

Protamin Sülfatın İzole Sıçan Kalp Papiller Kasının Kontraktil ve Kontraktür Parametrelerine Etkisi*

Mustafa İTEĞİN, M. Şah TOPCUOĞLU, İsmail GÜNAY, ORHAN K. SALİH, Bülent KISACIKOĞLU, Ali FEDAKAR, Acar TOKCAN

*Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik** ve Göğüs ve Kalp Damar Cerrahisi*** Anabilim Dalları, Adana*

Bu çalışmada farklı dozlardaki protamin sülfatın izole sıçan kalp papiller kasının kasılma ve kontraktür parametreleri üzerine olan etkileri araştırıldı. Çalışmada, ağırlıkları 210-260 g arasında değişen toplam 20 adet erkek Wistar türü sıçan kullanıldı. Her sol ventrikülden, yaklaşık 5-6 mm uzunluğunda, 1-1.5 mm genişliğinde ve 32±4 mg ağırlığında bir papiller kas izole edildi. İzometrik çevireçle bu kasların 30 °C'de kontrol (0), 20, 40, ve 80 µg/ml protamin ve eşit oranlı heparin+protamin dozlarında, 0.1 Hz ve 0.5 ms süreli uyarana karşı geliştirdiği kasılma ve kontraktür parametreleri ölçüldü.

Papiller kasın kasılma kuvvetleri 20, 40 ve 80 µg/ml protamin dozlarında anlamlı derecede ($p < 0.001$) düşerken, 40 ve 80 µg/ml protamin ortamında kasılma ve yarı gevşeme süreleri uzamaktadır ($p < 0.05$). 40 µg/ml kontrakte olup, tepe gerimi (PT)'nin arttığı ve tepe gerimine ulaşma zamanının (TPT) azaldığı saptandı. Kasılma ve gevşeme hızları ($\pm dF/lt$) ise doza bağlı olarak düşüş göstermektedir ($p < 0.001$). Papiller kas eşit oranlı heparin+protamin ortamlarında ise zayıf bir negatif inotropik etki göstermektedir.

GKD Cer Derg 1996; 4: 91-95

The Effects of Protamine Sulfate in the Isolated Rat Heart Papillary Muscle's Parameters of Contraction and Contracture

In this study, the effects of different concentrations of protamine sulfate in the isolated rat heart papillary muscle's parameters of contraction and contracture were studied. 20 male Wistar rats weighing between 210-260 g were used in the study. From each left ventricle, a papillary muscle of 5-6 mm in length 1-1.5 mm in width and 32 ± 4 mg in weight was isolated. With isometric transducer, in 30 °C, The parameters of contraction and contracture were measured after 0.1 Hz 0.5 ms of impulse with control (0), 20, 40 and 80 µ/ml protamine and an equal proportion of heparin, protamine concentration.

The concentration of papillary muscle decreased significantly ($p < 0.001$) and in 40, 80 µg/ml protamine concentration and half relaxation time were prolonged ($p < 0.05$). After a dose of 40 µg/ml protamine, the muscle contracted, the peak tension (TPT) decreased. The contraction and relaxation speed ($\pm dF/dt$) decreased with dosa. Papillary muscle showed a weak negative inotropic effect in solutions containing equal proportions of heparin and protamine.

Kardiyopulmoner bypass sonrasında heparinin oluşturduğu antikoagülan etkiyi nötralize etmek için, bir polikatyonik peptid olan protamin sülfatın rutin olarak kullanıldığı bilinmektedir. Protamin sülfatın oluşturduğu hipotansiyon yan etkisi konusunda çok sayıda çalışma mevcuttur.

Bu çalışmaların bir kısmında yan etkiden pulmoner ve periferik dolaşım (1-3),

diğerlerinde ise kontraktil fonksiyonları sorumlu tutulmaktadır (4-9).

Özellikle, protamin sülfatın miyokard kasılma prosesleri üzerinde oluşturduğu depresif etkinin ne tür bir mekanizmayla oluştuğu günümüzde tartışma konusu olmuştur. Farklı dozlardaki protamin sülfat ve birebir heparin+protaminin direkt olarak izole sıçan kalp papiller kasının kontraktil ve kontraktür parametrelerine etkisini belirlemek üzere bu çalışma yapıldı.

(* Bu çalışma Göğüs ve Damar Cerrahisi Derneği IV. Ulusal Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

Materyal ve Metod

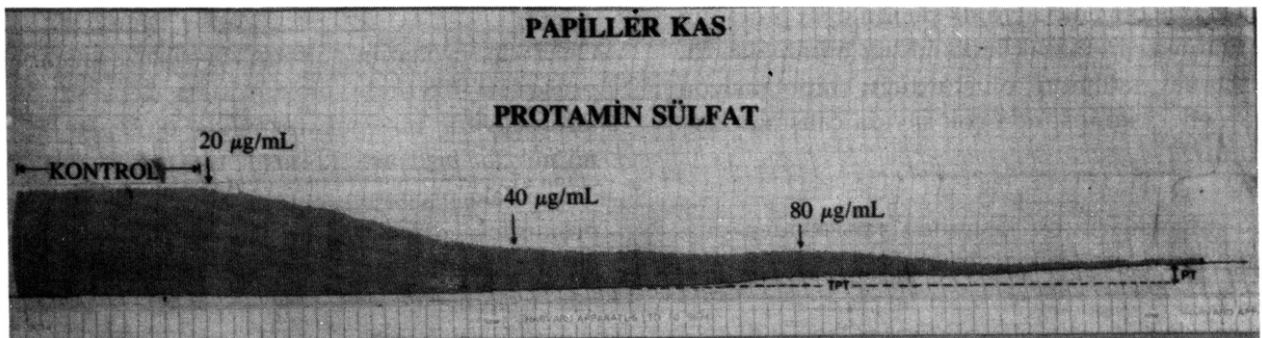
Çalışmada, ağırlıkları 210-260 g arasında değişen 20 adet erkek Wistar türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar, sodyum pentobarbital (30 mg/kg, j.p.) injeksiyonu ile anestezi edilerek operasyon masasına sabitlendi. koroner arterde tromboz oluşumunu önlemek amacıyla vücut ağırlığının her 100 gramı başına 500 IU heparin İV olarak uygulandı. Trakea kanüle edildi. Cilt batin ortasından boyuna kadar açıldıktan sonra sternotomi yapılarak perikard açıldı. Assendan aort çevre dokudan temizlenip pulmoner arterden ayrıldı. Yapay perfüzyat (Krebs) vermek için aortik kanül aortaya yerleştirildi (11). Perfüzyona başlamadan önce sağ atriyum bir insizyonla açılarak kalp dekomprese edildi. Kalp izole edildikten sonra Krebs çözeltisi (litrede mM olarak 113 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄.7H₂O, 1.9 CaCl₂.2H₂O, 1.2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃ ve 11.5 glukoz) içeren ve %95 O₂-%5 CO₂ gaz karışımı verilen ayırma kabına alındı. Yapay perfüzyona başlandıktan sonra, kalbin ekstrakorporeal ortama adaptasyonu için 10-20 dakika beklendi.

Her sol ventrikülden, kordae tendineayı içeren yaklaşık 5-6 mm uzunluğunda, 1-1.5 mm genişliğinde ve 32±4 mg ağırlığında bir papiller kas izole edildi. İzole edilen kaslar platin elektrodlar arasına uygun tarzda yerleştirilip, sıcaklığı 30 °C'de sabit tutulan 20 ml Krebs çözeltisi içeren izole organ banyosuna asıldı. Banyo çözeltisinin pH'sı 7.34-7.45 arasında tutuldu ve ortama devamlı %95 O₂-%5 CO₂ gaz karışımı verildi. Bir saatlik termoregülasyon ve denge-

lenme periyodundan sonra supramaksimal uyarın voltajı ve optimum kas boyu (maksimum kas gerimini veren boy) belirlendi. Kas bu gerim altında on dakika bekletildikten sonra, 0.5 ms süreli ve 0.1 Hz frekanslı kare pulslarla supramaksimal olarak 15 dakika boyunca uyarılıp hazırlık dönemi tamamlandı. Kası uyarım için Harvard Double Channel Stimülatör, mekanik yanıtları kayıtlamak için Grass Polygraph Model 7 ve FT.03 forcedisplacement transduseri ve Hitachi Digital Storage Oscilloscope (VC-6045) kullanıldı.

Hazırlık dönemi sonunda, izometrik transduser ile protaminsiz (kontrol) ve protaminli (20, 40, ve 80 µg/ml) ve birebir heparin+protamin ortamlarında uyarana karşı gelişen izometrik kas cevaplarından kasılma kuvveti (F8), kontraksiyon süresi (CT) ve yarı gevşeme süresi (1/2RT), kasılma ve gevşeme hızları (± dF/dt) belirlendi. Kas kasılmasının mekanogramı 80 dakika boyunca yazdırıcıda kaydedildi. Bu mekanogramdan kas kasılmasının tepe gerimine ulaşma zamanı (TPT) ve tepe gerimi (PT) ölçülerek kontraktür parametreleri belirlendi (Resim 1). Kasılma ve gevşeme hızları ise bilgisayar ortamına alınan kasılma eğrisinin türevi alınarak bulundu.

Uygulanan dozlar klinik kullanım sınırları içerisinde. Örneğin 40 µg/ml protamin konsantrasyonu klinik kullanımda 2.5 mg/kg dozuna karşılık gelmektedir (9). İstatistiksel değerlendirme; kontrol ve deney grupları arasında Student t testi uygulanarak yapıldı.



Resim 1. Protamin uygulanmış sıçan kalp papiller kasının izometrik kasılma mekanogramı

Bulgular

Kontrol grubuna (n=10) ait kas kasılma parametreleri (Fs, CT, 1/2RT, $\pm dF/dt$ ve $\pm dF/dt$) sırasıyla 1.39 ± 0.07 g, 154.9 ± 7.2 ms, 100.4 ± 8.1 ms, 14.0 ± 2.6 mg/ms ve 8.1 ± 1.7 mg/ms olarak bulundu (Tablo 1).

Deney grubunda (n=10), protamin sülfatın 20 mg/ml'lik dozunda) papiller kasın kasılma parametreleri (Fs, CT, 1/2 RT, $\pm dF/dt$ ve $\pm dF/dt$) sırasıyla 1.10 ± 0.05 g, 161.3 ± 18.2 ms, 110.2 ± 14.3 ms, 10.3 ± 1.9 mg/ms ve 8.1 ± 1.3 mg/ms olarak saptandı (Tablo 1, Şekil 1).

Düşük doz protamin sülfatın (20 μ g/ml) etkisinde kasın kasılma kuvveti kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken ($p<0.05$), diğer kasılma parametrelerinde (CT, 1/2 RT, $\pm dF/dt$) ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilemedi ($p > 0.05$, Tablo 1). Buna karşın 40

ve 80 μ g/ml protamin sülfat etkisinde kasım verdiği mekanik yanıtların tüm kasılma parametreleri, kontrol değerlerine göre anlamlı olarak değişmektedir ($p<0.05$, $p<0.001$). Buna göre protamin sülfat dozunun artmasıyla kasılma kuvveti doza bağlı olarak inhibe olmaktadır ($p<0.001$, Tablo 1). Kasılma ve yarı gevşeme süreleri 40 μ g/ml protamin dozundan sonra uzamaktadır ($p < 0.05$). Kasılma ve gevşeme hızları ise 40 μ g/ml protamin dozundan sonra doza bağlı olarak azalmaktadır ($p<0.001$, Tablo 1).

Tepe gerimine ulaşma zamanı (TPT) 40 μ g/ml protamin dozundan sonra azalmaktadır. Buna karşılık tepe gerimi (PT) protamin sülfatın 20, 40 ve 80 μ g/ml'lik dozlarında sırasıyla 0.20 ± 0.04 ve 0.33 ± 0.06 g olacak şekilde tedrici olarak artmaktadır (Tablo 2, Resim 1). Düşük doz protamin (20 μ g/ml) etkisinde kasta anlamlı

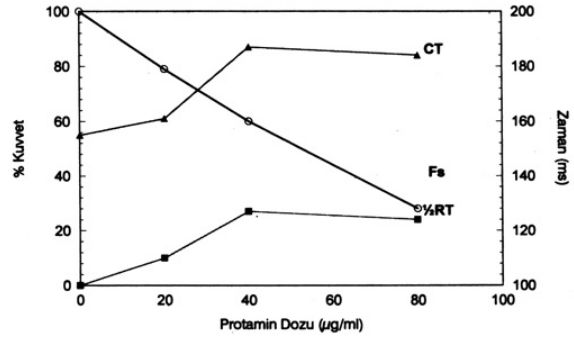
Tablo 2. Sıçan kalp papiller kasında protamin sülfatın oluşturduğu kontraktür parametre değerleri (n=10. ort \pm SD)

| Protamin sülfat konsantrasyonu (μ g/ml) | Tepe gerimine ulaşma zamanı TPT (dak) | Tepe gerimi PT (g) | Kasılma kuvveti Fs (g) |
|--|---------------------------------------|--------------------|------------------------|
| Kontrol grubu | - | - | 1.39 ± 0.07 |
| 20 | - | - | 1.10 ± 0.05 |
| 40 | 25 ± 4.7 | 0.20 ± 0.04 | 0.83 ± 0.08 |
| 80 | 13 ± 3.2 | 0.33 ± 0.06 | 0.39 ± 0.04 |

Tablo 1. Sıçan kalp papiller kasından kayıtlanan izometrik sarsı parametrelerinin protamin sülfat dozu ile değişimi. Sonuçlar ort \pm SD olarak gösterilmiştir.

| Protamin sülfat konsantrasyonu | SARSI PARAMETRELERİ (n=10) | | | | |
|--------------------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| | Fs (g) | CT (ms) | 1/2 RT (ms) | +dF/dt (mg/ms) | -dF/dt (mg/ms) |
| KONTROL GRUBU | 1.39 ± 0.08 | 154.9 ± 9.4 | 100.4 ± 7.6 | 14.0 ± 2.1 | 8.1 ± 1.1 |
| 20 μ g/ml | $1.10 \pm 0.06^*$ | 161.3 ± 17.1 | 110.2 ± 13.2 | 10.2 ± 2.0 | 6.2 ± 2.0 |
| 40 μ g/ml | $0.83 \pm 0.07^*$ | $187 \pm 26.4^{**}$ | $127 \pm 16.7^{**}$ | $3.0 \pm 0.9^*$ | $2.2 \pm 0.7^*$ |
| 80 μ g/ml | $0.38 \pm 0.06^*$ | $184.5 \pm 30.1^{**}$ | $124 \pm 18.4^{**}$ | $1.1 \pm 0.3^*$ | $0.9 \pm 0.2^*$ |

* $p<0.001$, ** $p<0.05$.



Şekil 1. Sıçan kalp papiller kası sarsı eğri parametrelerinden kasılma kuvveti (Fs), kasılma zamanı (CT) ve yarı gevşeme zamanının (1/2 RT) protamin sülfat konsantrasyonu ile değişimi

bir kontraktür oluşmazken; 40 ve 80 µg/ml gibi dozlarda, doza bağlı olarak göreceli bir kontraktür oluşmaktadır (Tablo 2, Resim 1). bu bulguların yanında başka önemli bir bulgu da, inhibisyondan sonra dokunun defalarca yıkanıp 50 dakika beklenmesine rağmen normale dönmemesidir. Başka bir deyişle protamin sülfat tersinmez (irreversible) bir etki göstermektedir. Birebir oranında verilen heparin + protamin dozlarında papiller kas kasılma kuvvetinde zayıf inotropik etki gözlemlendi.

Tartışma

Protamin sülfat, heparinin oluşturduğu anti-koagulan etkisi nötralize etmek için rutin olarak kullanılmaktadır. Diğer yandan protamin sülfatın hipotansiyon oluşturduğu, ancak bu yan etkinin kalp, pulmoner ya da periferel dolaşımdan mı kaynaklandığı konusu henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Konuyla ilgili yapılan ilk çalışmalarda, protaminin kalbin fonksiyonlarını etkileyecek kadar tokik bir ilaç olmadığı bildirilmiştir (12,13). Oysa son zamanlarda yapılan birçok çalışmada, protaminin izole edilmiş kardiyak kas striplerinde doza bağlı olarak kasılmayı deprese ettiği bildirilmektedir (5-8).

Housmans ve Ferguson (14) kedi kalp papiller kasında 100 µg/ml'den yüksek protaminin doza bağlı göreceli bir şekilde tüm kasılma parametrelerini deprese ettiğini ve kontraktüre neden olduğunu saptamışlardır. Iwatsuki ve ark. (8) 50 µg/ml protamin dozunun köpek sağ ventrikül kasında izometrik kasılma kuvvetini %12.4 oranında düşürdüğünü belirtmişlerdir. Hird ve ark. (10) izole domuz miyositleri 20 µg/ml (1.25 mg/kg) protamin dozuna maruz bırakıldığında miyosit kontraktil fonksiyonlarında anlamlı değişiklik olmazken, 40 ve 80 µg/ml'de miyosit fonksiyonlarında doza bağlı anlamlı azalmaların olduğunu saptamışlardır.

Yukarıda adı geçen araştırmalar, kedi, köpek ve domuz gibi değişik hayvan türlerinin kalp kasılma fonksiyonlarının protaminden etkilenip azaldığını bildirmektedir. Çalışmamızda, protamin içeren Krebs solüsyonundaki sıçan kalp

papiller kas preparatında direkt elektriksel uyarı ile gelişen izometrik kasılma kuvvetinin, protaminin dozuna bağlı olarak azalıp deprese olduğu gösterilmiştir (Tablo 1, Resim 1). Görüldüğü gibi bulgularımız da aynı doğrultuda olup, protaminin sıçan kalp papiller kasında negatif inotropik etki yaptığını göstermektedir.

Lin ve ark (6) protaminin neden olduğu negatif inotropik etkinin, iyon kanallarında konformasyonel değişiklikler sonucu, zarın sodyum ve potasyum iyon iletkenliğinin azalmasıyla oluştuğunu, bunun da dinlenim zar potansiyelini önemli derecede değiştirdiğini ve aksiyon potansiyel genliğini düşünüp süresini uzattığını bildirmişlerdir.

Hu ve ark. (15), Hird ve ark. (10) ise orta doz (40 µg/ml) protamin dozunun miyositin β-adrenerjik reseptör yanıtını deprese ettiğini, yüksek dozda ise bu yanıtın tamamen yok olduğunu ve bunun sonucunda dinlenim zar potansiyelinin önemli derecede düşüp kasın depolarize olduğunu saptamışlardır. Protaminin miyokardın fonksiyonlarını etkilerken hücre dışından mı, içinden mi yoksa her iki yoldan birlikte mi etkilediği konusu tam olarak açıklığa kavuşmuş değildir. Birçok araştırmacı, protaminin miyosit sarkolemmasındaki ekstrasellüler reseptör sistemini etkileyerek kasılma genliğini azalttığı görüşündedir (10,17).

Çalışmamızda, protaminin 40 ve 80 µg/ml dozlarında CT, 1/2 RT, dF/dt ve -dF/dt değerlerinin kontrol değerlerinden son derece farklı olduğu bulunmuştur (Tablo 1; p<0.001, p<0.05). Bu dozlardaki protamin sülfat kasılma ve yarı gevşeme sürelerini uzatmakta, kasılma ve gevşeme hızlarını yavaşlatmaktadır.

Wakefield ve ark. (15) protaminin endotelial hücrelerde spesifik Ca²⁺ ATPase aktivitesini azalttığını saptamışlardır. Caplan ve ark. (7) protaminin tavşan papiller kalp kasını kontrake ettiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, 40 ve 80 µg/ml protamin dozlarında doza bağlı TPT'nin azalması ve PT'nin artması kasta göreceli bir kontraktürün olduğunu göstermektedir (Tablo 2, Resim 1).

Kasılmanın inhibisyonundan sonra kasın defalarca yıkanıp geri dönmemesi, spesifik enzim aktivitesinin azalması yanında hücrede enzimatik bozulmaların olabileceğini ve toksik etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

Krebs çözeltisine bire bir oranında heparin ve protamin sülfat ilave edildiğinde beyaz bir çökelti oluşması, heparinin polianyonik bir polipeptid, protaminin ise polikasyonik bir polipeptid olmasından kaynaklanmaktadır. Bire bir heparin ve protamin sülfatlı çözeltide (klinik doz: 1-4 mg/kg) papiller kas kasılma kuvvetinde zayıf negatif inotropik etki oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, protamin sıçan papiller kasının kasılma kuvvetini azaltmakta, kasılma ve gevşeme sürelerini uzatmakta ve kontraktür oluşturmaktadır. Bu etkileri muhtemelen: Hücre zarının iyon iletkenliklerini düşürerek, spesifik Ca²⁺ ATPase aktivitesini zayıflatarak, sarkoplazmik retikulum ve mitokondri gibi internal membranlardan Ca²⁺ reuptake'ini azaltarak ve kalsiyum iyonlarının flementlere bağlanma süreçlerini uzatarak yapmaktadır.

Kaynaklar

1. Jastrebski J, Sykes MK, Woods DG: Cardiorespiratory effects of protamine after cardiopulmonary bypass in man. *Thorax* 1974; 29:534-38.
2. Shapira N, Schaff NV, Piehler JM, White RD, Still JC, Pluth JR: Cardiovascular effects of protamine sulfate in man. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982; 84:505-14.
3. Olinger GN, Mecker RM, Bonchek LI: Non-cardiogenic pulmonary edema and peripheral vascular collapse following cardiopulmonary bypass: Rare protamine reaction? *Ann Thorac Surg* 1980; 29:20-25.
4. Gourin A, Streisand RL, Greimeder JK, Stuckey JH: Protamine administration and the cardiovascular

- system. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1971; 62:193-204.
5. Wakefield TW, Bies LE, Wroblewski SK, Bolling SF, Stanley JC: Impaired myocardial function and oxygen utilization due to protamine sulfate in an isolated rabbit heart preparation. *Ann Surg* 1990; 212:387-93.
6. Lin CI, Luk HN, Wei J, Tsao SJ: Electromechanical effects of protamine in isolated human atrial and canine ventricular tissues. *Anesth Analg* 1989; 68:479-85.
7. Caplan RA, Su JY: Differences in threshold for protamine toxicity in isolated atrial and ventricular tissue. *Anesth Analg* 1984; 63:1111-15.
8. Iwatsuki N, Matsukawa S, Iwatsuki K: A weak negative inotropic effect of protamine sulfate upon the isolated canine heart muscle. *Anesth Analg* 1980; 59:100-102.
9. Hird RB, Spinale FG, Hewett KW, Mukherjee R, Crawford FA: The direct effects of protamine sulfate on myocyte contractile processes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 108:1100-14.
10. Hird RB, Wakefield TW, Mukherjee R, et al: The direct effects of protamine sulfate on myocyte contractile processes: Cellular and molecular mechanism. *Circulation* 92(Suppl 2):433-46, 1995.
11. Döring HJ, Hebert H: The isolated perfused warm-blooded heart according to Langendorff. Germany, Biomesstechnik-Verlag p.5, 1988.
12. Green CE, Higgins CB, Kelley MJ, et al: Cardiovascular effects of protamine sulfate. *Invest Radiol* 1981; 16:324-29.
13. Gourin A, Streisand RL, Greimeder JK, Stuckey JH: Protamine sulfate administration and the cardiovascular system. *J Thorac Cardiovasc* 1971; 62:193-204.
14. Housmans PR, Ferguson DM: Inotropic effects of protamine sulfate on isolated mammalian cardiac muscles: Mechanisms of action. *Anesthesiology* 1987; 67:A24.
15. Hu J, Wang SZ, Forray C, El-Fakahany EE: Complex allosteric modulation of cardiac muscarinic receptors by protamine: Potential model for putative endogenous ligands. *Mol Pharmacol* 1992; 42:311-21.
16. Wakefield TW, Hinshaw DB, Burger JM, Burkell WE, Stanley JC: Protamine-induced reductions of endothelial cell ATP. *Surgery* 1989; 106:378-85.
17. Hird RB, Crawford FA, Mukherjee R, Zile MR, Spinale FG: Effects of protamine on myocyte contractile function and b-adrenergic responsiveness. *Ann Thorac Surg* 1994; 57:1066-75.