

Amitrazın Kobay İncebağrsak Motilitesi Üzerine Etkisi

Vedat SAĞMANLIĞİL, İlksin PİŞKİN, Meltem ŞİRELİ

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Ayhan FİLAZİ

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 23.12.1999

Özet : Bu çalışmada 300-350 g ağırlığında 14 adet beyaz kobay iki eşit gruba ayrılarak kullanıldı. Bu hayvanlardan alınan ince bağırsak parçaları (distal ileum) *in vitro* koşullarda izole organ banyosunda tutularak, bu dokulara amitraz ve asetilkolin uygulaması sonucunda oluşan izotonik kasılmalar poligrafta yazdırıldı. İlk gruba ait 7 adet dokuya amitraz 10^{-8} M'dan 10^{-3} M'a kadar olan konsantrasyonlarda yalnız (kontrol), verapamilin (3×10^{-5} M) varlığında ve Ca^{++} suz ortamda verilerek her üç koşula ait konsantrasyon-cevap eğrileri elde edildi. İkinci grup dokulara (7 adet) ise asetilkolin 3×10^{-5} M'lık konsantrasyonda yalnız (kontrol), amitrazın bu doku için etkili olduğu belirlenen 10^{-3} M'lık konsantrasyonu ile verapamilin (3×10^{-5} M) varlığında ve son olarak Ca^{++} suz ortamda verilerek hem amitraz ve hem de asetilkolin uygulaması sonucunda elde edilen cevaplar kendi aralarında karşılaştırıldı.

Amitrazla kobay distal ileumunda yapılan kümülatif konsantrasyon cevap eğrisi, amitrazın 10^{-8} - 10^{-4} M'lık konsantrasyonlarda çok küçük boyutta kasılmalar oluşturduğunu, 10^{-3} M'lık konsantrasyonda ise diğerlerinin 3-4 katı büyüklüğünde bir cevap alındığını gösterdi. Öte yandan asetilkolin kaynaklı kasılım amitrazın bu doku için etkili olan konsantrasyonu ile azalmazken, asetilkolin ve amitrazın distal ileumda oluşturduğu kasılımda Ca^{++} 'un önemli bir rol oynadığı tespit edildi.

Anahtar Sözcükler : Amitraz, ince bağırsak, motilite, kobay

The Effects of Amitraz on the Motility of Guinea Pig Small Intestine

Abstract : In this study, 14 adult albino guinea pigs, weighing 300-350 g, were divided into two equal groups. The small intestinal segments (distal ileum) taken from the animals were kept *in vitro* in the isolated organ bath, and the isotonic contractions of the tissues produced by amitraz and acetylcholine were recorded on a polygraph. For the first group, tissues belonging to the seven animals, the cumulative concentration-response curves of amitraz were obtained and compared by applications at concentrations from 10^{-8} M to 10^{-3} M in three different conditions alone, in the presence of verapamil (3×10^{-5} M) and in Ca^{++} free solution. For the second group, tissues taken from the other seven animals, the responses to acetylcholine (3×10^{-3} M) were compared with it given alone (control), in the presence of amitraz at the effective dose for this tissue (10^{-3} M), verapamil (3×10^{-5} M) and finally in Ca^{++} free solution.

The cumulative concentration-response curves of amitraz showed that amitraz at a concentration of 10^{-3} M created a contraction 3-4-fold that of the others produced by a concentration of 10^{-8} - 10^{-4} M. It was also observed that Ca^{++} played a big role in acetylcholine and amitraz-induced contractions while the contraction produced by acetylcholine was not reduced by the effective concentration of amitraz for the tissue.

Key Words : Amitraz, small intestine, motility, guinea pig

Giriş

Amitraz (N-2,4 (dimetilfenil)-N-[(2,4-dimetilfenil)-imino]metil]-N-metanimidamit) formamidin türü bir insektisit olup sığırlarda kene, köpeklerde ise sıklıkla uyuzun tedavisinde (1) ve meyve ağaçlarının ilaçlanmasında (2) kullanılmaktadır. Atlarda kullanıma bağlı olarak durgunluk, bağırsak içeriğinin geçişinde uzama ve bazen de kalın bağırsaklarda "impaction colic"

şeklinde ortaya çıkan zehirlenme olaylarına rastlanılmaktadır (3,4).

Amitrazın fare ve köpeklerde içeriğin mide bağırsak kanalından geçiş süresini uzattığı (5,6), yine amitraz ve bir yıkımlanma ürünü olan BTS27271'in atlarda bağırsak motilitesini azalttığı (7) şeklinde bildirimler bulunmaktadır. Koyunlarda amitraz ve BTS27271'in sekum motilitesini birden durdurduğu (8), kobay

ileumunda ise H₁ histamin antagonisti özelliği gösteren bu iki maddenin ritmik kontraksiyonları artırabildiği vurgulanmıştır (9). Amitraz ve BTS27271 ile domuz uterus kasında yapılan bir çalışmada ise (10), bu maddelerin doza bağlı olarak artan kasılma neden oldukları ve bu etkinin α_2 adrenoseptörlerince düzenlendiği, ayrıca hücre dışı Ca⁺⁺'un artmasının bu etkiyi sağlayan temel neden olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, çoğunlukla bağırsak üzerine olan etkisine *in vivo* koşullarda bakılan amitrazın, *in vitro* koşullarda kasılım açısından iyi cevaplar veren kobay distal ileumu üzerine etkisini gözlemek ve bu konuda farklılıklar gösteren çalışmalarla karşılaştırarak mekanizması hakkında fikir sahibi olabilmektir.

Materyal ve Metot

Araştırmada, 300-350 g ağırlığında 14 adet beyaz, ergin kobay yem ve suları *ad libitum* verilerek muhafaza edildi ve kullanıldı. Kobaylar, 0,2 ml ketalar deri altı yolla verilerek sakinleştirildi ve boyun eklemlerinden kırılarak öldürüldü. İlk olarak karın bölgesi makasla kesilerek açıldı ve sekumla ileumun birleşme yerinin 5 cm kadar yukarısından alınan 2 cm boyutundaki distal ileum "Tyrode" çözeltisi (gram cinsinden, NaCl, 8; KCl, 0,2; CaCl₂, 0,2; MgCl₂, 0,1; NaHCO₃, 1; NaH₂PO₄, 0,05 ve distile su 1 lt) içerisine kondu. Daha sonra bağırsak parçası etrafındaki mezenter ve yağ dokudan dikkatlice temizlenerek tümü içinde 30 ml "Tyrode" çözeltisi bulunan ve % 95 O₂, % 5 CO₂ ile sürekli havalandırılan cam tüp içerisinde olacak şekilde alt ucu bu tüp içerisindeki aparata bağlanırken, üst ucu izotonik kasılımları algılayacak transdüser (Nihon Kohden SB-IT) asılarak 60 dakika bekleme süresini (dokunun denge için) takiben elde edilen cevaplar poligraf (Nihon Kohden PMP-3104) yardımıyla yazdırıldı.

Başlangıçta 7 adet kobayın distal ileumuna DMSO (dimetil sülfoksit) içinde çözdürülen amitraz değişik konsantrasyonlarda (10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³ M) 10'ar dakika arayla kümülatif olarak verildi. Ayrıca aynı miktarda DMSO (250 µl) tekrar dokuya verilerek amitrazla elde edilen cevaplarda çözücü olarak bir katkısının olup olmadığı kontrol edildi. Daha sonra amitrazın aynı konsantrasyonları, 3x10⁻⁵ M verapamilin

(10) verilmesinden 10 dakika sonra, son olarak da içinde Ca⁺⁺'un olmadığı "Tyrode" çözeltisinde 10'ar dakika arayla kümülatif olarak tekrarlandı.

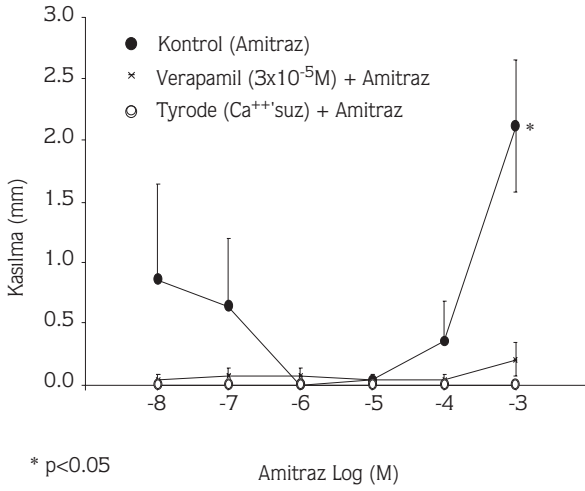
Denemenin ikinci bölümünde kalan yedi hayvana ait distal ileumlara bu kez ilk olarak asetilkolinin bir önceki çalışmada (11) kobay distal ileumu için etkili olduğu belirlenen 3x10⁻⁵ M'lık konsantrasyonu kontrol değeri olarak yalnız, ikinci ve üçüncü olarak denemenin ilk bölümünde amitrazın kobay distal ileumu için tespit edilen 10⁻³ M'lık konsantrasyonu ve verapamilin (3x10⁻⁵ M) verilmelerinden 10'ar dakika sonra, dördüncü ve son olarak da içinde Ca⁺⁺'un olmadığı "Tyrode" çözeltisinde tekrarlandı.

Amitrazın kümülatif olarak verilmesinden dolayı onun konsantrasyonları dışında her uygulama arasında doku ikişer kez yıkandı. Asetilkoline ait cevaplar genelde kasılımın tam olduğu 30. saniyedekiler, amitraz için ise 2. dakikadakilere dikkate alınarak milimetrik olarak değerlendirildi.

Amitrazın yalnız ve diğer iki ortamda (verapamilli ve Ca⁺⁺'suz) oluşturduğu kasılım cevapları ve yine asetilkolinin yalnız (kontrol) ve diğer üç ortamda (amitrazlı, verapamilli ve Ca⁺⁺'suz) oluşturduğu kasılım değerleri arasındaki farklılıkların istatistiksel yönden önemli olup olmadığını ortaya koymak amacıyla varyans analizi ve farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu bulmak için Duncan testi (MS windows için 5.0 paket SPSS paket program) uygulandı. Önemlilik düzeyi olarak p<0,05 kabul edildi.

Bulgular

Distal ileumda, amitrazın 10⁻⁸ M-10⁻⁴ M arasındaki konsantrasyonlarda önemli bir kasılım oluşturmadığı bu nedenle verapamilin (3x10⁻⁵ M) varlığında ve Ca⁺⁺'un olmadığı ortamda elde edilen cevaplarla aralarında istatistiksel yönden bir fark olmadığı tespit edildi. Buna karşın, amitrazın 10⁻³ M konsantrasyonda yalnız kullanımında (kontrol) 2,1 mm boyutunda bir kasılım yarattığı, bu cevabın verapamil ile boyutunun % 90 azalarak 0,21 mm'ye düştüğü, Ca⁺⁺'un olmadığı ortamda ise bu etkinin tamamen ortadan kalktığı ve bu azalışların istatistiksel yönden önemli (p<0.05) olduğu gözlenmiştir (Şekil 1).



* p<0.05

Amitraz Log (M)

Şekil 1. Kobay distal ileumunda amitrazın değişik konsantrasyonlarda yalnız, verapamilin ($3 \times 10^{-5} M$) varlığında ve Ca^{++} 'suz ortamda oluşturduğu kasılma cevapları. Değerler aritmetik ortalama standart hata şeklinde verilmiş olup, n=7 dir.

Öte yandan, DMSO'nun kontrol amaçlı olarak dokuya verilmesi sonucunda herhangi bir etki yapmadığı tespit edildi.

Distal ileumda asetilkolinin $3 \times 10^{-5} M$ konsantrasyonda kullanılması sonucu başlangıçta asetilkolin ile gözlenen 10,4 mm'lik kasılmanın (kontrol), amitrazla önem ifade edecek boyutta değişmediği (9,7 mm), buna karşın verapamil ($3 \times 10^{-5} M$) ile yaklaşık % 83 oranında azalarak ($p < 0.05$) 1,8 mm'ye düştüğü, "Tyrode" solusyonunda Ca^{++} 'un olmaması durumunda ise yaklaşık olarak % 90 azalarak ($p < 0.05$) 1 mm'lik bir kasılım olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1). Ayrıca, asetilkolinin amitrazın varlığında oluşturduğu kasılım ile verapamilli ve Ca^{++} 'suz ortamda oluşturduğu kasılımlar arasındaki farklılıkların da istatistiksel yönden önemli ($p < 0.05$) olduğu, buna karşın asetilkolin ile son iki ortamda (verapamilli ve Ca^{++} 'suz) elde edilen boyutsal olarak düşük kasılım cevapları arasında bir fark olmadığı görülmektedir.

	Kontrol	Amitraz ($10^{-3} M$)	Verapamil ($3 \times 10^{-5} M$)	Ca^{++} 'suz ortam
	$\bar{x} \pm Sx$	$\bar{x} \pm Sx$	$\bar{x} \pm Sx$	$\bar{x} \pm Sx$
Asetilkolin ($3 \times 10^{-5} M$)	10,4 ± 0,6 ^a	9,7 ± 0,7 ^b	1,8 ± 0,8 ^c	1,0 ± 0,6 ^d

p<0.05: a-c, a-d, b-c, b-d

Tartışma ve Sonuç

Amitraz, kobay distal ileumu düz kasında 10^{-8} - $10^{-4} M$ arası konsantrasyonlarda önemli bir kasılma oluşturmazken, $10^{-3} M$ 'lık konsantrasyonda daha öncekilerle elde edilen cevapların yaklaşık 3-4 katı büyük bir boyutta kasılıma neden olmuştur. Bu doz amitrazın kasılım oluşturduğu kobay ileumu ve domuz uterusundaki çalışmalarda (9,10) kullanılan etkili dozundan daha yüksektir. Amitrazın daha düşük konsantrasyonlarda cevap vermemesi bu çalışmalarla karşılaştırıldığında uterus için doku farklılığı neden olarak gösterilebilirken, ileum için bu çalışmada amitrazın kümülatif olarak kullanılması ve az da olsa bu yöntemle reseptörlerde yapabileceği bir "tachyphylaxi" ihtimaline bağlı olarak etki için daha yüksek bir doz gerektiği şeklinde yorumlanabilir. Amitraz ve klonidin gibi birçok α_2 adrenerjik reseptörleri uyararak etkisini gösteren ilaçların, PGE_2 ve 5-hydroxytryptophan gibi etkenlerle ishal oluşturulması durumlarında ishali durdurabildikleri bunu da bağırsak düz kaslarını innerve eden postgangliyonik sinirlerde presinaptik etkiyle bağırsak motilitesini azaltarak yaptıkları belirtilmektedir (6,12,13). Yine amitrazın mide bağırsak kanalından geçişi yavaşlattığı ve bu etkisinin bağırsak motilitesini azaltması sonucu olduğu şeklindeki çalışmalarda (5,6,7) karşılaştığımızda gördüğümüz tezat, sözü edilen çalışmalarda kullanılan konsantrasyonun düşük olması, amitrazın bu çalışmada da düşük konsantrasyonlarda etkisiz olması nedeniyle etki mekanizmasının doza bağımlı olarak farklılık gösterebildiğini düşündürmektedir. Bu durum amitrazın direk olarak etki yaptığı alfa adrenerjik reseptörler dışında, indirek yolla başka reseptörleri uyararak kasılım yaratabildiği şeklinde bir ihtimali akla getirmektedir.

Amitraz ($10^{-3} M$) ve asetilkolinin ($3 \times 10^{-5} M$) kobay ileumundaki etki mekanizmasının anlaşılabilmesi amacıyla verapamilin ($3 \times 10^{-5} M$) varlığında ve Ca^{++} 'suz ortamda denemeleri durumunda kasılım boyutlarının farklı

Tablo 1. Kobay distal ileumunda asetilkolinin ($3 \times 10^{-5} M$) yalnız (kontrol), amitraz ($10^{-3} M$) ile verapamilin ($3 \times 10^{-5} M$) varlığında ve Ca^{++} 'suz ortamda oluşturduğu kasılmalar (mm). Değerler aritmetik ortalama±standart hata şeklinde verilmiş olup, n=7 dir.

olmasına karşın etki şeklinin benzer olduğu dikkat çekmektedir. Asetilkolinin direk olarak muskarinik reseptörleri etkilediği düşünüldüğünde, ancak yüksek konsantrasyonlarda asıl bilinen inhibe edici etkisinin aksine kasılım yaratabilen amitraza göre daha büyük boyutta kasılım doğurması normal kabul edilmektedir. Mekanizma yönünden ise, her ikisinin de verapamilin varlığında ve Ca^{++} suz ortamda etkilerinin azalması, onların kasılımı hem Ca^{++} kanallarını açarak ve hem de hücre içi ortamdan Ca^{++} salınımını arttırarak sağladıklarını akla getirmektedir.

Distal ileumda asetilkolin ile oluşturulan cevabın amitrazla azaltılabilmesine karşın bu farklılığın istatistiksel yönden önem ifade edecek bir boyutta olmaması, amitrazın asetilkolin kaynaklı uyarımı bloke etmediğini göstermektedir. Bu konuda yapılabilecek yorumlardan ilki, amitrazın kasılım oluşturmasının muskarinik reseptörlere bağlı olmadığı, ikincisi ise bağlı olsa bile asetilkolinle yarışabilecek bir boyutta olmadığı bu nedenle sadece asetilkolinin etkisini biraz azalttığı şeklinde olacaktır. Bu konuda çalışmaların tezatlıklar gösterdiği görülmektedir. Elde edilen tablo, kobay ileumunda yapılan benzer bir çalışmada (9) ve domuz uterus kasında asetilkolin benzeri etki gösteren karbakolle (10) amitrazın denenmesi ve etkisiz bulunması ile uyum içinde olurken, elektriksel olarak uyarılan kobay ileumunda görülen ve asetilkolin etkili olduğu söylenen kasılımda

inhibe edici etki gösteren amitrazın varlığını vurgulayan çalışma (14) ile ters düşmektedir. Bu durum bir başka çalışmada (15) elektriksel olarak uyarılan kobay ileumunda etkinin inhibisyonunu sağlayan diğer bir formamidin pestisit olan klordimeforma karşı iki ayrı alfa adrenerjik reseptör blokörü kullanılması ve farklı sonuçlar alınması ile gündeme getirilmiş ve tüm alfa adrenerjik reseptör uyarıcılarının etkilerini kolinerjik uyarıyı durdurarak göstermediği, klordimeform ile elde edilen inhibisyonun PGE_1 ile tersine çevrilmesinden dolayı bu etkide prostaglandin sentezinin inhibisyonunun da rol oynayabileceği vurgulanmıştır. Amitraz kaynaklı kasılımda da etkinin indirek olarak bir başka maddenin inhibisyonuna bağlı olup olmadığı konusunda herhangi bir bilgiye sahip değiliz.

Sonuç olarak amitrazın yüksek dozlarda kobay ileumu düz kasında kasılım yarattığı ve bu etkide tıpkı asetilkolinle olduğu gibi Ca^{++} 'un rol oynadığı gözlemlenmiştir. Öte yandan aynı dokuda asetilkolin kaynaklı kasılımın amitraz ile inhibe edilememesi, amitrazın kasılım yaratan etkisinde kolinerjik reseptörlerin olma ihtimalinin az olduğunu veya asetilkolinle yarışacak boyutta olmadığını, bugün için bilemediğimiz başka reseptörlerin katkısının veya bağırsağın kasılımda inhibisyon yaratan bir başka maddenin etkisinin bloke edilmesinin olabileceğini düşündürmektedir.

Kaynaklar

1. Farmer, H., Seawright, A.A.: The use of amitraz (N-(2,4-dimethylphenyl)-N-[(2,4-dimethylphenyl)-imino)methyl]-N-methylmethanidamide) in demodicosis in dogs. *Aust. Vet. J.* 1980; 56, 537-541.
2. Farm Chemical Book.: Sect. C. 1990; p.18, Meister, Willoughby, OH.
3. Roberts, M.C., Seawright, A.A.: Amitraz induced large intestinal impaction in the horse. *Aust. Vet. J.* 1979; 55, 553-554.
4. Auer, D.E., Seawright, A.A., Pollitt, C.C., Williams, G.: Illness in horses following spraying with amitraz. *Aust. Vet. J.* 1984; 61, 257-259.
5. Hsu, W.H., Lu, Z.X.: Amitraz-induced delay of gastrointestinal transit in mice: mediated by α_2 adrenergic receptors. *Drug Develop. Res.* 1984; 4, 655-660.
6. Hsu, W.H., McNeel, S.V.: Amitraz-induced prolongation of gastrointestinal transit and bradycardia in dogs and their antagonism by yohimbine: preliminary study. *Drug and Chem. Toxicol.* 1985; 4, 239-253.
7. Roberts, M.C., Seawright, A.A.: Experimental studies of drug-induced impaction colic in the horse. *Equine Vet. J.* 1983; 15, 222-228.
8. Pass, M.A., Mogg, T.D.: Effect of amitraz and its metabolites on intestinal motility. *Comp. Biochem. Physiol.* 1991; 99C, 169-172.
9. Pass, M.A., Seawright, A.A.: Effect of amitraz on contractions of the guinea-pig ileum in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.* 1982; 73C, 419-422.
10. Shin, D.H., Hsu, W.H.: Influence of the formamidine pesticide amitraz and its metabolites on porcine myometrial contractility: involvement of α_2 adrenergic receptors and Ca^{2+} channels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1994; 128(1), 45-49.
11. Sağmanlıgil, V., İriadam, M., Şireli, M., Emre, B.: Asetilkolin ve $PGF_{2\alpha}$ 'nın kobay ince bağırsak tonusu üzerine etkileri. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 1995; 42(4), 519-526.
12. Doherty, N.S., Hancock, A.A.: Role of Alpha-2 Adrenergic Receptors in the control of diarrhea and intestinal motility. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1983; 225(2), 269-274.

13. Doherty, T.J.: Physiologic effects of α_2 -adrenergic receptors. JAVMA. 1988; 192, 1612-1614.
14. Hsu, W.H., Shaw, R.N., Schaffer, D.D., Crump, M.H., Greer, M.H.: Further evidence to support the α_2 -adrenergic nature of amitraz-induced decrease in intestinal motility. Arch. Int. Pharmacodyn. 1987; 286, 145-151.
15. Hollingworth, R.M., Yim, G.K.W.: Toxicity, interactions and metabolism of formamidine pesticides in mammals. U.S. Environmental Protection Agency Report EPA 600/1-80-028. 1980; 58-66.