

FARMAKOLOJİ LABORATUVARINDA İZOLE ORGAN PREPARATLARI*

Yalçın Tekol **

Özet: Farmakoloji laboratuvarlarında izole organlar drogların etki mekanizmalarını açıklamakta olduğu gibi biyolojik miktar tayinlerini yapmak için de çok kullanılırlar. Lisans üstü öğrencilerine izole organ hazırlamanın temel prensiplerini vermek amacıyla hazırlanan bu yozıda farmakoloji deneylerinde sıklıkla kullanılan kurbağa rectus abdominis, memeli bağırsak, kurbağa ve memeli kalp preparatlarının hazırlanışı ile ilgili bilgiler özetlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İzole çizgili kas, izole bağırsak, izole kalp

Farmakoloji deneylerinde izole organlar genel olarak farmakoloji deneylerindeki amaca hizmet ederler yani drogların etki mekanizmalarını açıklamaya yardım ettikleri gibi biyolojik tayinler (bioassay) yapmak için de kullanılabilirler. İzole organ çalışmalarında, biyofazda drog konsantrasyonunun değişmesine neden olan distribüsyon, biyotransformasyon, ekskresyon gibi farmakokinetik etkinlikler ya tamamen ortadan kalkmış ya da ileri

Isolated organ preparations in pharmacological laboratory

Summary: Isolated preparations are valuable tools in pharmacological laboratories for clarifying the mechanism of actions of drugs as well as carrying out their bioassays. This paper aims to give information to postgraduate students about basic principles of preparing of isolated organs and describes briefly the most useful isolated organs in pharmacological experiments e.g. frog rectus abdominis, mammalian intestine, frog and mammalian heart preparations.

Key Words: Isolated striated muscle, isolated intestine, isolated heart.

derecede sınırlandırılmış olduğu için etki yerinde drog konsantrasyonunu istenen sınırlar içinde tutmak in vivo preparatlara göre daha kolay olur. Bundan başka izole organ preparatlarında çeşitli refleks mekanizmaları betaraf ederek organlardaki direkt etkileri gözlemek mümkün olur. İzole organ preparatları ile ilgili daha geniş bilgiler çeşitli kaynaklardan (1,2,3,4) elde edilebilir.

* Bu yazı, Erciyes Üniversitesinde lisans üstü öğrenimin geliştirilmesi için üstün gayretler sarfeden değerli arkadaşım Prof.Dr. Ahmet Bilge'nin hatırasını yad etmek üzere Farmakoloji lisans üstü öğrencilerine yardımcı olmak amacıyla hazırlanmıştır.

** Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Öğretim Üyesi.

İzole organlar ameliyatlar sırasında hastalardan çıkarılan organlardan hazırlanabileceği gibi daha ziyade yeni öldürülmüş hayvanlardan elde edilir. Bunların vücuttan çıkarıldıktan sonra çalışmanın bitimine kadar iyon bileşimi plazma sıvısına benzeyen besleyici çözeltiler içinde tutulması şarttır. Bu organların çalışabilmesi için aşağıda özetlenen fizyolojik şartların temini gerekir.

Ortam sıcaklığı: Soğuk kanlı hayvanlardan (kurbağa, kaplumbağa, sülük v.s.) elde edilen preparatlarla oda sıcaklığında çalışılabilir. Sıcak kanlı hayvanlardan alınan organlarla ise ekseriyetle 37°C'de çalışılır. Bazı organlar için 32°C gibi daha düşük sıcaklıklar uygun olabilir. Ortam sıcaklığının en fazla 0.5°C hata ile sabit tutulması gerekir.

Bu şartları temin etmek için izole organ banyoları kullanılır. Bunların başlıca iki tipi vardır. Birinci tipte izole organın bulunduğu iç banyo sıcaklığı sabit tutulan su ile dolu bulunan dış banyo içine daldırılmıştır. Diğer tipte ise banyo çift katlı olarak hazırlanmıştır. İki kat arasında belirli sıcaklıktaki su bir termosirkülator yardımıyla dolaştırılır.

İyon bileşimi: İzole organlar, organ türüne göre az-çok değişmekle birlikte iyon dengesi plazma sıvısına benzeyen izotonik bir sıvı içinde tutulurlar. Bu sıvıya besleyici çözelti de denir. İyon dengesi bakımından önemli olan katyonlar Na^+ , K^+ , Ca^{+2} ve Mg^{+2} , anyonlardan Cl^- , HCO_3^- , H_2PO_4^- ve HPO_4^{2-} iyonlarıdır. Besleyici çözeltiler, bunları tarif eden bilim adamlarının adlarıyla anılır. En önemlilerin bileşimi Tablo I'de görülmektedir. Bu çözeltilerin hazırlanmasında "Analar" derecesinde saf kimyasal maddelerin kullanılması uygun olur. Çözücü distile su ya da deiyonize su olabilir. Tartım işlemleri için santigram terazisi kullanılabilir. Besleyici

çözelti hazırlamakta kullanılacak maddelerin analitik terazide tartılmasına gerek yoktur. Çözelti hazırlanırken dikkat edilecek bir husus kalsiyum tuzunun çözeltiye diğer maddeler ve suyun çoğu ilave edildikten sonra konmasıdır. Bu şekilde kalsiyum iyonlarının çözeltideki karbonat, fosfat ve - varsa- sülfat iyonları ile birleşerek çökelti oluşturması önlenemez. Besleyici çözeltiler hazırlanırken kullanılan kalsiyum ve magnezyum tuzlarının higroskopik olması, bu maddelerin çözeltideki bileşimlerinin sabit olmaması sonucunu verebilir. Bu sakıncayı önlemek için kalsiyum ve magnezyum tuzları miktar tayini yapılmış stok çözeltilerden ilave edilebileceği gibi MgCl_2 yerine higroskopik olmayan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ da kullanılabilir. Bu bileşikten ortama karışan sülfat iyonları bu konsantrasyonlarda deneylerde herhangi bir bozucu etkiye neden olmamaktadır. Mg ve Ca tuzlarına ilaveten K ve fosfat iyonları da hazırlama kolaylığı bakımından önceden hazırlanan (stok) çözeltilerden ölçülerek kullanılabilir.

Enerji ve oksijen ihtiyacı: Dokuların enerji ihtiyacı besleyici çözeltiye katılan glukozdan sağlanır. Oksijen ihtiyacı ise izole organın türüne ve besleyici çözeltinin tipine göre besleyici sıvı içine üflenen hava, saf oksijen ya da karbojen (% 5 CO_2 , % 95 O_2 karışımı)'den sağlanır. Besleyici çözeltiye hava ya da saf oksijen üflenmesi durumunda çözeltilerden CO_2 kaybı söz konusu olabileceğinden bir süre sonra çözeltinin pH'sı alkali ortama kayabilir. Karbojen kullanımında ise ortam asid pH'ya doğru gidebilir. Bundan dolayı bazı durumlarda besleyici çözeltiye uygun bir indikatör ekleyerek pH'nın izlenmesi gerekli olabilir.

İzole Organ Preparatlarının Hazırlanmasında Genel Prensipler

Preparatlar hazırlanırken ezilmemesine ve aşırı gerilmemesine özen göstermek gerekir.

Eğer izole sinir ile çalışılacaksa bu hususta daha dikkatli olmak gerekir. İzole organlar vücuttan çıkarıldıktan sonra daima besleyici çözeltili içinde tutulmalıdır. Bu çözeltilerin önceden oksijenlenmesi uygun olur. Dokular ağın metallerin (bakır, civa, demir v.s.) toksik etkilerine çok duyarlı olduklarından dolayı bunların lastik ve plastik borulardan geçen besleyici çözeltiler içinde bekletilmeleri doğru olmaz. Kauçuk ve cam boruların kullanılması tercih edilmelidir.

Cevapların Uyarılması ve Kaydı

İzole organ deneylerinde cevap genellikle organın kasılması ve gevşemesi şeklinde görülür. Bazı izole organların spontan kasılma ve gevşemeleri kayıtlar için yeterli olur. Bunlara örnek olarak izole kurbağa kalbi, izole memeli kalbi, izole tavşan jejunumu gösterilebilir. Diğer bazı preparatların ise ya elektrikle (sıçan frenik sinir-diyafraim, kobay sağ atriyum, civciv biventer cervicis preparatları) ya da kimyasal ajanlarla (kurbağa rectus abdominis, kobay ileum, izole memeli aort ve trakea preparatları gibi) uyarılmaları gerekir.

Organın elektrikle uyarılması en iyisi bir stimülatör ve uygun bir elektrod yardımıyla yapılır.

Cevapların kaydı izotonik ya da izometrik kayıt sistemlerinden biri kullanarak yapılabilir. izotonik kayıta gerim sabit tutulur. Bu kayıt şekli için cepheden ya da yandan kayıt yapan basit bir levye kullanılabilir. Bu levye alüminyum alaşımından yapılmış birinci çeşit bir kaldıraçtır. Basit levye kullanılması durumunda organın kasılması ile yazdırıcı ucun hareketi arasında her zaman sabit bir orantı bulunmamakla birlikte, farmakoloji deneylerinde etkilerin karşılaştırılması söz konusu olduğundan bu durumun fazla bir sakıncası yoktur. İzotonik kayıt, kuvveti elektrik akımına çeviren bir izotonik

transducer ve elektrik akımı değişimlerini kayda geçiren bir kayıt tertibatı kullanarak da yapılabilir. İzometrik kayıt söz konusu ise bu durumda organın boyu sabit tutulur, gerim değişiklikleri kaydedilir. İzometrik kayıt en iyi şekilde ancak bir izometrik transducer ve bunun irtibatlandırılabilmesi bir kayıt sistemi yardımıyla yapılabilir.

Aşağıda farmakoloji deneylerinde en sık kullanılan izole organ preparatları ile ilgili bilgiler özetlenmiştir.

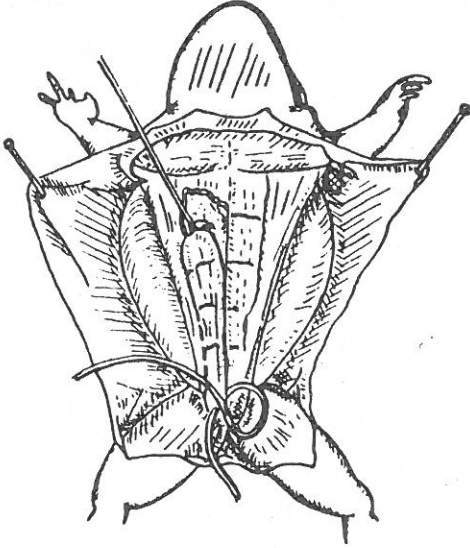
Kurbağa Rectus abdominis Preparatı

Bir izole çizgili kas preparatıdır. Nikotinik reseptörlerin çizgili kas tipini (N_2 reseptörler) ihtiva eder. Dayanıklı bir preparattır. Ortalama ilave edilen asetilkolin'e kasılma ile cevap verir. Süksinikolin ve dekametonyum gibi depolarizan tipte nöromüsküler blok yapanlar da bu preparatta asetilkolin gibi kasılma oluştururlar. Diğer taraftan depolarizan olmayan nöromüsküler blok yapanlar gerek asetilkolin'in gerekse depolarizan nöromüsküler blok yapanların etkisini antagonize ederler.

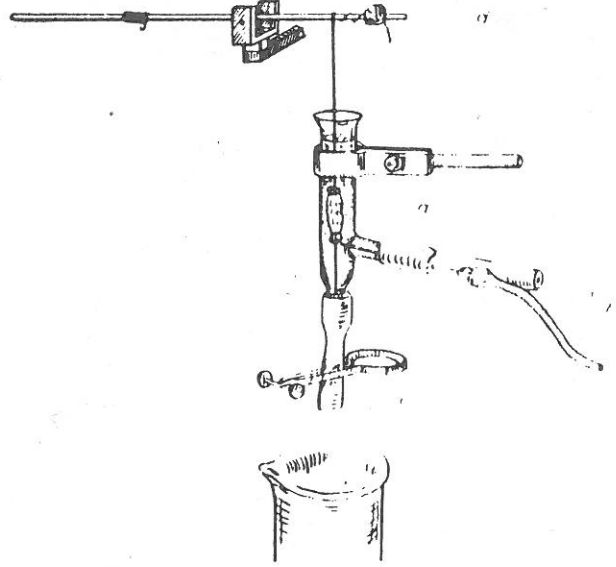
Bu preparat nöromüsküler blok yapan drogların araştırılmasında çok kullanılır. Aynı amaçla kullanılan sinir-kas preparatlarına üstünlüğü drogun sinirler üzerindeki muhtemel etkilerini bertaraf ederek sadece çizgili kas ve nikotinik reseptörlere etkisinin araştırılmasına imkan vermesidir. Bundan başka nöromüsküler blok yapanların depolarizan olan ve olmayan tiplerinin belirlenmesi için de kullanılabilir. Asetilkolin'e duyarlılığı kobay ileumu ve fizostigminli ortamda sülük sırt kası kadar olmamakla birlikte asetilkolin'in biyolojik tayini için de kullanılabilir.

Hazırlanışında tercihen fazla büyük olmayan kurbağalar (yaklaşık 20 g) kullanılır. Kurbağa dekapite edildikten sonra omur iliği bir telle tahrip edilir. Hayvan sırt üstü yatırılıp mantar

levhaya tespit edilir. Karın derisi disseke edildikten sonra sternumdan pubise kadar uzanan her iki rectus abdominis kası zedelenmeden çıkarılır, hayvan çok küçük değilse kaslar orta çizgiden kesilerek ikiye ayrılır. Her iki ucuna bağlanan ipliklerle bir ucundan izole organ banyosundaki sabit noktaya, diğer ucundan yazdırıcıya bağlanır. Preparat kurbağa Ringer çözeltisinde tutulur, oksijen ihtiyacı hava ile sağlanır (Şekil 1).



İzole bağırsak preparatı hazırlanacak hayvanların bir gece aç bırakılmaları bağırsak muhteviyatını azaltmak bakımından tercih edilir. Preparatlarda oksijen ya da hava ile gazlandırılan Tyrode çözeltisi genellikle tercih edilen besleyici çözeltidir. Hazırlanışlarında uygun bir yöntem kullanılarak öldürülen hayvanın abdomeni açılır. Kullanılacak bağırsak parçası çıkarılıp besleyici çözelti içine alınır. Sinirler



Şekil 1. Kurbağa rectus abdominis kası preparatı. Solda kasın kurbağadan çıkarılışı, sağda deney düzeni görülmektedir. a) İzole organ banyosu içinde kasın durumu, b) Hava üfleme borusu, c) Besleyici sıvı boşaltma tertibatı, d) Yazdırıcı levye (2'den alınmıştır).

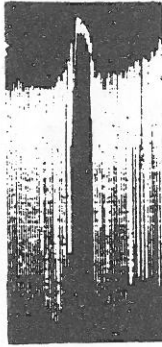
İzole Memeli Bağırsak Preparatları

Bu preparatlar adrenerjik reseptörler (alfa-2 ve beta-2 tipleri, kolinerjik reseptörler (müskaridik ve nikotidik tipler), nonkolinerjik-nonadrenerjik otonomik reseptörler, histamin H-1 reseptörler, opyoid reseptörler (mü-2 tipi) gibi çok çeşitli reseptörler ihtiva ederler. Bu reseptörleri uyaran ve bloke eden maddelerin araştırılmasında çok kullanıldığı gibi iyon kanalları ile ilgili çalışmalarda da kullanılabilir.

yardımıyla uyarılmayacaksa mazenter disseke edilip atılır. Bağırsak parçası, iki ucuna geçirilen ipliklerle izole organ banyosundaki sabit noktaya ve yazdırıcıya bağlanır. Ancak ipliklerin geçirilmesi sırasında bağırsak lümenin açık kalmasına dikkat etmek gerekir.

Farmakoloji pratik çalışmalarında en çok kullanılan izole bağırsak preparatları tavşan jejunumu, kobay ileumu ve sıçan duodenumudur.

İzole tavşan jejunumu düzgün spontan aktiviteye sahip olduğu için özellikle prestaltizm ile ilgili araştırmalarda tercih edilir. Spontan hareketler esnasında preparat kendi kendini temizleyeceği için ayrıca temizlenmesi gerekmez. İzole kobay ileumu, belirgin spontan aktivitesi olmaması dolayısıyla düzgün bir "base line" verir. Asetilkolin ve histamine duyarlılığı fazladır. Bu maddelerin miktar tayininde kullanıldığı gibi müskarin reseptörlerini ve histamin H-1 reseptörlerini etkileyen maddelerle ilgili çalışmalarda da çok kullanılır. İzole sıçan duodenumu spontan aktiviteye sahip olmakla beraber pendüler hareketleri tavşan jejunumunki gibi düzgün değildir. Asetilkoline kasılma ile cevap verir. Ancak sıçandan hazırlanan diğer preparatlarda olduğu gibi histamine karşı duyarlılığı azdır. İzole bağırsak preparatlarının genel düzeni ve tavşan jejunumu ile yapılan bir kayıt örneği Şekil 2'de görülmektedir.



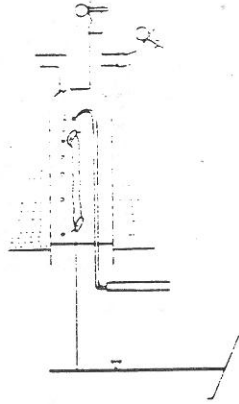
Şekil 2. İzole memeli bağırsak preparatı. Solda izole organ banyosu içindeki durumu, sağda izole tavşan jejunumunun adrenaline cevabı görülmektedir (1'den alınmıştır).

İzole Kalp Preparatları

Bu preparatlarda müskarinik reseptörler, beta-1 reseptörler, histamin reseptörleri (H-1 ve H-2 tipleri) gibi reseptörler bulunur. İzole

kalp preparatlarında daha ziyade kalbin kasılma gücünü ve frekansını etkileyen droglarla araştırmalar yapılır. Bu preparatlardan en çok kullanılanlar izole kurbağa kalbi, izole memeli kalbi ve izole kobay artriyumu preparatlarıdır. Bu preparatlarda spontan aktivite vardır. Aşağıda bunlardan ilk ikisinin hazırlanışı ve kullanımı ile ilgili bilgiler verilmiştir.

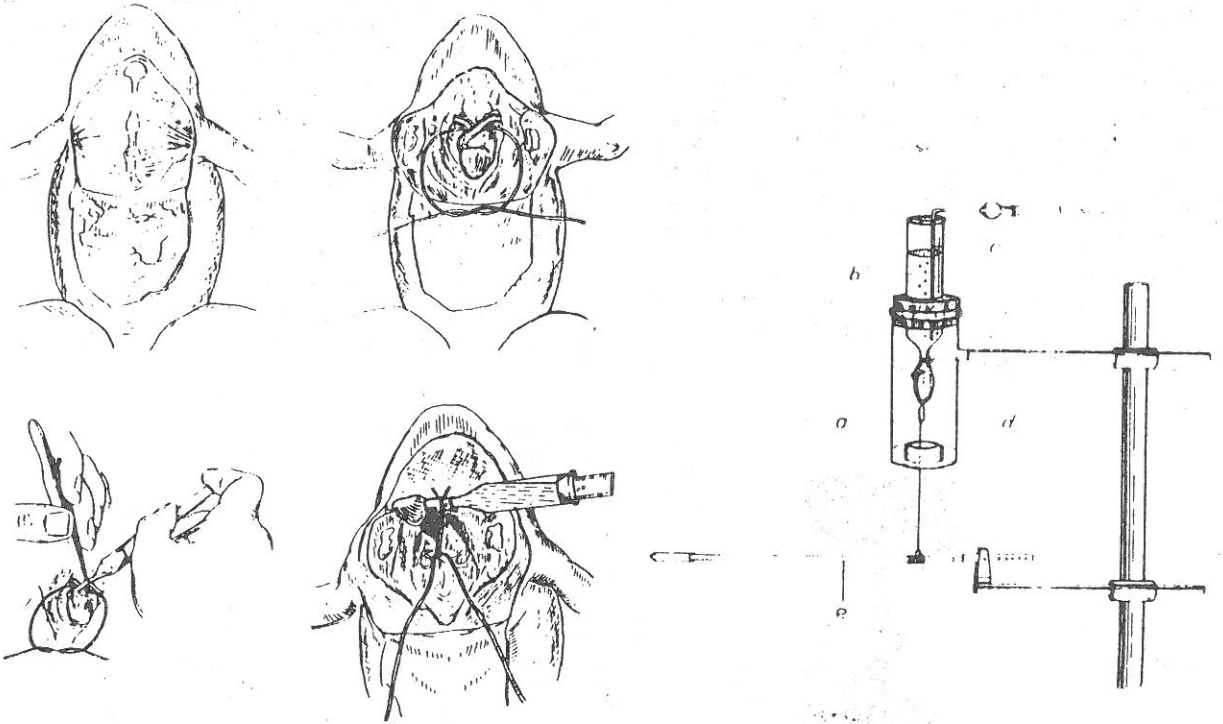
İzole kurbağa kalbi (Straub preparatı) hazırlanırken mümkün olduğu kadar iri (50 g veya daha büyük) kurbağaların kullanılması preparatın hazırlanmasında kolaylık sağlar. Kurbağanın hazırlanması için izole rectus abdominis preparatındaki işlemler karın derisinin disseke edilmesi dahil olmak üzere aynen yapılır. Daha sonra göğüs kafesi ön yüzden açılır, perikard ayrılır. Kurbağa Ringer çözeltisi ile doldurulmuş özel bir kanül (Straub kanülü) sol aorta yapılan kesiden girilerek ventriküle kadar sokulur. Kalp



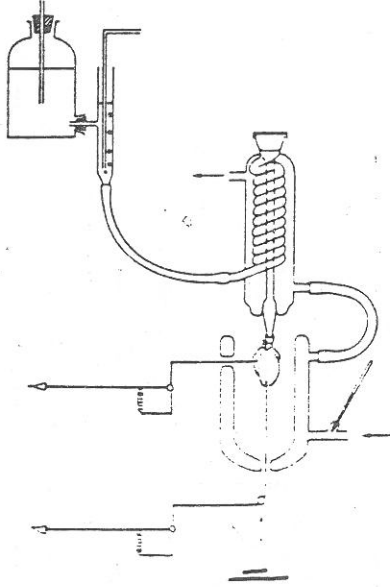
çevresine konan ilimikle truncus arteriosus hizasından kanüle bağlanır, kalp göğüs içindeki irtibatlarından kesilerek ayrılır. Kanül içindeki sıvı bir Pastör pipeti yardımıyla sık sık değiştirilir. Bu şekilde kanülün pıhtı ile

tıkanmasının önüne geçilir. Uygun şekilde hazırlanmış preparatta kanül içindeki sıvı sistol sırasında yükselir, diyastol sırasında alçalır. Besleyici sıvı oksijenle gazlandırılır.

Kalbin apeksine tutturulan bir serfin ile kalbin kasılmaları bir iplik yardımıyla yazdırıcı sisteme irtibatlandırılır (Şekil 3).



Şekil 3. İzole kurbağa kalbi (Straub preparatı). Solda preparatın hazırlanışındaki çeşitli aşamalar, sağda kalbin kayıt tertibatına bağlanmış durumu görülmektedir. a) Kalbin kurumasını önleyen kamara, b) Straub kanülü, c) Oksijen üfleme borusu, d) Serfin (2'den alınmıştır).



Şekil 4. İzole memeli kalbi (Langendorff preparatı). Kalpten damlayan sıvı koroner kamını temsil etmektedir (1'den alınmıştır).

İzole memeli kalbi (Langendorff preparatı) daha ziyade kobay, tavşan ve kediden alınan kalple yapılır. Sıçan kalbi de kullanılabilir. Hazırlanışında hayvan uygun bir şekilde öldürüldükten sonra hemen göğüs kafesi açılır; kalp, çevresindeki dokulardan serbestleştirilir; aort, arcus aortae'nin hemen altından kesilir. Kalp ya önceden 37°C'ye ısıtılmış besleyici çözelti içinde bir kaç saniye süre ile elle hafifçe sıkılıp gevşeterek kanından arındırılır ya da kısmen dondurulmuş besleyici çözeltiye alınarak soğutulur. Besleyici çözelti olarak Locke çözeltisi kullanılabilir. Daha sonra izole memeli kalbi perfüzyon cihazının (Langendorff cihazı) kanülü aort içine geçirilir. Bu esnada kanülün aort kapakçıklarını tahrip etmemesine dikkat etmek gerekir. Aort çevresinden geçirilen bir iplikle kalp, kanüle bağlanır. Perfüzyon cihazının rezervuarı ile kalp arasında 80 cm'lik yükseklik farkı bulunmalıdır. Besleyici çözelti sürekli olarak oksijenle gazlandırılır. Kalbin apeksine tutturulan bir serfinin kayıt sistemine birleştirilmesi ile kalp kontraksiyonlarının kaydı mümkün olur. Langendorff cihazı esas itibariyle aorta

girecek bir kanül, besleyici çözeltiyi ısıtmak için termostatlı bir tertibat ile besleyici çözelti rezervuarından ibarettir. Kalp bu cihaza bağlanıp sıcak (37-32°C) besleyici çözelti ile temasa gelince kendiliğinden çalışmaya başlar. Besleyici çözeltinin basıncı ile aort kapakçıkları kapanır, çözelti koroner damarlara oradan da sağ atriyuma geçer, sağ atriyumdan da dışarı damlar. Şekil 4'de izole memeli kalbi preparatı şematik olarak gösterilmiştir.

Tablo I. İzole organlarda sıklıkla kullanılan çözeltiler (1'den alınmıştır.)

Besleyici Çözelti	NaCl	KCl % 10	MgSO ₄ 7H ₂ O % 10	NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O % 10	KH ₂ PO ₄	Glukoz	NaHCO ₃	CaCl ₂ molar	Oksijenleme	Kullandığı Preparat
Kurbağa Ringer	6.5 g	1.4 m1	-	0.13 m1	-	2 g	0.4 g	1.08 m1	Hava	Kurbağa ve sülük
Krebs4	6.9 g	3.5 m1	2.9 m1	-	1.6 m1	2 g	2.1 g	2.52 m1	Karbojen	Sıcak kanlı çizgili kas
Tyrode	8 g	2 m1	2.6 m1	1.3 m1	-	1 g	1 g	1.08 m1	Oksijen veya Hava	Memeli bağırsak
Ringer Locke	9 g	4.2 m1	-	-	-	1 g	0.5 g	1.08 m1	Oksijen	Memeli Kalp
De Jalon	9 g	4.2 m1	-	-	-	0.5 g	0.5 g	0.27 m1	Karbojen	Uterus

Kaynaklar

1. Anonim: **Pharmacological Experiments on Isolated Preparations**, Churchill Livingstone, Edinburgh 1970.
2. Grisk A: **Praktikum der Pharmacologie und Toxikologie für Mediziner und Pharmazeuten**, Veb Gustav Fischer, Jena 1969.
3. Lembeck F, Winne D: **Pharmacologisches Praktikum**, Georg Thieme, Stuttgart 1965.
4. Kaymakçalan Ş, Türker K: **Deneysel Farmakoloji**, A.Ü.Tıp Fak. Yayını No:142, Ankara 1964.