Protamin Sülfatın Miyokartta Oluşturduğu Depresif Etkiye Kalsiyum Kanallarının Katkısının Araştırılması: (Deneysel Çalışma)

M. Şah TOPÇUOĞLU*, Mustafa İTEĞİN, İsmail GÜNAY**, Acar TOKCAN*, Bülent KISACIKOĞLU*, Orhan Kemal SALİH*, Tümer ULUS***

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, ADANA

* *Göğüs Kalp ve Damar* Cerrahisi *Anabilim Dalı*

** *Biyofizik AnabÜim Dalı*

Protamin sülfatın miyokard kontraktilitesi üzerine yaptığı depresif etkinin hücresel temelini açıklayabilmek için, reseptör ve kalsiyum kaynakları açısından farklılık gösteren kardiyak papiller (n = 10} ve frenik sinir-hemidiyafragma preparatları (n = 16) kullanıldı.

Bu preparatlar 20, 40 ve 80 µg/ml protamin sülfat konsantrasyonlarında farklı mekanik ve biyoelektriksel yanıtlar oluşturdular. Kalp papiller kasının 40 ve 80 µg/ml protamin sülfat konsantrasyonlarında dinlenim zar potansiyeli (DZP), aksiyon potansiyel genliği (APG) ve overshoot (OSH) gibi biyoelektriksel parametreleri normallere göre anlamlı derecede değişti ($p > 0.001$). Frenik sinir-hemidiyafragma preparatının DZP değerlerinde, 40 ve 80 µg/ml protamin ortamlarında doza bağlı olarak daha negatifleşme ($p < 0.001$); indirekt uyarıda APG de anlamlı bir azalma ($p < 0.001$) belirlenirken, direkt uyarıda ise herhangi bir değişiklik belirlenemedi. Frenik sinir-hemidiyafragma preparatının, 55.5 µg/ml verapamil ortamında 30 dakika direkt olarak uyarılması sonunda, uyarılabilirliğinin azalmasına rağmen kasılma kuvvetinde değişme gözlenmedi. indirekt uyarıda ise kasılma kuvvetinde % 98.2 oranında anlamlı bir düşme olduğu belirlendi ($p < 0.0001$). Frenik sinir-hemidiyafragma preparatının 20, 40 ve 80 µg/ml protamin ortamlarında direkt uyarılması sonucunda kasılma kuvvetlerinde değişme gözlenemezken, indirekt uyan sonucunda ise sırasıyla % 20, % 31 ve % 33 oranlarında anlamlı azalmalar tespit edildi ($p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.01$).

Bulgularımız, protamin sülfatın kalp kası iyon kanallarında konformasyonel değişiklikler oluşturması sonucu, zarın sodyum, potasyum ve kalsiyum iyon

The Investigation of the effect of calcium channels on the depressif effect of protamine sulfate on myocardium (Experimental Study)

Cardiac papillary muscle (n=10) and phrenic nerve-hemidiaphragma (n-16) preparations which differ in receptor type and calcium source have been used to explain the cellular basis of the depressive effect of protamine sulfate on the myocardial contractibilitly.

These muscle tissues gave diggerent mechanic and electrical responses to 20, 40 and 80 µg/ml concentrations of protamine sulfate. The parameters of the resting membrane potentila (RMP), action potential amplitude (APA) and overshoot (OSH) of cardiac papillary muscle have differed significantly in protamine sulfate concentrations of 40 and 80 µg/ml ($p< 0.001$). In phrenic nerve-hemidiaphragma preparation, in 40, 80 µg/ml of protamine the RMP changed towards negative values ($p < 0.001$) dose dependently, the APA values decreased significantly ($p < 0.001$) with indirect stimulation, and yet in direct stimulation no changes were observed. After 30 minutes of stimulation, and yet in direct stimulation no changes were obsered. After 30 minutes of stimulation, in 55.5 µg/ml verapamil solution, the phrenic nerve-hemidiaphragma preparation's excitability decreased, and yet the contraction force didn't change. Indirect stimulus induced a signific ant drop of 98.2 percent ($p < 0.0001$). With direct stimuli, in 20, 40 and 80 µg/ml of protamine, the phrenic nerve-hemidiaphragma preparations didn't exhibit a change in the contraction force, where as indirect stimuli enabled a reduction of 20, 31 and 33 percent respectively ($p < 0.05$, $p > 0.01$ and $p < 0.01$).

In line with our findings, this effect of protamine sulfate seems to be achieved by conformational

iletkenliğini azaltarak etki ettiğini düşündürmektedir.

GKDC Dergisi 1998; 6:117-124

changes of the ion channels which reduction the ion conduction capacity of the membrane for sodium, potassium, and calcium ions.

Giriş

Kardiyopulmoner bypass sonrasında heparinin oluşturduğu antikoagulan etkiyi nötralize etmek için, protamin sülfat rutin olarak kullanılmaktadır. Ancak sol ventrikül fonksiyonları iyi olmayan olgularda protamin sülfatın önemli derecede negatif inotropik etki oluşturduğu bilinmektedir. Bu etkinin mekanizması konusunda yapılan birçok çalışma mevcuttur (1-7).

Bu çalışmalar sonucunda protamin sülfatın, doza bağlı olarak, miyositlerin kasılma kuvvetinde ve biyoelektriksel parametrelerinde (aksiyon potansiyelin genliği ve overshoot değeri ile dinlenim zar potansiyelinin büyüklüğünde) anlamlı değişiklikler oluşturduğu belirtilmiştir (8-10). Benzer şekilde daha önceki bir çalışmamızda da protamin sülfatın izole sıçan papiller kasının kasılma kuvvetini azalttığı, kasılma-gevşeme sürelerini uzattığı ve kontraktür oluşturduğu tespit edilmiştir (7).

Bu değişikliklerin kalsiyum kanalları ve reseptör sistemi ile ilgili olduğu bildirilmişse de hücresel temeli tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

Kalp papiller kas preparatında kalsiyum kanalları ve β-adrenerjik reseptörleri, frenik sinir-hemidiyafragma kas (FSH) perparatında ise yalnız kalsiyum kanalları (sinir-kas kavşağında) bulunmaktadır. FSH preparatında bulunan kalsiyum kanalları, bu preparatın indirekt (sinirden) uyarılmasında etkili iken, direkt (kastan) uyarılmasında etkili değildir.

Bu çalışmada FSH preparatı kanal ve reseptör özelliğinin farklı olması nedeniyle papiller kas preparat ile birlikte çalışmaya alınmış ve protamin sülfatın bu preparatlar üzerindeki etkisine, hücresel düzeyde açıklık getirilmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Metod

Çalışma, ağırlıkları 260-300 g arasında değişen 16 adet Wistar türü erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, sodyum pentobarbital (30 mg/kg, i.p.) injeksiyonu ile anestezi edilerek operasyon masasına sabitlendi. On adet papiller kas ve 16 adet frenik sinir-hemidiyafragma preparatı hazırlandı.

İzole kalp papiller kas preparatının hazırlanması

Vücut ağırlığının her 100 gramı başına 500 LU. heparin i.v. olarak verildi. Trakea kanüle edildi. Sternotomi yapılarak perikard açıldı. Assendan aorta çevre dokulardan temizlenip pulmoner arterden ayrıldı. Yapay perfüzat (Krebs) vermek için aortaya kanül yerleştirildi (5). Perfüzyon başlamadan önce sağ atriumdan kalp dekompresse edildi. Kalp izole edildikten sonra, içinden % 95 O_2 - % 5 CO_2 gaz karışımı geçirilen Krebs çözeltisi (litrede mM olarak 113 NaCl, 4.7 KC1, 1.2 $MgSO_4$, $7H_20$,1.9 $CaCl_2$. $2H_20$,1.2 KH_2PO_4, 25 $NaHCO_3$ ve 11.5 Glukoz) ile perfüze edildi.

Yapay perfüzyona başlandıktan sonra, kalbin ekstrakorporeal ortama adaptasyonu için 15-20 dakika beklendi ve sol ventrikülden, korda tendinayı içeren yaklaşık 5-6 mm uzunluğunda, 1.2-1.5 mm genişliğinde ve ortalama ağırlığı 31±3 mg olan papiller kas preparatları izole edildi. İzole edilen preparat, içinde 10 ml Krebs solüsyonunu bulunduran ve perfüzyon imkanı olan mikroelektrot preparat odasına alındı. Preparat çelik elektrodlar arasında uygun tarzda yerleştirildi ve 30°C sabit sıcaklıkta 2 ml/dak.' lık bir hızda Krebs solüsyonuyla perfüze edildi. Banyo çözeltisinin pH'sı 7.34-7.45 arasında tutuldu. Bir saatlik termoregülasyon ve dengelenme peryodundan sonra supramaksimal uyaran voltajı ve optimum kas boyu (maksimum kas gerimini veren boy) belirlendi. Kas bu

gerim altında 10 dakika bekletildikten sonra, 0.5 ms süreli ve 0.1 Hz frekanslı kare pulslarla supramaksimal olarak 10 dakika boyunca uyarılıp hazırlık dönemi tamamlandı.

Frenik sinir-hemidiyafragma kas preparatının hazırlanması

Frenik sinir-hemidiyafragma kas preparatının hazırlanışında Kelsen ve Nochomovitz tarafından önerilen yöntem kullanıldı (6).

İzole edilen FSH preparatı Krebs çözeltisi içeren ve % 95 O_2 - % CO_2 gaz karışımı verilen preparat hazırlama kabına alındı. Ortalama 53+6 mg ağırlığında ve 1.8±0.1 cm uzunluğunda olmak üzere toplam 16 adet preparat hazırlandı. Preparatlar mikroelektrot odasına alındı ve papiller kası ile aynı koşullarda organ banyosuna yerleştirildi. Papiller kası için anlatılan termoregülasyon ve hazırlık dönemi FSH preparatlarına da uygulandı.

Altı adet FSH preparatının kasılma kuvveti değerleri kaydedildikten sonra, banyo ortamlarına 55.5 μg/ml kalsiyum kanal blokörü (verapamil) ve kümülatif doz sırasıyla 20, 40 ve 80 μg/ml olacak şekilde protamin sülfat kondu. Bu ortamlardaki kaslar 0.1 Hz ve 0.5 ms süreli uyaranlarla (Nihon Kohden SEN-3301 ve SS-102 J SIU) 30 dakika süresince direkt (kastan) ve indirekt (sinirden) uyarıldı. Uyarılmalar sırasında 10., 20. ve 30. dakikalarda gelişen kas kasılma kuvvetleri izometrik transducer (May force-displacement transducer ve 9601 transducer interface) ve Harvard Universal Osilograph aracılığı ile kaydedildi.

Elektriksel uyarı ve hücre içi kayıt işlemi

On adet frenik sinir-hemidiyafragma ve 10 adet papiller kas preparatına mikoelektrotla rastgele girilerek, protaminsiz ve 20, 40 ve 80 μg/ml protaminli ortamda hücre içi dinlenim zar potansiyelleri (DZP) ve aksiyon potansiyelleri (AP) kayıtlandı. Papiller kası direkt, FSH preparatı ise direkt ve indirekt olarak uyarıldı. Dinlenim zar ve aksiyon potansiyelleri mikroelektrot amplifikatörü (Nihon Kohden MEZ-7200) ile amplifiye edilerek, digital storage osiloskopla (Hitachi VC 6045) gözlendi ve kayıtlandı. Bu kayıtlar için, flamentli borsilikat kapiller cam tüplerden (dış çapı: 1.2 mm, iç çap: 0.69 mm) çekilen ve 3 M KC1 (empedans 15-25 MU) ile doldurulan mikroelektrotlar kullanıldı.

Uygulanan dozlar klinik kullanım sınırları içerisindedir. Örneğin 40 μg/ml protamin konsantrasyonu klinik kullanımda 2.5 mg/kg dozuna karşılık gelmektedir. İstatistiksel değerlendirme; kontrol ve deney grupları arasında eleştirilmiş student-t testi kullanılarak yapıldı.

Bulgular

Frenik sinir-hemidiyafragma preparatının kasılma verileri

Hemidiyafragma kasının direkt ve indirekt uyaranlar etkisinde, 55.5 μg/ml verapamil ve 20, 40 ve 80 μg/ml protamin sülfat olmak üzere üç ayrı konsantrasyonda, doz ve zamana bağlı olarak oluşan kasılma kuvvetlerinin değişimleri Tablo l'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

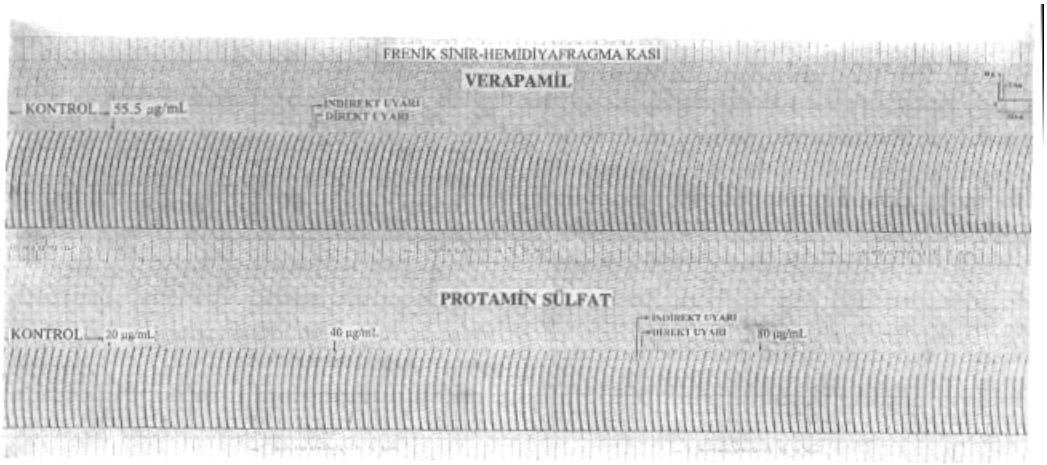
Frenik-sinir hemidiyafragma preparatı kararlı duruma geldikten sonra/ gerek direkt gerekse indirekt olarak uyarıldığında aynı ölçüde kasılma kuvvetleri (27.6±3.2 g) elde edildi. Ortama 55.5 μg/ml verapamil konulduğunda ve preparat direkt olarak uyarıldığında, kasılma kuvvetlerinde zamana (10., 20. ve 30. dak.) bağlı olarak herhangi bir değişiklik olmadı. Ancak indirekt olarak uyarıldığında, kasılma kuvvetlerinin zamana bağlı olarak azaldığı tespit edildi. Bu azalma sırasıyla 19.4±2.3, 3.2±0.7 ve 0.5±0.1 g idi (Tablo l, Resim 1).

Ortama 20, 40 ve 80 μg/ml'lik kümülatif protamin sülfat konulduğunda, direkt uyanda kas kasılma kuvvetlerinde zamana bağlı olarak (10., 20. ve 30. dak.) normal kasılma kuvvetlerine göre bir değişiklik olmadı. Aynı preparat indirekt uyanlarda ortamda 20 μg/ml protamin varken, kasılma kuvvetleri zamana bağlı olarak sırasıyla 21.7±2.6, 21.4±2.2 ve 21.2±2.7 g; 40 μg/

Tablo 1. Sıçan frenik sinir- hemidiafrag kas preparatlarında verapamil ve protamin sülfatın etkisine ait ilaç uygulanmasından 10, 20 ve 30. dak. sonra ölçülen izometrik mekanogram değerleri (n=6, Ort ± SD).

Uyan Şekli	Normal Kasılma Kuvveti (g)	Uygulanan İlaç ve Dozlar (µg/ml)	İlaç Etkisinde Kasılma Kuvveti (g) 10 dak. sonra	20 dak. sonra	30 dak. sonra
		Verapamil			
		55.5 (Hg/ml)			
Direkt Uyarı	27.6±3.2 (% 100)		27.6±3.2 (% 100)	27.6±3.2 (% 100)	27.6±3.2 (% 100)
İndirekt Uyarı	27.6±3.2		19.4±2.3*	3.2±0.7*	0.5±0.1*
		Protamin sülfat 20 µg/ml			
Direkt Uyarı	26.5±3.8 (% 100)	40 µg/ml	26.5±3.8 (% 100)	26.5±3.8 (% 100)	26.5±3.8 (% 100)
		80 µg/ml			
İndirekt Uyarı	26.5±3.8 (% 100)	20 µg/ml	21.7±2.6 (% 82)	21.4±2.2** (%81)	21.2±2.7** (% 80)
		40 µg/ml	18.9±3.2***' (% 71)	18.6±3.0*** (% 70)	18.2±2.2*** <% 69)
		80 µg/ml	18.1±3.1*** (% 68)	18.0±2.5*** (% 68)	18.0±2.3*** (% 68)

* p<0.001; ** p<0.05; *** p<0.01



Resim 1. Verapamil ve protamin sülfat uygulanmış, frenik sinir-hemidiyafragma kasına ait mekanogramı.

ml protamin varken sırasıyla 18.9±3.1, 18.1±3.1, 18.0±2.5,18.0±2.3 g elde edildi. Bu değerler preparatın normal kasılma kuvvetleriyle karşılaştırıldığında 40 ve 80 µg/ml protamin konsantrasyonlarında kasın kasılma kuvvetinde anlamlı derecede düşüşlerin olduğu ($p < 0.01$), 20 µg/ml'de ise 10 dakika içinde kasın kasılma kuvvetinde azalma olmasına karşın bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, ancak önemli ölçüde azalmanın 20. ve 30. dakikalarda olduğu görüldü ($p < 0.05$; Tablo 1).

Biyoelektriksel Parametreler

Sıçan izole kalp papiller kası ve FSH preparatlarında protamin sülfatın 20, 40 ve 80 µg/ml konsantrasyonlarındaki biyoelektrik paramet-

releri (dinlenim zar potansiyeli {DZP), aksiyon potansiyeli genliği {APG) ve overshoot (OSH) değerleri) Tablo 2'de ayrıntılı olarak verildi.

a) İzole kalp papiller kası kararlı duruma geldikten sonra; DZP: -77.0±3.1 mV, APG: 98.9±3.1 mV ve OSH: 17.7±3.2 MV olarak bulundu. Ortama 20 μg/ml protamin sülfat konulduğunda bu değerler sırasıyla -76.4±2.2/ 97.3±5.0 ve 16.8±2.6 mV olarak saptandı. Bu değerler protaminsiz değerlerle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 2).

Ortamda 40 μg/ml'lik protamin sülfat bulunduğu zaman DZP, APG ve OSH değerleri sırasıyla -72.6±2.8, 93.0±5.4 ve 11.2±1.9 mV olarak bulundu. Bu değerler protaminsiz değerleri ile karşılaştırıldığında fark anlamlı bulundu ($p < 0.001$; Tablo 2).

Ortamda 80 μg/ml'lik protamin sülfat bulunduğu zaman DZP ve APG değerleri sırasıyla -67.4±2.0 ve 69.7±4.9 mV bulundu ve OSH yanıtı elde edilemedi. Bu değerler protaminsiz değerleriyle karşılaştırıldığında fark anlamlı bulundu ($p < 0.001$; Tablo 2).

b) FSH preparatı kararlı duruma geldikten sonra:

1) Direkt uyarıyla:

Protaminsiz DZP, APG ve OSH değerleri sırasıyla -77.3±3.6 mV, 107.0±3.8 ve 26.4±2.5 mV olarak bulundu (Tablo 2).

Ortama 20 μg/ml protamin sülfat konulduğunda DZP, APG ve OSH değerleri sırasıyla 78.1±2.7, 106.7±2.3 ve 25.9±2.2 mV olarak saptandı. Bu değerler protaminsiz değerlerle karşılaştırıldığında fark anlamlı bulundu (Tablo 2).

Ortama 40 μg/ml protamin sülfat konulduğunda DZP -80.2±2.3 mV, APG ve OSH değerleri sırasıyla 106.2±2 ve 25.7±2.2 mV olarak bulundu. Bu değerler protaminsiz değerleriyle karşılaştırıldığında DZP'nin anlamlı derecede azalıp, kasın depolarize olduğu saptandı ($p < 0.001$; Tablo 2). Diğer taraftan APG ve OSH değerlerinin protaminsiz değerlere göre İstatistiksel olarak anlamlı olmadığı Tablo 2'den görülmektedir.

Ortama 80 μg/ml protamin sülfat konulduğunda DZP, APG ve OSH değerleri sırasıyla-

Tablo2. Sıçan kalp papiller kası ve frenik sinir-hemidiyafragma kas preparatlarında protamin sülfatın (20, 40 ve 80 μg/ml dozlarında) etkisine ait bioelektriksel parametreler (Ort.±SD).

				Protamin Sülfatlı Banyoda Ölçülen Biyoelektriksel Parametreleri (mV) (n=80)		
Doku		**Biyoelektrik Parametreler (mV)**	**Normal (Protaminsiz) (n = 80)**	**20 μg/ml**	**40 μg/ml**	**80 μg/ml**
Kalp Papiller		DZP	-77.0±3,1	-76.4±2.2	-72.6±2.8*	-69.4±2.0*
Kası		APG	98.9±3.1	97.3±5.0	93.0±5.4*	70.7±4.9*
(N = 10)		OSH	17.7±3.2	16.8±2.6	11.2±1.9*	-
	Direkt	DZP	-77.3±3.6	-78.1 ±2.7	-80.2±2.3*	-81.9±2.5*
Frenik-Sin	Uyarı	APG	107.0±3.8	106.7±2.3	106.2±2.0	105.9±3.7
Hemidiyaf.		OSH	26.4±2.5	25.9±12.0	25.7±2.2	26.0±2.8
Kası						
(N - 10)	İndirekt	DZP	-76.9±2.9	-77.6±1.7	-79.7±1.6*	-81.4±2.6*
	Uyarı	APG	106.5±4.3	103.8±3.8*	97.5±2.8*	92.7±3.0*
		OSH	25.7±3.4	23.9±2.0*	18.0±3.3*	9.1±1.2*

* $p<0.001$, N: Preparat sayısı, n: Kayıtlanan zar ve aksiyon potansiyel sayısı.
DZP: Dinlenim zar potansiyeli, APG: Aksiyon potansiyeli genliği, OSH: Overshoot.

-81.9±2.5, 105.9±3.7 ve 26.0±2.8 mV olarak bulundu. Bu değerler protaminsiz değerlerle karşılaştırıldığında DZP'nin anlamlı derecede azalıp, kasın depolarize olduğu ($p < 0.001$), APG ve OSH değerlerinin ise protaminsiz değerlere göre anlamlı değişiklikler göstermediği tespit edildi (Tablo 2).

2) İndirekt uyarıyla:

Protaminsiz DZP, APG ve OSH değerleri sırasıyla -76.9±2.9, 106.5±4.3 ve 25.7±3.4 mV olarak bulundu.

Ortama 20 μg/ml protamin sülfat konulduğunda DZP, APG ve OSH değerleri sırasıyla -77.6±1.7, 103.8±3.8 ve 23.9±2.0 mV olarak bulundu.

Ortama 40 ve 80 μg/ml'lik protamin sülfat konulduğunda APG ve OSH değerleri sırasıyla 97.5±2.8, 18.0±3.3 mV ve 92.7±3.0, 9.1±1.2 mV olarak bulundu.

İndirekt uyarıyla, 20, 40 ve 80 μg/ml'lik protaminli DZP ve OSH değerlerinde protaminsiz değerlere göre anlamlı derecede azalma tespit edildi ($p < 0.001$, Tablo 2). FSH preparatının indirekt uyarıda 40 ve 80 μg/ml protamin konsantrasyonlarında anlamlı derecede negatifleşmesi ($p < 0.001$), bu konsantrasyonlarda kasın depolarize olduğunu göstermektedir.

Tartışma

Protamin sülfatın kalp performansına etkisi ve bu etkinin mekanizması konusunda klinik ve deneysel çalışmalar mevcuttur (1-4, 7-11).

Kardiyopulmoner bypass'dan çıkışta protaminin, özellikle sol ventrikül fonksiyonları kötü olan olgularda, sol ventrikül fonksiyonları iyi olan olgulara göre negatif inotropik etkisinin daha fazla olduğu klinik olarak bilinmektedir (2,3).

Son dönemlerde yapılan deneysel çalışmalarda, protamin sülfatın izole edilmiş miyokard stiplerinde doza bağlı olarak kasılmayı deprese edip negatif inotropik etki oluşturduğu rapor edilmiştir (7-11). Ancak bu etkinin hücresel mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Lin ve ark. (12) negatif inotropik etkinin, protaminin iyon kanallarında oluşturduğu konformasyonel değişikliklerden kaynaklandığını; Hird ve arkadaşları (8, 9) ise protaminin β-adrenerjik reseptör duyarlılığını azaltarak bu etkiye neden olduğunu bildirmişlerdir.

Daha önceki benzer bir çalışmamızda (7) protaminin izole edilmiş sıçan kalp papiller kasında (20 ve 80 μg/ml dozlarda) doza bağlı olarak kasılma kuvvetini azalttığı, kasılma ve gevşeme sürelerini uzattığı ve kasta kontraktür oluşturduğu gösterilmişti. Bu etkinin muhtemel nedenleri şöyle sıralanabilir: a) Protamin, hücre zarında Na^{+}, K^{+} ve Ca^{+2} iyon iletkenliklerini değiştirmektedir, b) Sarkoplazmik retikulum ve mitokondri gibi internal membranların Ca^{+2} reuptake'ni azaltmakta ve bunun sonucunda az da olsa kontraktür oluşturmaktadır. Başka bir deyişle protamin sülfat, hücre zarında ve mitokondrilerde enzimatik reaksiyonları etkileyerek kalsiyum hemostazını etkilemektedir.

Iwatsuki'nin çalışması (11) ve bizim önceki deneysel çalışmamız (7), protaminin kalsiyum kanalları üzerindeki etkilerine hücresel düzeyde yeterince açıklık getirememiştir. Bu etkinin hücresel düzeyine açıklık getirebilmek için:

a) β-adrenerjik reseptörü devre dışı bırakmak amacıyla β-adrenerjik reseptörlerin olmadığı,

b) Kalsiyum kanallarına olan etkilerini inceleyebilmek için aynı preparatta indirekt uyarıyla Ca^{+2} kanallarını devreye sokup, direkt uyarıyla devreden çıkarma olanağı sağladığı için FSH preparatı seçildi.

FSH preparatının direkt uyarılmasıyla (uyan kalsiyum kanalları üzerinden olmamakta) protamin ve verapamil preparatın kasılma ve kuvvetlerinde doza bağlı olarak anlamlı değişiklik oluşturmamaktadır. FSH preparatının indirekt

uyarılması ile (uyarı kalsiyum kanalları üzerinde olmaktadır) kalsiyum kanal blokörü (verapamil 55.5 μg/ml) ve protamin dozlarında, preparatın kasılma kuvvetinde azalma meydana gelmekte, ancak bu azalma verapamilin oluşturduğu düzeyde olmamaktadır (Tablo 1). Daha önceki çalışmamız da (7), papiller kasta protaminin doza bağlı olarak kasılma kuvvetinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar oluşturduğu gösterilmiştir. Bu veriler ışığında protaminin kalsiyum kanalları üzerinde önemli derecede etkili olduğu sonucuna varılmaktadır.

Hird ve arkadaşları (9), protaminin, negatif inotropik etkiyi, β-adrenerjik reseptör duyarlılığını azaltarak yaptığını, ileri sürmüşlerdir. Kalp kasının kasılma kuvvetinde oluşan azalma sadece β-adrenerjik reseptör duyarlılığındaki değişikliğe bağlanamaz. Çünkü çalışmamızda görüldüğü gibi hemidiyafragma kasında β-adrenerjik reseptör olmamasına rağmen, kasılma kuvvetinde ve biyoelektriksel parametrelerde değişiklikler olmaktadır. Bundan dolayıdır ki protamin kalsiyum kanallarında konformasyonel değişiklikler oluşturduğu, kalsiyum girişini azaltması sonucunda da kas kasılma kuvvetinde azalmanın olduğu düşünülmektedir.

Papiller kasında, 40 ve 80 μg/ml protaminli ortamlarda, DZP ve APG değerlerinde anlamlı derecede azalma görülüp, kas depolarize olmaktadır, APG'de özellikle overshoot değerinin sıfır seviyesine kadar inmesi, toplam aksiyon potansiyeli süresinin uzayarak, özellikle repolarizasyon fazında karakteristik değişiklikler oluşturması, protaminin sodyum ve potasyum iyon kanallarının kinetiklerini düşündürmektedir.

FSH preparatında, protaminin 40 ve 80 μg/ml dozlarında, DZP değerinin protaminsiz değere göre daha fazla negatifleşmesi, daha fazla potasyum iyonunun hücre dışına çıkmasıyla olmakta, bu da kasın hiperpolarize olarak uyarılabilirliği zorlaşmaktadır. Ancak papiller kasında ise, yeterli miktarda potasyum iyonunun hücre dışına çıkmaması nedeniyle zar potansiyeli gerçek dinlenim zar potansiyeline dönmediğini, yani kasın depolarize olduğunu göstermektedir.

Direkt uyarıya APG'de istatistiksel olarak anlamlı bir değişme olmamasına rağmen indirekt uyarıda APG'nin küçülmesinin muhtemel nedeni, protaminin, presinaptik kalsiyum kanallarını kısmen bloke ederek yeterli miktarda Ca^{+2} iyonunun sinir hücresine girememesi, bunun sonucunda da istenilen miktarda asetil kolinin salınamaması ve postsinaptik zarda Na^{+} ve K^{+} geçirgenliğinin azalmasından oluşmaktadır.

Sonuç olarak; protamin kalp kası iyon kanallarında konformasyonel değişiklikler oluşturmakta ve bunun sonucunda zarın Na+ ve K^{+} iletkenliklerini azaltmaktadır. Ayrıca protamin, kalsiyum kanallarının geçirgenliğini etkileyerek kasılma kuvvetinde de azalma meydana getirmektedir. Protaminin kanal düzeyindeki etkilerinin, voltaj veya patch-clamp teknikleri kullanılarak açıklığa kavuşturulabileceği görüşündeyiz.

Kaynaklar

1. Glinger GN, Wecker RM**,** Bonchek LL. Noncardiogenic Pulmonary edema and peripheral vascular collapse following cardiopulmonary bypass: rare protamine reaction? Ann Thorax Surg 1980; 29: 20-25.
2. Jastrebski J, Sykes WK, Woods DG. Cardiorespiratory effects of protamine after cardiopulmonary bypass in man. Thorax 1974; 29: 534-538.
3. Shapira N, Schaff NV, Piehler JW, White RD, Still Jc, Pluth JR. Cardiovascular effects of protamine sulfate in man. J Thorac Cardiovasc Surg 1982; 84: 505-514.
4. Gourin A, Streisanda RL, Greimeder JK, Stuckey JH. Protamine administration and the cardiovascular system, J Thorac Cardiovasc surg 1971; 62: 197-204.
5. Döring HJ, Hehert H. The isolated perfused warm-blooded heart according to langendorff. Germany, Biomesstechnic-Verlag P.4,1988.

6. Kelsel SG, Nochomavits WL. Fatigue of the mammalian diaphragm in vitro. J Appl Physiol 1982; 53: 440-447.
7. Iteğin M, Topçuoğlu MŞ, Günay I ve ark. Protamin sülfatın izole sıçan kalp papiller kasının kontraktil ve kontraktür parametrelerine etkisi. GKD Cer Derg 1996; 4: 91-95.

Yazışma Adresi: M. Şah TOPÇUOĞLU
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı
01330 Balcalı - ADANA
e-mail: Sahtopcu@pamuk.cu.edu.tr.
Fax: O 332 323 26 41

8. Hird RB, Spinale FG, Hewett KW, Mukherjee R, Crawuford FA. The direct effects of protamine sulfate on myocyte contractile processes, J Thorac Cardiovasc Surg 1994; 108:1100-1114.
9. Hird RB, Crawford FA, Mukherjee R, Micheal RZ**,** Francis GP, Effects of protamine on myocyte contractile function and (β-adronegic responsiveness. Ann Thorac Surg 1994; 57: 1066-1075.
10. Housmans PR, Furguson DW. Inotropic effects of protamine sulfate on isolated mammalian cardiac muscles. Mechanisms of action. Anesthesiology 1987; 67: A24.
11. Iwatsuki N, Watsukawa S, I Watsukİ K. A weak negative inotropic effect of protamine sulfate upon the isolated canine heart muscle. Anesth Analg 1980; 59: 100-102.
12. Lin CI, Luk HN, Wei J, Tsao SJ. Electromechanical effects of protamine in isolated human atrial and canine ventricular tissues. Anesth Analg 1989; 68: 479-485.