# Kurbaða izole özofagus düz kas preparatý üzerinde mentolün etkileri ile ilgili bir çalýþma

Dr. Þerare ATÇI[3], Uz.Ecz.Eda (KARABAL) KUMCU[1], Dr. Yusuf KARATAÞ[1], Dr. Ergin ÞÝNGÝRÝK[1], Dr. Atilla DÝKMEN[1], Dr. Fazilet AKSU[1], Dr. Firuz BAYSAL[2]

Ç.Ü. Týp Fakültesi Farmakoloji ABD. Balcalý/ADANA[1], Celal Bayar Ün.Týp Fakültesi Farmakoloji ABD.MANÝSA[2], Yiðit Eczanesi Gaziemir ÝZMÝR[3].

**ÖZET:** ***Çalýþmada kurbaða üst özofagus dairevi düz kas þeritlerinde mentolün etkileri araþtýrýldý. Deneylerin bir kýsmýnda karbakol (0.1 mg/ml) ile önceden kastýrýlmýþ þeritler üzerinde mentolün etkisi incelendi. Mentol ($10^{-4}$, $2x10^{-4}$ veya $5x10^{-4}$ M) karbakol ile önceden kastýrýlmýþ dokularda doza baðýmlý gevþeme oluþturdu ve gevþemeler, L-NOARG ($5x10^{-4}$ M), lidokain ($10^{-6}$ M), indometasin ($3x10^{-5}$ M) aminoguanidin ($10^{-4}$ M), furosemid ($10^{-6}$ M), amilorid ($10^{-6}$ M), propranolol ($10^{-5}$ M) ve dietilditiyokarbamik asid (DETCA) (2 ve 10mM) varlýðýndan anlamlý olarak etkilenmedi. Diðer bir deney serisinde 40mM KCl ile muamele edilmiþ þeritlerde mentol ($2x10^{-4}$ veya $5x10^{-4}$ M) doza baðýmlý bir kasýlma oluþturdu. Kalsiyumsuz ortamda kontraktür olayý inhibe oldu. Ayrý bir deney serisinde KCl ile depolarize edilmiþ preparatlarda mentol ile oluþturulan kasýlma, mentol uygulamasýnýn 20. dakikasýnda uygulanan $Ca^{+2}$'suz ortam veya papaverin ($10^{-5}$ M) ile inhibe olurken atropin tarafýndan etkilenmedi.***

***Sonuç olarak mentol, düz kas düzeyinde dual etkiye sahip olabilir, karbakol ile önceden kastýrýlmýþ dokuda kalsiyum kanal blokörü olarak etkinlik meydana getirirken, yüksek potasyuma maruz býrakýlmýþ olduðu durumlarda ayný dokuda kalsiyum kanallarýnýn açýlmasýný kolaylaþtýrabilir ve böylece ekstraselüler kalsiyuma baðýmlý kasýlmalar oluþturabilir.***

**Anahtar kelimeler: Özofagus, Mentol, Karbakol, Potasyum**

## GÝRÝÞ

Týpta Ýrritabl kolon tedavisinde önerilen nane yaðýnýn (Pepperment oil) etkin maddelerinden biri mentoldur[2]. Söz konusu yaðýn deney hayvanlarý ve insanlardan izole edilen gastrointestinal düz kas dokularýný gevþettiði ve intraluminal uygulamada kolon spazmýný azalttýðý endoskopik olarak gösterilmiþtir. Ancak ilginç olarak ayný yaðýn yine intraluminal uygulandýðýnda neostigmin ile uyarýlan sigmoid kolon aktivasyonunu potansiyalize ettiði de kaydedilmiþtir[6].

Bu çalýþmalarýn sonuçlarý bizi kurbaðada in vitro incelemeye en elveriþli preparatlardan biri olarak görülen izole üst segment özafagus düz kasý [1,3,9] üzerinde mentolün etkisini incelemeye yöneltti.

## MATERYAL ve METOD

Çalýþmalarda her iki cinsten tatlý su kurbaðalarý (Rana pipiens) kullanýldý. Baþý kesilen ve omuriliði tahrip edilen deney hayvanlarýndan özofagusun üst segmenti dikkatli bir þekilde kesilip çýkarýldý ve dairevi bir þerit haline getirildi. Böylece hazýrlanan preparat normal Ringer içeren (NaCl 111.11, KCl 1.88, $CaCl_2$ 1.08, $NaH_2PO_4.2H_20$ 0.08, $NaHCO_3$ 2.38, Glukoz 10.1 mM) dýþtan ýsýtmalý 50 ml'lik banyo içerisine yerleþtirildi; doku üzerine 0.5 g. tansiyon uygulandý. Ortam ýsýsý 20 $^{o}$C'de sabit tutuldu ve % 100 oksijen ile havalandýrýldý. Þeritlerin

cevaplarý 10 büyütme ile izotonik olarak isli kaðýt veya poligraf (Ugo Basile, Gemini 7070) kaðýdý üzerine kaydedildi. Ekilibriyum için 1 saat beklenildi.

Bir grup deneyde karbakol (O.1 mg/ml) ile önceden kastýrýlmýþ þeritler üzerinde mentolün etkisi incelendi. Beþ dakikalýk bazal tonus kaydýndan sonra karbakol ile kastýrýlmanýn ardýndan ortama 10. dakikada mentol($10^{-4}$, $2x10^{-4}$ veya $5x10^{-4}$ M) ilave edildi ve doku 40 dakika bu maddeye maruz býrakýldý. Bunu ortamýn taze Ringer solüsyonu ile yýkanmasý izledi; 1 saat beklenildikten sonra ayný iþlem yinelendi. Ayný konsantrasyonda karbakol ile kastýrýlmýþ dokularda $2x10^{-4}$ ve $5x10^{-4}$ M mentol ile oluþan etkiler L-NOARG, ($5x10^{-4}$ M) lidokain ($10^{-6}$ M), indometasin ($3x10^{-5}$ M), propranolol ($10^{-6}$ M), aminoguanidin ($10^{-4}$ M), furosemid($10^{-4}$ M), amilorid($10^{-6}$ M) ve (DETCA, 2 ve 10 mM) varlýðýnda da deðerlendirildi. Her bir ilaç uygulamasý için ayrý bir deney grubu oluþturuldu. Bu amaç için adý geçen maddeler, ilk mentol uygulamasýndan sonra ortama ilave edildi ve DETCA hariç deney süresince ortamda tutuldu. DETCA ise 2 mM konsantrasyonda 60 dakika ve 10 mM konsantrasyonda ise 30 dakika doku ile temasta býrakýldý ve daha sonra ortamdan uzaklaþtýrýldý. DETÇA içeren ortamýn yýkanmasýnýn nedeni, söz konusu maddenin SOD (süperoksid dismutaz) üzerindeki etkisinin uzun süreli olmasý ve tonüsü bozmasýdýr[4].

Mentolün ($5x10^{-4}$ M) etkisi dokunun bazal tonusu üzerinde de araþtýrýldý. Karbakole maruz býrakýlmamýþ dokuda 5 dakikalýk bazal tonus kaydýndan sonra mentol ortama ilave edildi ve tonusun 30 dakika izlenmesine devam edildi. Ayný iþlem 1 saatlik istirahat döneminden sonra tekrarlandý.

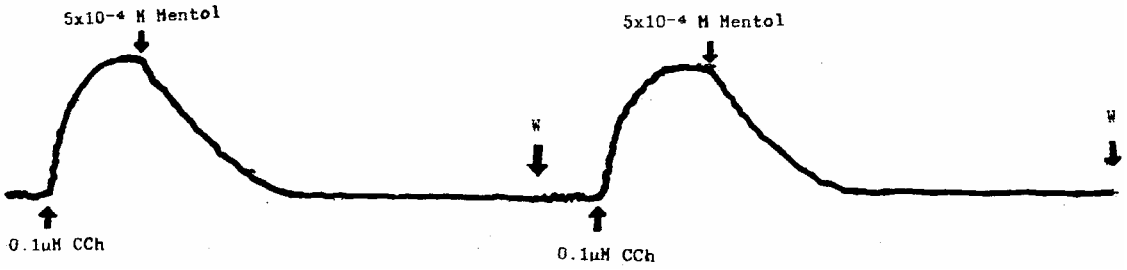
Mentolün etkileri yüksek potasyum içeren ortama maruz býrakýlan doku þeritlerinde de deðerlendirildi. 5 dakikalýk bazal tonus kaydýndan sonra, doku 40 mM KCl-Ringer (NaCl 72.99, KCl 40, $CaCl_2$ 1.08, $NaH_2PO_4.2H_20$ 0.08, $NaHCO_3$ 2.38, Glukoz 10.1 mM) ile muamele edildi ve dokunun cevabý 10 dakika kaydedildi. Ardýndan mentol ($2x10^{-4}$ veya $5x10^{-4}$ M) banyo ortamýna ilave edildi ve oluþan cevap 30 dakika izlendi ve doku normal Ringer solusyonu içerisinde 1 saat istirahata býrakýldý ve bunu ayný þekilde 2. mentol uygulamasý izledi. Bu þekilde kontrol grubu oluþturuldu. Ýkinci uygulama ile oluþan mentol etkisi ayrýca kalsiyumsuz Ringer (NaCl 112.65, KCl 1.88, $NaH_2PO_4.2H_20$ 0.08, $NaHCO_3$ 2.38, Glukoz 10.1, EGTA 0.5mM) ortamýnda da araþtýrýldý. KCl'lü Ringer içeren ortamda oluþan $5x10^{-4}$ M mentol etkisi üzerine $Ca^{+2}$'suz ortamýn, $10^{-5}$ M papaverin, ve $5x10^{-6}$ M atropinin tesirleri deðerlendirildi. Bu amaçla kontrol grubu dahil olmak üzere oluþturulan gruplarda mentolün etkisi yüksek KCl içeren ortamda 60 dk izlendi. $Ca^{+2}$'suz ortam, papaverin ve atropinin mentol etkisi üzerindeki tesirleri 20. dk da doku ile temaslarý saðlanarak deðerlendirilmeye baþlandý ve 40 dk ortamda tutularak izlendi. Bazý deneylerde solvent olarak kullanýlan dimetilsulfoksid (DMSO)'in etkisi de ayrý bir grup oluþturularak araþtýrýldý. Çalýþmalarda kullanýlan her doz için ayrý bir grup oluþturuldu. Karbakol kasýlmasý 100 kabul edilerek mentole ait % gevþeme deðerleri hesaplandý ve bu deðerlerin ortalamalarý ve standart hatalarý (±) hesaplandý. Istatistiksel yöntem olarak Student's "t" testi kullanýldý.

Mentol, indometasin ve amilorid klorür DMSO içerisinde eritildi ve banyo ortamýna 0.05 ml'lik hacim olarak ilave edildi. DMSO'nun banyo ortamýndaki konsantrasyonunun % 0.1'i aþmamasýna dikkat edildi. Karbakol klorür, papaverin hidroklorür, atropin sülfat, lidokain hidroklorür, aminoguanidin hemisulfat ve DETCA sodyum distile suda eritildi ve banyo ortamýna 0.1 ml'lýk hacimler halinde uygulandý. Furosemid dýþýndaki maddeler Sigma firmasýndan satýn alýndý. Furosemid ampulden (Desal amp., Biofarma) uygun konsantrasyonda hazýrlandý ve 0.1 ml'lik hacimler halinde ortama uygulandý.

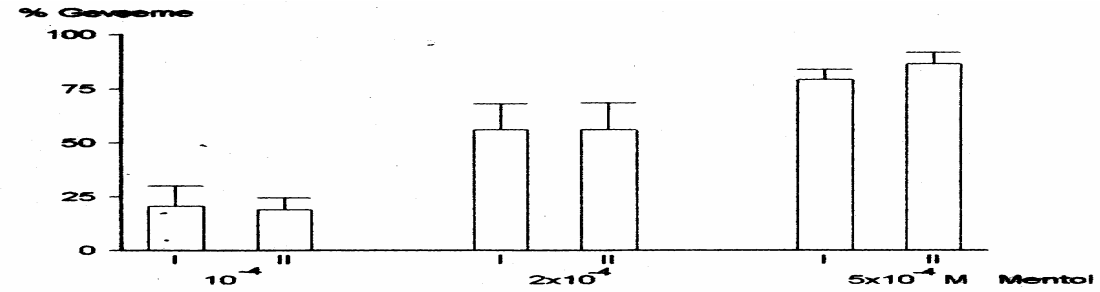
## BULGULAR

Ýzole üst segment kurbaða özafagus düz kas dairevi þeritlerinde karbakol (0.1 mg/ml) kararlý bir geliþme gösteren kontraktür meydana getirdi. Mentol ($10^{-4}$, $2x10^{-4}$ ve $5x10^{-4}$ M) kontraktür aktivitede gevþemeler oluþturdu (Þekil 1); oluþan maksimal cevaplar doza baðýmlý bir görünüm sergiledi (Þekil 2). $2x10^{-4}$ ve $5x10^{-4}$ M mentol gevþemeleri, $5x10^{-4}$ M L-NOARG, $10^{-6}$ M lidokain, $3x10^{-5}$ M indometasin ve $10^{-5}$ M propranololden anlamlý þekilde etkilenmedi (Þekil 3). Keza ayný gevþemelerin, $10^{-4}$ M aminoguanidin, $10^{-4}$ M furosemid, $10^{-6}$ M amilorid, 2 ve 10 mM DETCA içeren ortamlarda da deðiþikliðe uðramadýðý gözlemlendi (Þekil 4). Kontrol deneylerinde solvent olarak kullanýlan DMSO (% 0.1 konsantrasyonda) $5x10^{-4}$ M mentol gevþemeleri üzerinde etkisiz bulundu. $5x10^{-4}$ M mentol dokunun bazal tonusunda anlamlý bir deðiþikliðe neden olmadý. Son iki iþlemle ilgili veriler gösterilmedi.

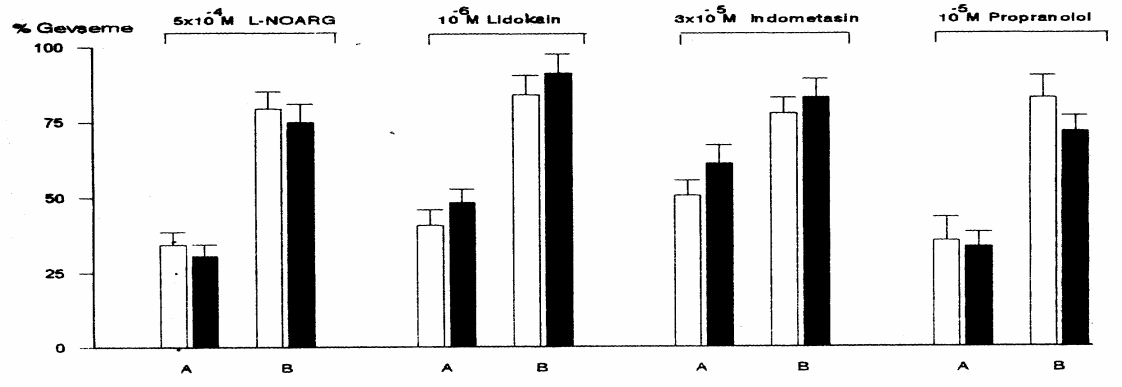
Doku 40 mM KCl içeren Ringer solüsyonu ile muamele edildiði zaman, 2-3 dakika süren inisiyal kontraksiyonu dokunun temel tonusunun altýna düþen ve belli bir deðere ulaþan gevþeme izledi. 10. dakikanýn sonunda ortama $2x10^{-4}$ M veya $5x10^{-4}$ M mentol ilave edildiði zaman doza baðýmlý bir kasýlma (çoðu kez kontraktür niteliðinde) meydana geldi ve bu durum tekrar edilebilir bir nitelik arzetti (Þekil 5A). Kalsiyumsuz ortamda kontraktür olayý inhibe oldu ($p<0.001$, Þekil 5B). KCl-Ringer ortamýnda tek uygulama halinde mentol verildiðinde yine kararlý bir kontraktür gözlendi (Þekil 6A). Bu þartlarda oluþan kontraktür, $Ca^{+2}$'suz ortamda veya ortama $10^{-5}$ M papaverin ilave edildiðinde tamamen gevþedi ($p<0.001$, Þekil 6B ve 6C). $5x10^{-6}$ M atropin etkisiz bulundu (veriler gösterilmedi).



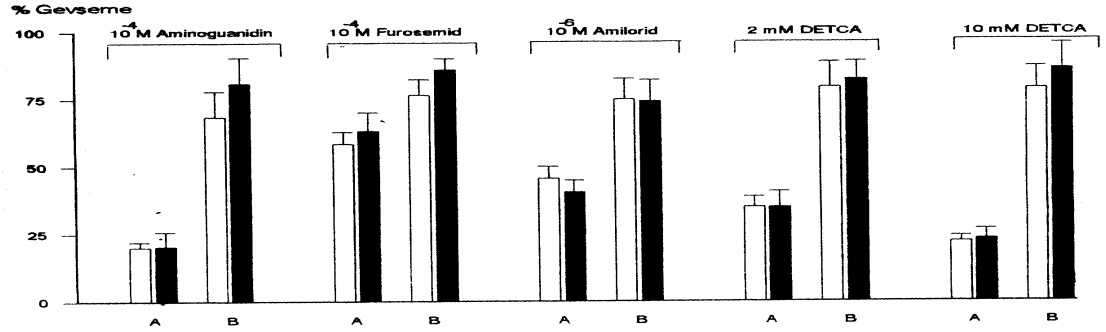

**Þekil 1.** Karbakol (Cch) (0.1mg/ml) ile önceden kastýrýlmýþ kurbaða üst özofagus dairevi düz kas þeritlerinde $5x10^{-4}$ M mentolün oluþturduðu gevþeme tarzýndaki etkiyi gösteren trase örneði.



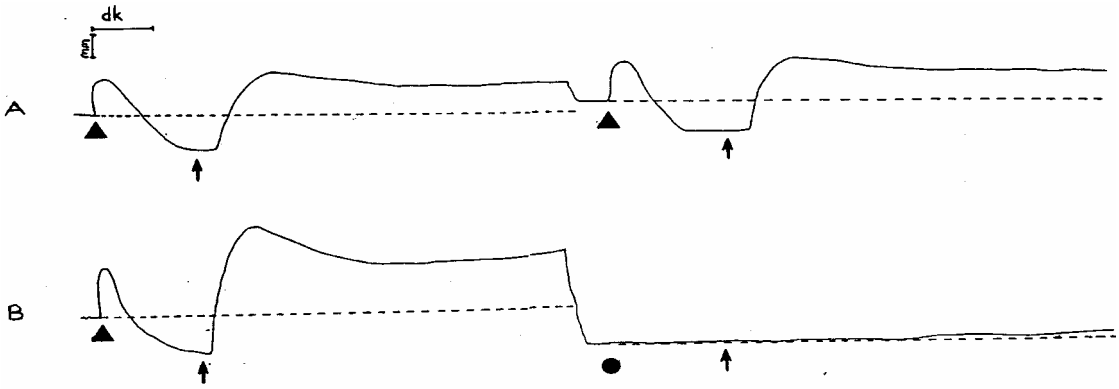
**Þekil 2.** Karbakol(0.1mg/ml) ile önceden kastýrýlmýþ kurbaða üst özofagus sirküler düz kas þeritlerinde $10^{-4}$ M, $2x10^{-4}$ M, $5x10^{-4}$M mentolün meydana getirdiði gevþeme tarzýndaki cevaplarýn % deðerlerinin ortalamalarýný(±SE) gösteren sütun grafiði. Deðerlendirilen þerit sayýsý 9 (n=9).
**I:** I. uygulamayý
**II:** II. uygulamayý göstermektedir.



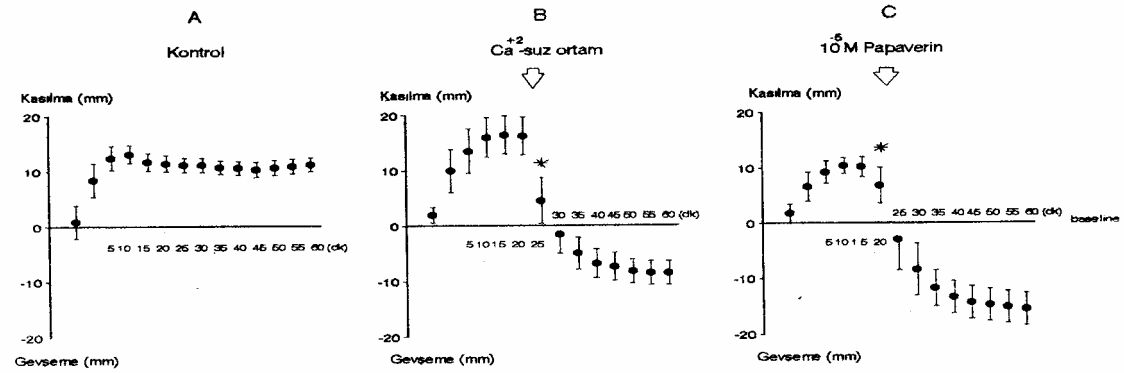

**Þekil 3.** Karbakol(0.1mg/ml) ile önceden kastýrýlmýþ kurbaða üst özofagus sirküler düz kas þeritlerinde $2x10^{-4}$ M **(A)**, $5x10^{-4}$ M **(B)** mentol ile elde edilen gevþeme tarzýndaki cevaplar üzerinde $5x10^{-4}$ M L-NOARG, $10^{-6}$ M lidokain, $3x10^{-5}$ M indometasin ve $10^{-5}$ M propranalolun etkilerinin % deðerlerinin ortalamalarýný(±SE) gösteren sütun grafiði. Deðerlendirilen þerit sayýsý 8 (n=8).
(Ýçi boþ sütunlar kontrol uygulamasýný,içi dolu sütunlar ise ilaçlý ortamdaki mentol cevabýný göstermektedir.)




**Þekil 4.** Karbakol(0.1mg/ml) ile önceden kastýrýlmýþ kurbaða üst özofagus sirküler düz kas þeritlerinde $2x10^{-4}$ M **(A)**, $5x10^{-4}$ M **(B)** mentol ile elde edilen gevþeme tarzýndaki cevaplar üzerinde $10^{-4}$ M aminoguanidin, $10^{-4}$ M furosemid, $10^{-6}$ M amilorid, 2mM ve 10mM DETCA'nýn etkilerinin % deðerlerinin ortalamalarýný (±SE) gösteren sütun grafiði. Deðerlendirilen þerit sayýsý 10 (n=10).
(Ýçi boþ sütunlar kontrol uygulamasýný içi dolu sütunlar ise Ýlaçlý ortamdaki mentol cevabýný göstermektedir.)




**Þekil 5.** 40mM KCl içeren Ringer solusyonu ile muamele edilen kurbaða üst özofagus sirküler düz kas þeritleri üzerinde $5x10^{4}$ M mentolün kalsiyum içeren ortamda **(A)** ve birinci kontrol uygulamasýný izleyen kalsiyumsuz ortamda **(B)**, etkilerini gösteren trase örnekleri.
**Ù** 40mM KCl içeren Ringer solusyonu
J $Ca^{2+}$ içermeyen Ringer solusyonu
**-** $5x10^{-4}$ M Mentol




**Þekil 6.** 40mM KCl içeren Ringer solusyonu ile muamele edilen kurbaða üst özofagus sirküler düz kas þeritleri üzerinde $5x10^{-4}$ M mentol uygulamasý ile oluþan kontraktür **(A)** ve ayný þekilde elde edilen kontraktürün 20.dakikada $Ca^{2+}$ içermeyen ortam ile muamelesi **(B)**, veya $10^{-5}$ M papaverinin ilavesi sonucu oluþan gevþemelerin zamansal seyirlerini milimetre (mm) cinsinden gösteren grafik. Deðerlendirilen þerit sayýsý 9 (n=9). * p<0.001.

## TARTIÞMA

Çalýþmamýzda elde edilen bulgular nane yaðýnýn ana bileþenlerinden biri olan mentolün izole kurbaða özofagus düz kas þeritlerinde dual etkisinin olduðunu göstermektedir. Bu madde karbakol ile önceden kastýrýlmýþ dokularda doza baðýmlý reversýbl gevþemeler meydana getirmekte; buna karþýlýk yüksek potasyum içeren ortamda ise doza baðýmlý reversýbl nitelikte kontraktür oluþturmaktadýr. Gevþemeler, L-NOARG, lidokain, indometasin, propranolol, aminoguanidin, furosemid, amilorid ve DETCA'dan anlamlý bir þekilde etkilenmemiþtir. Bu bulgular, mentol gevþemelerinde nitrik oksid, sodyum kanallarý,prostaglandin,beta reseptörler ve $Na^{+}$-$H^{+}$ deðiþtokuþu gibi mekanizmalarýn aracýlýðýnýn söz konusu olamýyacaðýný telkin etmektedir. Muhtemelen mentol ile hasýl edilen gevþeme tavþan ve kobay kalýn barsaðında gösterildiði gibi[2] kalsiyum akýmlarý üzerinden oluþan bir etki sonucu geliþebilir. Ancak söz konusu görüþü destekleyecek direkt bulgulara ihtiyaç vardýr; bu amaçla kurbaða üst segment özofagus düz kas dokusundan elde edilen hücreler üzerinde patch-clamp tekniði uygulamak suretiyle kalsiyum akýmlarýna yönelik araþtýrma yapýlabilir. Mentolün duyusal nöronlar üzerinde de benzer etkileri

saptanmýþtýr; bu dokuda kalsiyum kanallarýný bloke etmek ve inaktivasyonu

kolaylaþtýrmak suretiyle voltaja baðýmlý kalsiyum kanallarýnýn fonksiyonunu zorlaþtýrdýðý gösterilmiþtir[7,8].

Ýlginç olarak, ayný madde yüksek potasyum içeren ortamda $2x10^{-4}$ ve $5x10^{-4}$ M konsantrasyonlarda kullanýldýðý zaman izole kurbaða özofagus üst segment þeritlerinde doza baðýmlý kasýlmalar oluþturdu. Olay kalsiyumun varlýðýna ihtiyaç göstermektedir; zira ortamdan kalsiyum uzaklaþtýrýldýðýnda kontraktür gözlemlenmemektedir; kontraktür saðlandýktan sonra doku kalsiyumsuz ortama alýndýðýnda ise hýzlý bir gevþeme görülmektedir. Kontraktür olgusu $10^{-4}$ M atropinden etkilenmemekte ve $10^{-5}$ M papaverinle hýzlý bir þekilde gevþemektedir. Yüksek potasyum içeren ortamda bulunan kas dokusunda mentol kalsiyum kanallarý bloke edici deðil aksine kanal açýcý olarak çalýþmak suretiyle hücre içerisine ekstrasellüler kalsiyumun giriþini arttýrabilir; sonuçta kasýlma olayýný baþlatabilir veya bu olayýn geliþmesini kolaylaþtýrabilir. Diðer yandan mentolün sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salýverici etkisi de söz konusu kasýlma olayýna katký saðlayabilir; zira önceden kalsiyumla yüklendirilmiþ izole sarkoplazmik retikulum subfraksiyonlarýnda mentolün kafeinin yaptýðýna benzer þekilde kalsiyum salýverici etkisi olduðu gösterilmiþtir[5].

Sonuç olarak mentol düz kas düzeyinde dual etkiye sahip olabilir, karbakol ile önceden kastýrýlmýþ dokuda kalsiyum kanal blokörü olarak etkinlik hasýl ederken, yüksek potasyuma maruz býrakýlmýþ olduðu durumlarda ayný dokuda kalsiyum kanallarýnýn açýlmasýný kolaylaþtýrabilir ve böylece ekstrasellüler kalsiyuma baðýmlý kasýlmalar oluþturabilir.

## SUMMARY

**A study about the effects of menthol on the isolated frog oesophageal smooth muscle preparation.**

In this study the effects of menthol on frog upper oesophageal circular smooth muscle strips were investigated. In a series of experiments the effects of menthol on carbachol contracted tissues were studied. Menthol ($2x10^{-4}$ or $5x10^{-4}$ M) decreased carbachol induced contraction in a dose dependent manner. $N^{w}$-nitro L-arginin (L-NOARG) ($5x10^{-4}$ M),lidocaine ($10^{-6}$ M), indomethacin ($3x10^{-5}$ M), aminoguanidine ($10^{-4}$ M), furosemide($10^{-6}$ M), amiloride ($10^{-6}$ M), propranolol ($10^{-5}$ M), (DETCA) (2 ve 10mM) had no significant effect on the relaxations induced by menthol. In another group of experiments the same substance ($2x10^{-4}$ or $5x10^{-4}$ M) elicited contractile responses on the strips incubated with high potassium (40mM). The effect seemed to be dose dependent and was abolished in $Ca^{+2}$-free medium. When treated with $Ca^{+2}$-free medium or papaverine ($10^{-5}$ M), the tissue contracted with menthol in high potassium medium completely relaxed, but atropine ($10^{-6}$ M) was found to be without effective in the same experimental conditions.

In conclusion, menthol may have a dual effect on smooth muscle. While menthol shows an effect like a calcium channel blocker on the tissues contracted with carbachol, it may facilitate opening of calcium channels in the present of high potassium and induce extracellular calcium-dependent contractions.

Key words: Oesophagus, Menthol, Carbachol, Potassium

## KAYNAKLAR

1. Aksu F, Önder S, Öðülener N ve ark: Potasyum iyonunun kurbaða özofagus dairevi þeritleri üzerindeki etkisi ile Ýlgili bir çalýþma. Ç Ü Saðlýk Bil Derg 1991; 6(1,2,3): 45-51.
2. Hills JM, Aaronson PI: The mechanism of action of peppermint oil on gastrointestinal smooth muscle. Gastroenterology 1991; 101: 55-65.

3. Karataþ Y: Kurbaða izole özofagus sirküler düz kas preparatlarýnda potasyum gevþemeleri ve nitrerjik sistem. Doktora tezi (Abstract). Ç Ü Saðlýk Bil Enst 1995. Adana.

4. Omar HA, Cherry PD, Mortelliti MP, et al: Inhibition of coronary artery superoxide dismutase attenuates endothelium-dependent and -independent nitrovasodilator relaxation. Circulation Research 1991; 69: 601-608.

5. Palada P: Drug-induced $Ca^{2+}$ release from isolated sarcoplasmic reticulum. J Biol Chemist 1987; 262: 6142-6148.

6. Rogers J, Tay HH, Misiewicz JJ: Peppermint Oil. Lancet 1988; July 9:98-99.

7. Swandulla D., Schafer K., Lux HD: Calcium channel current Ýnactivation is selectively modulated by menthol. Neuroscience Letters 1986; 68: 23-28.

8. Swandulla D, Carbone E, Schafer K, et al: Effect of menthol on two types of $Ca^{2+}$ currents in cultured sensory neurons of vertebrates. Pflügers Arch 1987; 409: 52-59.

9. Þingirik E, Demircioðlu Z, Dikmen A ve ark: Electrically induced relaxation of frog esophageal circular strips and ouabain. Ç Ü Týp Fak Derg 1987; 12(4): 321-324.

**Yazýþma Adresi:**

Dr.Yusuf Karataþ
Ç.Ü.Týp Fakültesi
Farmakoloji A.B.D
01330 Balcalý/ADANA