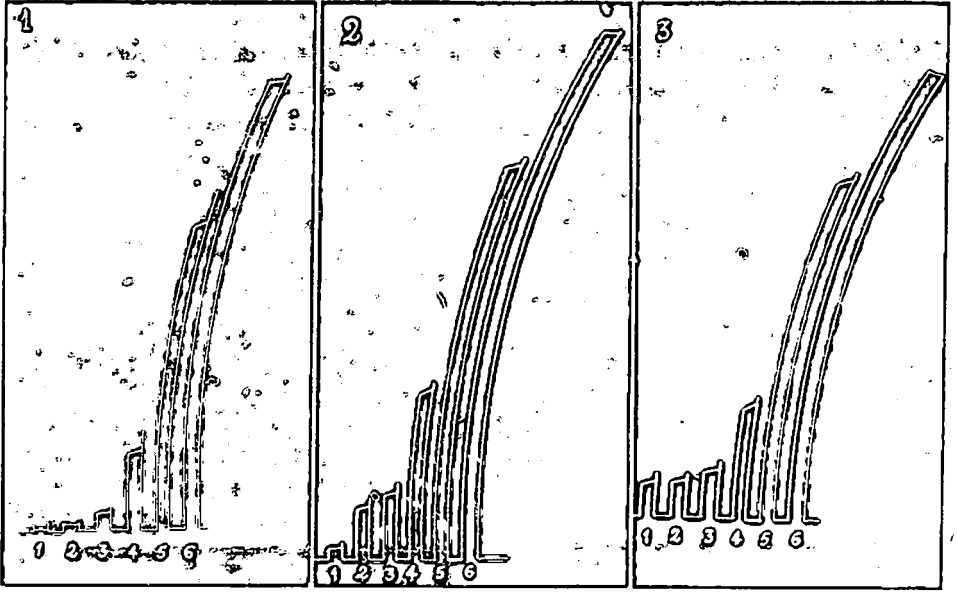
Deneylerimizde en iyi reaksiyonlar ekseriya ikinci ve üçüncü günler - bazan dördüncü gün de dahil - görüldüler.

TARTIŞMA

Acetylcholine'in biyolojik yolla miktarı tayininde çeşitli preparatlar kullanılır. Goodman ve Gilman (5) çeşitli preparatların reaksiyon verdiği en küçük dozları şöyle sıralıyorlar :

	Litrede mikrogram
Sülük kası (eserinize)	2
Tavşan kulağı (eserinize)	4
Kurbağa kalbi	10
Fare ince bağırsağı	10
Tavşan ince bağırsağı	20
Kurbağa m. <i>rectus abdominis</i> 'i	20
Kedi m. <i>gastrocnemius</i> 'u	100

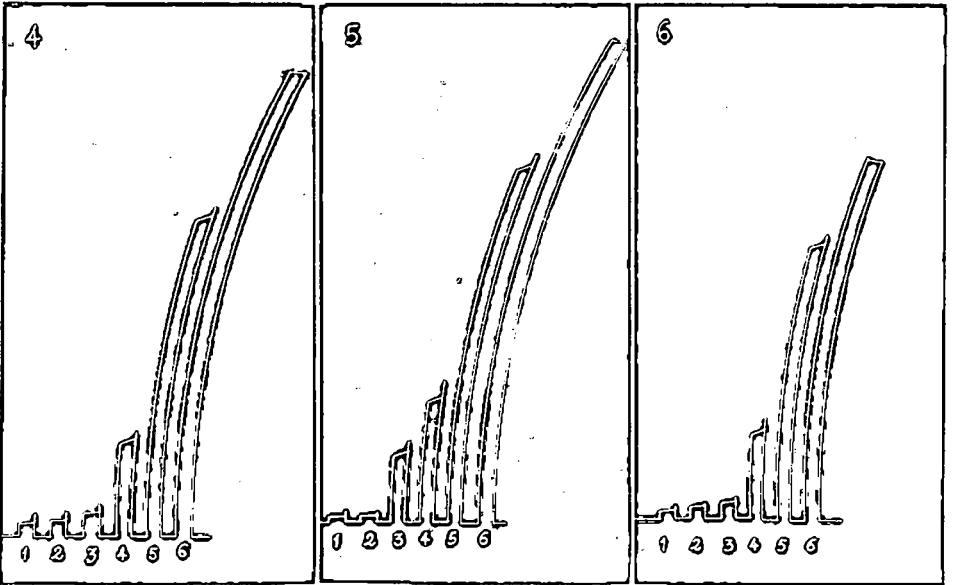
Negrete ve arkadaşları (13) çeşitli sülük cinslerinin sırt kaslarında acetylcholin miktarını tayin etmişler ve her sülük cinsinin acetylcholine'e karşı hassasiyetinin aynı olmadığını görmüşler. Bentley ve Shaw (1) kobay ileum'u ile



1. Gün

2. Gün

3. Gün



4. Gün

5. Gün

6. Gün

ŞEKİL 1. Rectus abdominis kasının çeşitli konsantrasyonlardaki acetylcholine eriyiklerine gösterdiği reaksiyonlar. (1) = 10^{-10} , (2) = 10^{-9} , (3) = 10^{-8} , (4) = 10^{-7} , (5) = 10^{-6} , (6) = 10^{-5} .

acetylcholine miktarı tayini için bir metod veriyorlar ve bu metodla iyi sonuçlar alınmış olduğu yazılarından anlaşılıyor. Kobay ileum'u metodu Tidball (15) tarafından kullanılmış ve 1 smk'te 0.002 - 0.008 mikrogram acetylcholine miktarları tayin edilmiş. Chang ve Gaddum (3) acetylcholine tayininde çeşitli preparatların mukayeseli bir araştırmasını yapmışlar. Kurbâğa kalbi, tavşan barsağı, kedi *gastrocnemius*'u, kurbağ *rectus abdominis*'i ve sülük kası üzerindeki bu araştırmalarında en iyi sonuçları kurbağ *rectus abdominis*'i ve sülük adelesi ile elde ettiklerini bildiriyorlar.

Lewis ve Smallman (11) çeşitli insekt cinslerinde ve bu arada ev sineğinin kafasında acetylcholine miktarını *rectus abdominis* kası ile tayin ettiler.

Son yıllarda acetylcholine'in biyolojik yolla tayini için bazı araştırmacılar bir nevi midye olan *Mya arenaria*'nın kalbini kullandılar (7,12). Bu araştırmacılara göre bahis konusu midyenin kalbi acetylcholine'e karşı çok hassastır ve etki gösteren minimum doz 0.005 - 0.05 mikrogramdır. (12).

Kobay barsağında acetylcholine salınma miktarını tayin ederken *rectus abdominis* kası kullanan Schaumann (14), izole barsak banyosunu yarı yarıya N/100 HCI ile sulandırdıktan sonra kas üzerindeki reaksiyonunu deniyor. Bilindiği gibi acetylcholine alkali vasatta çabuk harap olur (5,6). Yazarın bunu düşünerek acetylcholine ariyiğini asit eriği ile sulandırmış olması ihtimalini düşünerek biz de koyun barsağının acetylcholine miktarını tayin ederken aynı miktar (N/100) hidroklorik asitle sulandırarak denedik ve çok yüksek kontraksiyon elde ettik.

Bu çok yüksek kasılma barsakta bulunması imkânsız bir acetylcholin miktarına delâlet ediyordu. Bunun üzerine, sadece yüksek hidrojen konsantrasyonunun, yani asiditenin kası lüzumundan fazla kontraksiyona sevkdebileceğini düşünerek hiç acetylcholine taşımayan Ringer eriyiğini yarı yarıya N/100 HCI ile sulandırıp kas üzerinde denedik. Eriyik acetylcholine taşımadığı halde, sadece asiditenin etkisi ile, yüksek kontraksiyon gösterdi.

Bu olayı burada kaydetmekten maksadımız, asiditesi yüksek eriyiklerin, acetylcholine taşımasa bile, kası kontraksiyona sevkettiğini *rectus abdominis* kası ile çalışacak olanların dikkat nazarına arz etmektir.

Birçok araştırmacılar *rectus abdominis* kası üzerine acetylcholine etkisini potansiye eden, yani daha yüksek kasılma yaratan, maddeleri incelediler. (4, 9, 10, 16).

Bizim araştırmamızda ise başka bir madde kullanmadan sadece Ringer içinde muhafaza etmekle, kasın acetylcholine'e, bilhassa küçük dozlara karşı reaksiyonu artırılmıştır.

NETİCE

Bir tek *rectus abdominis* kasının acetylcholine miktarı tayininde her gün tecrübeye alınmak şartıyla en az altı gün kullanılabilceği gösterildi. Deneyler arasındaki zamanlarda kasın Ringer eriyiği içinde buz dolabında (4°C) muhafaza edilmesiyle birinci günü müteakip günlerde, bilhassa küçük dozlardaki acetylcholine'e karşı daha iyi reaksiyon gösterdiği tesbit edildi. Buna göre, kasın acetylcholine'e karşı reaksiyonunun en tabii yoldan potansiye edildiği gösterildi.

Bu olay iki yönden önem taşımaktadır: (1) buz dolabında saklanarak tekrar kullanılan kasın, taze kastan daha iyi reaksiyon verdiğini göstermiştir, bu da küçük dozlardaki acetylcholine tayininin daha emin olmasını sağlamıştır; (2) altı kurbağa yerine bir kurbağa kullanmanın mümkün olduğunu göstermiştir; bu ise ekonomik bir önem taşımaktadır.

Kasın acetylcholine'e karşı gösterdiği reaksiyonun potansiye edilmesinin sebebi, Ringer eriyiğindeki bazı iyonların zamanla kasa girmesi olabilir.

ÖZET

1 — Acetylcholine miktarını biyolojik yolla tayin için bir tek kurbağa *rectus abdominis* kasının müteaddid defalar kullanılma imkânı araştırıldı.

2 — Her gün bir defa deneye alınan ve deneyler arasındaki zamanlarda Ringer eriyiği içinde buz dolabında (4°C) muhafaza edilen kaslar en az bir hafta müddetle denendiler. Her kasın en az altı gün muvaffakiyetle kullanılabilceği görüldü.

3 — Birinci günden sonraki birkaç gün içinde kasın acetylcholine'e karşı, bilhassa küçük dozlar için, hassasiyetinin arttığı ve yüksek kontraksiyon verdiği müşahede edildi.

4 — Bu şekilde *rectus abdominis* kasının acetylcholine'e karşı reaksiyonunun en tabii yoldan potansiye edilmesi iki yönden önem taşımaktadır: (a) Ringer içinde buz dolabında muhafaza edilerek kullanılan kasın reaksiyonları taze kastan daha iyidir ve küçük dozlardaki acetylcholine tayinleri daha emin olarak yapılabilir; (b) altı kurbağa yerine bir kurbağa kullanmak gibi ekonomik bir önemi vardır.

SUMMARY

REPEATED USE OF RECTUS ABDOMINIS MUSCLE
FOR THE BIOASSAY OF ACETYLCHOLINE

1 — The possibility of the repeated use of a single *rectus abdominis* muscle for the bioassay of acetylcholine was investigated.

2 — It was found that one rectus muscle could be used successfully six days in succession for the bioassay of acetylcholine, provided that the muscle was kept in an ice box (4° C) in Ringer's solution during the time, in which the muscle is not being used for experimentation.

3 — It was found that during several days following the first day the sensitivity of muscle to acetylcholine increased. This increased sensitivity was especially pronounced for the small doses of acetylcholine, e.g., 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} .

4 — It is concluded that these findings are important for two reasons: (a) economical standpoint, because one frog instead of six could serve the purpose; (b) keeping the muscle in ice box (4° C) in Ringer's solution increases its response to acetylcholine and gives better interpretation than the fresh muscle for the small doses of acetylcholine.

Referensler

- 1 — Bentley, G. A., and Shaw, F. H. : The separation and assay of Acetylcholine in tissue extracts. *J. Pharmacol. and Exper. Therap.* 106: 193 (1952).
- 2 — Burn, J. H. : Practical pharmacology. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1952).
- 3 — Chang, H. C., and Gaddum, J. H. : Cholin esters in tissue extracts. *J. Physiol.* 79: 255 (1933). *Berich. gesamt. Physiol. u. exper Pharmacol.*, 80: 162 (1934).
- 4 — Fleisher, J. H., ; Howard, J. W., and Corrigan, J. P. : Effect of. Pyridine aldoximes on response of frog rectus muscle to ACh. *Brit. J. Pharmacol.*, 13: 288 — 290. (1950).
- 5 — Goodman, L., and Gilman, A. : The Pharmacological basis of therapeutics. The MacMillan Co., New York (1948).
- 6 — Harris, D. T. : Experimental physiology. 4. Edition. J. and A. Churchill Ltd., London (1947).
- 7 — Hughes, B. : Isolated heart of *Mya arenaria* as a sensitive preparation for assay of acetylcholine. *Brit. J. Pharmacol.*, 10: 36 — 38 (1955).
- 8 — Ikeda, M., Hayama, T., Chujyo, N., and Hoshi, A. : Acetylcholine content in the stretched wall of intestine. *Am. J. physiol.* 192: 27 — 29 (1958).
- 9 — Jenden, D. J. : Quantitative interpretation of eserine - acetylcholine interaction in the frog rectus abdominis. *J. cell. comp. Physiol.* 51: 309 — 323 (1958). *Internat. Abst. Biol. Sci.*, 14: 471 (1957).
- 10 — Koppányi, T., and Feeney, G. C. : Newly found action of cocaine. *Science* 129: 121 — 152 (1959).
- 11 — Lewis, S. E., and Smallman, B. N. : Estimation of acetylcholine in insects. *J. Physiol.*, London, 134: 241 — 256 (1956).
- 12 — Meeter, E. : Heart of *Mya arenaria* as a test object for acetylcholine (ACh). *Acta physiol. pharmacol. Neederl.*, 4: 233 — 242 (1955).

- 13 — Negrete, J. ; Mariel, S. , and Camara, P. S. : Sensitivity to acetylcholine of certain leeches and their use in its estimation. (Ispanyolca). Bol. Inst. Estud med. biol. Mexico, 14: 27 (1956). Internat. Abst. Biol. Sci. , 7: 333 (1957).
 - 14 — Schaumann, W. : Inhibition by morphine of the release of acetylcholine from intestine of the guinea pig. Brit. J. Pharmacol. , 12: 115—118 (1957).
 - 15 — Tidball, M. E. : Relationship between acetylcholine and tonus in isolated rabbit intestine. Am. J. Physiol. , 197: 561 (1954).
 - 16 — Torda, A. , and Wolff, H. G. : Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 57: 236 (1944). Gersch, M. , und Deuse, R. : Pflügers Archiv, 265: 11 (1957) den site edildi.
-