



The relaxant responses induced by ethanol in the smooth muscle: role of extracellular and intracellular Ca^{2+}

Düz kasta etanol ile indüklenen gevşeme cevapları: ekstraselüler ve intraselüler Ca^{2+} 'un rolü

Derya Kaya, Naciye Yaktubay Dondas

University of Çukurova, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Adana, Turkey

Received 02 May 2016; Accepted 27 May 2016

Available online 31 May 2016 with doi: 10.5455/medscience.2016.05.8487

Abstract

Since worldwide alcohol consumption, the understanding the mechanism of action of ethanol is important in the gastrointestinal tract. In this study we aimed to clarify the role of extracellular and intracellular calcium (Ca^{2+}) on relaxations induced by ethanol in isolated mouse gastric fundus. Mice (Swiss *albino*) of either sex were used in this study. After killing the mice by cervical dislocation the gastric fundal strips were prepared by longitudinal incision and mounted under 0.5 g tension in an organ bath filled with Tyrode's solution. The bath medium was maintained at 37 °C and gassed with %95 O_2 and 5% CO_2 . Experimental data were recorded by an isometric transducer. Ethanol (164 mM) caused reproducible relaxations in isolated mouse gastric fundal strips. These relaxations were significantly inhibited by verapamil (10^{-5} - 5×10^{-4} M), a blocker of L-type Ca^{2+} channels, and ruthenium red (10^{-5} - 10^{-4} M), a blocker of ryanodine receptors (intracellular Ca^{2+} channels) in a concentration dependent manner. On the other hand cyclopiazonic acid (CPA; 10^{-6} - 10^{-5} M), a blocker of Ca^{2+} -ATPase, failed to affect the relaxations induced by ethanol. The results of experimental data suggest that extracellular Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release may play a role on relaxations induced by ethanol in the isolated mouse gastric fundal smooth muscle.

Keywords: Ethanol, relaxation, Ca^{2+} , gastric fundus

Öz

Alkol dünyada yaygın olarak tüketildiğinden, etanolün gastrointestinal sistem üzerindeki etkisinin mekanizmasının anlaşılması önemlidir. Bu çalışmada, izole fare mide fundusunda etanol ile indüklenen gevşemeler üzerinde ekstraselüler ve intraselüler kalsiyum (Ca^{2+})'un rolünü araştırmayı amaçladık. Bu çalışmada her iki cinsten (Swiss *albino*) fare kullanıldı. Fareler servikal dislokasyon ile öldürüldükten sonra longitudinal insizyon suretiyle gastrik fundal stripler hazırlandı ve içinde Tyrode solusyonu olan organ banyosuna 0.5 g tansiyon altında asıldı. Banyo ortamı 37 °C'de sabit tutuldu ve %95 O_2 ve %5 CO_2 ile gazlandırıldı. Deneyel veriler izometrik transdüsör ile kaydedildi. Etanol(164 mM) izole fare mide fundus şeritlerinde tekrarlanabilir gevşemelere neden oldu. Bu gevşemeler L-tipi Ca^{2+} kanal blokörü verapamil (10^{-5} - 5×10^{-4} M) ve ryanodin reseptör (intraselüler kalsiyum kanal)'lerinin spesifik blokörü rutenyum red (10^{-5} - 10^{-4} M) ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldı. Buna karşılık Ca^{2+} -ATPaz'ın spesifik inhibitörü siklopiazonik asit (CPA; 10^{-6} - 10^{-5} M) bu gevşemeleri etkilemedi. Deneyel bulgular, izole fare mide fundus şeritlerinde etanol (164 mM) ile oluşturulan gevşemelerde hem ekstraselüler hem de intraselüler Ca^{2+} 'un rolü olabileceğini telkin etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Etanol, gevşeme, Ca^{2+} , mide fundusu

Giriş

Etanol iki karbonlu, alifatik yapıda bir alkoldür (CH_3-CH_2-OH). Günümüzde etanolün cilt antiseptiği olarak kullanımı dışında ilaç olarak fazla bir önemi yoktur [1]. Ancak alkolü içkiler şeklinde tüm dünyada sık kullanılan bir içecek olması ve kullanımına bağlı vücuttaki zararlı etkileri nedeniyle etanolün farmakolojik etkilerine yönelik yapılan bilimsel çalışmalar önem arz etmektedir [2-3]. Alkolün gastrointestinal sistemde nekroz oluşturabildiği ve gastrik

mukozaya zarar verdiği bilinmektedir [4]. Etanol, midede gastrin ve hidroklorik asit salgısını artırmaktadır [1]. Etanolün proinflamatuvar etkiye sahip olduğu ve bu etkinin alkole bağlı gastrik hasarda rol oynadığı bildirilmiştir [5]. Sıçan astrositlerinde yapılan bir çalışmada, etanolün apoptotik etkisinin olduğu ve bu etkinin kafein ile indüklenen kalsiyum salıverilmesi ile potansiyalize edilebileceği ileri sürülmüştür [6].

Etanol ile ilgili yapılan bu çalışmalara karşılık etanolün farmakolojik anlamda kas fonksiyonlarına olan etkileri de araştırılmış, ancak buna yönelik moleküler düzeydeki çalışmalar yetersiz kalmıştır [7-9]. Belia ve arkadaşları tarafından yapılmış olan bir çalışmada etanolün intraselüler Ca^{2+} seviyesi üzerinde, kullanılan konsantrasyona bağlı olarak, hem artırıcı hem de azaltıcı etkisinin olduğu rapor edilmiştir [10]. Sıçan aortik düz kasında yapılan bir

*Corresponding Author: Naciye Yaktubay Dondas,
University of Çukurova, Faculty of Medicine, Department
of Pharmacology, 01330 Adana, Turkey
E-mail: yakdas25@cu.edu.tr
GSM: +90 542 266 19 60
Fax: +90 322 338 65 72
Tel: +90 322 338 60 56

çalışmada ise diğer bir alkol tipi olan metanolün, kullanılan kontraktıl ajana bağlı olarak, kasılma ve gevşeme cevabı şeklinde birbirine zıt olan farmakolojik cevaplara neden olduğu ileri sürülmüş ve gevşeme cevaplarının Ca^{2+} 'a bağımlı olabileceği rapor edilmiştir [11]. Kedi gastrik düz kaslarında yapılan diğer bir çalışmada, etanolün ilgili dokudaki spontan fazik kontraksiyonları inhibe ettiği rapor edilmiştir [12].

Alkolün dünyada yaygın olarak kullanılması ve mide üzerinde direkt olumsuz etkiler oluşturmaması nedeniyle, etanolün midedeki etkilerini moleküler düzeyde aydınlatmak alkole bağlı gastrik hastalıkların tedavi yaklaşımlarına katkı sağlayabilir. Etanolün mide dokusunda oluşturduğu gevşeme cevapları ilgi çekicidir ve etanolün bu etkisi yeterince aydınlatılmamıştır. Bu nedenle şimdiki çalışmada, izole fare mide fundusunda etanole bağlı gevşeme cevaplarında intraselüler ve ekstraselüler Ca^{2+} 'un rolünü araştırmayı amaçladık. Bu amaçla, ilgili dokuda etanol ile indüklenen gevşeme yanıtları üzerinde voltaja duyarlı L-tipi kalsiyum kanal blokörü olan verapamil [13], ryanodin reseptörleri (intraselüler kalsiyum kanalları)'nın spesifik blokörü olan rutenyum red [14] ve sarko/endoplazmik retikulum Ca^{2+} (SERCA) pompa (Ca^{2+} -ATPaz)'sının spesifik inhibitörü olan siklopiazonik asit (CPA) [15]'in etkileri araştırıldı.

Gereç Ve Yöntem

Etik kurul onayı

Şimdiki çalışma, Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı ve 'Guide for the Care and Use of the Laboratory Animals prensipleri (<http://www.nap.edu/catalog/5140.html>)' doğrultusunda hayvan hakları korunarak yapıldı.

Hayvanlar ve deneysel dizayn

Deneylerde Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi (ÇÜTF-DETAUM)'dan temin edilen 30-35 g ağırlığında Swiss *albino* türü erkek ve dişi fareler kullanıldı. Bütün hayvanlar standart laboratuvar koşullarına (12 saat aydınlık/12 saat karanlık) tabi tutuldu. Her deneysel grupta yaklaşık eşit sayıda erkek ve dişi fare kullanıldı.

Doku hazırlanması

24 saat aç bırakılan farelerin sadece su içmelerine izin verildi. Fareler servikal dislokasyon ile öldürüldükten sonra mide hızlı bir şekilde izole edildi ve içerisinde Tyrode solüsyonu (mM: NaCl 136.92, KCl 2.69, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.87, NaH_2PO_4 0.36, $NaHCO_3$ 1.2 ve Glukoz 5.5) bulunan bir petri kutusuna alındı. Gastrik fundus kısmı ayrılarak küçük kurvatür boyunca kesildi. Her bir fundus dokusu eni yaklaşık 0.3 cm ve boyu 1.2 cm olacak şekilde longitudinal şerit şeklinde hazırlandı. Şeritler Tyrode solüsyonu ihtiva eden 10 ml'lik cam organ banyosu içerisine 0.5 g tonus altında asıldı. Banyo ortamı %95 O_2 ve %5 CO_2 ile sürekli olarak gazlandırıldı. Ortam sıcaklığı 37 °C'de sabit tutuldu. Dokuların dengelenmesi

için 1 saat inkübe edildi ve 15 dk'lık aralarla dokular taze Tyrode solüsyonu ile yıkandı. Cevaplar izometrik transdüsör (Harvard ve May FDT O.5 MP35) ile kaydedildi.

Deneysel protokol

Kontrol deneyleri

1 saatlik inkübasyon (dengeleşme) periyodundan sonra izole fare fundus dokusunun bazal tonusu 5 dakika (dk) boyunca poligraf veya bilgisayara kaydedildi. Daha sonra 10 ml'lik banyo ortamına mikropipet yardımıyla 100 µl etanol (% 98'lik) uygulandı. 10 ml'lik banyodaki etanolün nihai konsantrasyonu 164 mM idi. Etanole bağlı gevşeme cevabı 10 dk boyunca kaydedildi. 10 dk.'nın sonunda doku taze (yeni hazırlanmış) Tyrode solüsyonu ile yıkandı ve 40 dk. dinlenmeye (inkübasyona) bırakıldı. 40 dk.'lık inkübasyon periyodundan sonra dokunun bazal tonüsü 5 dk boyunca kaydedildi ve daha sonra banyo ortamına etanol uygulaması yapılarak gevşeme cevabı 10 dk. süre boyunca kaydedildi. Böylece 164 mM etanole bağlı 2 adet gevşeme cevabı oluşturulmuş oldu.

Çalışma grubu deneyleri

Bu deney gruplarında, preparatlar 1 saatlik inkübasyondan sonra dokunun bazal tonusu 5 dk boyunca kaydedildi ve daha sonra etanol (164 mM) uygulanarak 10 dk boyunca gevşeme cevabı kaydedildi. Bu süre sonunda preparatlar taze Tyrode solüsyonu ile yıkanarak banyo ortamına voltaja bağlı L-tipi kalsiyum kanal blokörü verapamil (10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} M), ryanodin reseptörlerinin spesifik blokörü olan rutenyum red (10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} M) veya Ca^{2+} -ATPaz blokörü siklopiazonik asit (10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} M) uygulandı. İlgili kimyasal ajan varlığında 40 dk'lık bir ara inkübasyondan sonra deney birinci uygulamada olduğu gibi tekrarlanarak kaydedildi. Her kimyasal ajanın her konsantrasyonu için ayrı deney grupları oluşturuldu.

Kullanılan ilaçlar ve solüsyonların hazırlanması

Deneylerde kullanılan kimyasal ajanların tümü SIGMA firmasından temin edildi. Deneylerde kullanılan etanol, verapamil hidroklorid ve rutenyum red distile suda çözünerek hazırlandı. Siklopiazonik asit ise DMSO (dimetilsülfoksit)'da çözüldü (Kullanılan DMSO konsantrasyonu 1:20000 dilüsyonda idi).

Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistiksel analiz

Her bir etanol gevşeme cevabı mm olarak ölçüldü. İkinci gevşeme cevabının birinci gevşeme cevabına oranlanması suretiyle % gevşeme değeri saptandı. Bütün % gevşeme değerleri tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA; posthoc:Bonferoni) ile değerlendirildi. 0.05'den küçük P değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Bütün veriler, ortalama ± Standart Hata olarak ifade edildi.

Bulgular

İzole fare mide fundus şeritlerinin 164 mM etanol'e verdiği cevap bütün preparatlar için yalnızca gevşeme cevabı

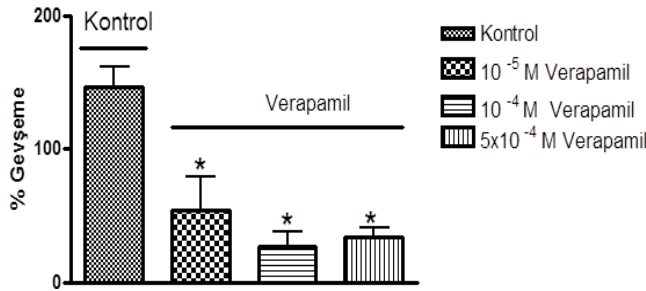
şeklinde değildi. Bazı preparatlar, 164 mM etanol'e önce kasılma daha sonra gevşeme şeklinde bir cevap oluştururken bazı preparatlar ise önce gevşeme daha sonra kasılma şeklinde bir cevap verdi. Bu çalışmanın amacı, izole fare mide fundus şeritlerinde etanol (164 mM)'e bağlı gevşeme cevaplarının mekanizmasını araştırmak olduğundan çalışmadaki bazı preparatların etanol (164 mM)'e verdiği bu bifazik cevaplardan sadece gevşeme cevabı değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu

Etanol (164 mM), izole fare mide fundus şeritlerinde tekrarlanabilir gevşeme cevapları oluşturdu. Birinci gevşeme cevabından sonra kontrol grubundaki dokular sadece Tyrode solüsyonu ile yıkandı. Etanolden uzaklaştırılan dokuya ikinci etanol uygulaması ile ikinci gevşeme cevabı elde edildi (Kontrol grubunun ortalama yüzde gevşeme cevabı: 146,75±15.75 (n=12)).

Etanol ile oluşturulan gevşeme cevapları üzerinde verapamil'in etkisi

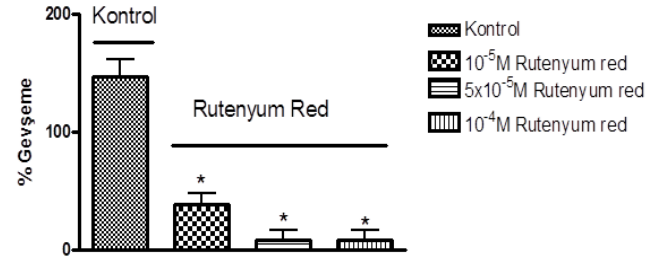
İzole fare mide fundusuna L- tipi Ca^{2+} kanal blokörü verapamil (10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} M) uygulanan deneylerde % gevşeme değerleri sırası ile: 54.41±27.14, 26.5±12.63 ve 34.36±9.16 idi. (Kontrol grubunun % gevşeme değeri: 146,75±15.75'tir n=12). İzole fare mide fundus şeritlerinde etanol (164 mM) ile oluşturulan gevşemeleri verapamil kullanılan tüm konsantrasyonlarında (10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} M) inhibe etti. Bu inhibisyon kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı idi (Şekil 1, $P < 0.05$, 10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} M için n=5).



Şekil 1. İzole fare mide fundus şeritlerinde etanol (164 mM)'e bağlı gevşeme cevapları üzerinde verapamil (10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} M)'in etkisi. (10^{-5} ve 10^{-4} M verapamil için n=5, 5×10^{-4} M verapamil için n=8) İstatistiksel analiz: One-way analysis of variance (one-way ANOVA); post hoc: Bonferroni. *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir ($P < 0.05$).

Etanol ile oluşturulan gevşeme cevapları üzerinde rutenyum red'in etkisi

Ryanodin reseptör (intraselüler kalsiyum kanal) blokörü olan rutenyum red (10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} M) izole fare mide fundus şeritlerinde etanol (164 mM)'e bağlı gevşemeleri konsantrasyona bağımlı bir şekilde ve anlamlı olarak inhibe etti (Şekil 2). Rutenyum red varlığındaki ortalama % gevşeme değerleri sırası ile 38.47±11.92, 8.33±11.11 ve 8.57±10.49 idi (Kontrol grubunun % gevşeme değeri: 146,75±15.75'tir. n=12).



Şekil 2. İzole fare mide fundusunda etanol (164 mM) ile oluşturulan gevşeme cevapları üzerinde rutenyum red (10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} M)'in etkisi. Veriler ortalama ± Standart Hata olarak ifade edildi (10^{-5} ve 5×10^{-5} M için n=4, 10^{-4} M için n=3). İstatistiksel analiz: One-way analysis of variance (One-way ANOVA); post hoc: Bonferroni. *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir ($P < 0.05$).

Etanol ile oluşturulan gevşeme cevapları üzerinde siklopiazonik asit'in etkisi

Siklopiazonik asit (10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} M) izole fare mide fundus şeritlerinde etanol (164 mM)'e bağlı gevşeme cevaplarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde etkilemedi. Siklopiazonik asidin düşük konsantrasyonları (10^{-6} ve 5×10^{-6} M), etanole bağlı gevşemeleri kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı olmayan bir şekilde artırırken (Tablo 1), daha yüksek olan konsantrasyon (10^{-5} M)'da bu gevşemeleri istatistiksel bakımdan anlamlı olmayan bir şekilde azalttı (Tablo 1).

Tablo 1. İzole fare mide fundusunda etanol(164 mM)'e bağlı gevşeme cevapları üzerinde siklopiazonik asit (CPA; 10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} M)'in etkisi. Veriler ortalama ± Standart Hata şeklinde ifade edildi (10^{-6} M için n= 4, 5×10^{-6} için n=6, 10^{-5} için n=3). İstatistiksel analiz: One-way analysis of variance (One-way ANOVA; post hoc: Bonferroni, $P > 0.05$).

İlaç konsantrasyonları	n	Ortalama ± Standart Hata
Kontrol	4	114.89±35.98
10^{-6} M CPA	4	162.97±41.19
5×10^{-6} M CPA	6	181.31±36.49
10^{-5} M CPA	3	107.63±37.99

Tartışma

Çalışmamızda, bazı izole fare mide fundus dokuları etanole sadece gevşeme cevabı değil aynı zamanda hem kasılma hem de gevşeme cevabı şeklinde bifazik cevaplar vermiştir. Alkole bağlı kasılma cevabının mekanizması önceki çalışmamızda araştırıldı [16]. Şimdiki çalışmamızda, etanole bağlı gevşeme yanıtlarında intraselüler ve ekstraselüler Ca^{2+} 'un rolünü araştırmayı amaçladık. Bu amaçla, ilgili dokuda etanol ile indüklenen gevşeme cevapları üzerinde voltaja duyarlı L-tipi kalsiyum kanal blokörü olan verapamil [13], ryanodin reseptörleri (intraselüler kalsiyum kanalları)'nin selektif blokörü olan rutenyum red [14] ve Sarko/endoplazmik retikulum Ca^{2+} (SERCA) pompa (Ca^{2+} -ATPaz)'sının selektif inhibitörü olan siklopiazonik asit (CPA) [15]'in etkileri araştırıldı.

Verapamilin izole fare mide fundus şeritlerinde etanole bağlı gevşeme cevaplarını konsantrasyona bağımlı ve istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe etmesi, bu

gevşeme yanıtlarında ekstraselüler Ca^{2+} 'un rolünü telkin etmektedir. Etanol ile yapılan bazı araştırma sonuçları bulgularımızı destekler niteliktedir. Örneğin, superior servikal gangliyon nöronlarında yapılan bir çalışmada etanolün bazal Ca^{2+} 'u artırdığı ve bu artıştan ekstraselüler Ca^{2+} 'un sorumlu olduğu ileri sürülmüştür [17]. Sıçan fetal hipotalamik hücre kültüründe etanolün etkisini araştıran diğer bir çalışmada, etanolün sitoplazmik Ca^{2+} seviyelerini modüle ettiği ve bu modülasyonda ekstraselüler kalsiyum kanallarının rol oynadığı rapor edilmiştir [18].

Rutenyum red'in etanol ile indüklenen gevşemeleri konsantrasyona bağımlı ve istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe etmesi etanole bağlı bu gevşemelerde intraselüler Ca^{2+} 'un rolünü telkin etmektedir. Yang ve arkadaşları (2001)'nin serebral arteriyel düz kasında yapmış oldukları çalışmanın sonuçları bulgularımızı destekler niteliktedir. İlgili çalışmada, etanolün serebral arteriyel düz kaslarında kasılma cevaplarına neden olduğu ve bu cevaplarda hem ekstraselüler hem de intraselüler Ca^{2+} 'un rol oynadığı rapor edilmiştir [19]. Ayrıca, sıçan ventrikül miyositlerinde yapılan bir çalışmada, etanol ile indüklenen ve myokardiyal depresyona neden olan mekanizmadan sarkolemmal kalsiyum kanallarının sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür [20].

Siklopiazonik asit, beklentinin aksine, izole fare mide fundusunda etanol ile indüklenen gevşemeleri etkilemedi. CPA, Ca^{2+} -ATPaz pompasını bloke etmek suretiyle intraselüler Ca^{2+} deposunu deplete ettiğinden, CPA'nın bu gevşemeler üzerinde anlamlı bir etki oluşturması beklenmekte idi. CPA'nın etanol gevşemelerinde etkisiz olmasının nedenini aydınlatmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Ancak bu durum, deneylerde kullanılan CPA konsantrasyonlarının ve/veya dokuların CPA ile inkübasyon sürelerinin yetersiz olmasından kaynaklanmış olabilir. Nitekim Xiao ve arkadaşlarının superior servikal gangliyon hücre kültüründe yaptıkları çalışma bu konudaki düşüncemizi destekler niteliktedir [17]. İlgili çalışmada, etanolün intraselüler kalsiyum depolarından Ca^{2+} salınımını sağlayarak bazal kalsiyum artışına neden olduğu rapor edilmiştir [17].

Verapamil ve rutenyum red ile elde edilen deneysel sonuçlar etanolün izole fare mide fundus şeritlerinde oluşturduğu gevşeme cevaplarında ekstraselüler ve intraselüler Ca^{2+} 'un rolünü ve selüler düzeydeki Ca^{2+} artışının önemini vurgulamaktadır. Çalışmamızda, etanole bağlı fare gastrik düz kas gevşemelerinde, selüler düzeydeki Ca^{2+} artışı gevşemede rol oynayan bazı mekanizmaları aktive edebilir. Bu mekanizmaların aydınlatılması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Li ve arkadaşları tarafından sıçan aortik düz kaslarında yapılan çalışmanın sonuçları bu hipotezimizi destekler niteliktedir [11]. İlgili çalışmada, metanolün hem kasılma hem de gevşemeye neden olduğu ve gevşeme cevaplarının Ca^{2+} 'a bağımlı olabileceği rapor edilmiştir¹¹.

Şimdiki çalışmanın sonuçları, izole fare mide fundus şeritlerinde etanol ile indüklenen gevşemelerde selüler Ca^{2+} artışının rol oynadığını ve bu artışa hem ekstraselüler hem de intraselüler Ca^{2+} 'un katkı sağladığını telkin etmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TF2006YL7 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 9. Baskı 2. Cilt Ankara: Feryal Basımevi, 2005.
2. Altura BM, Altura BT. Role of magnesium and calcium in alcohol-induced hypertension and strokes as probed by in-vivo television microscopy, digital image microscopy, optical spectroscopy, ³¹P-NMR spectroscopy and a unique magnesium ion-selective electrode. *Alcohol Clin Exp Res.* 1994;18(5):1057-68.
3. Altura BM, Gebrewold A. Alpha-tocopherol attenuates alcohol-induced cerebral vascular damage in rats: possible role of oxidants in alcohol brain pathology and stroke. *Neurosci Lett.* 1996;220(3):207-10.
4. Hummadi YMA-M, Najim RA, Farjou IB. A new in vitro model for ethanol-induced gastric mucosal damage, *J Pharmacol Toxicol.* 1999;41(4):167-72.
5. Siegmund S, Haas S, Schneider A, Singer MF. Animal models in gastrointestinal alcohol research-a short appraisal of the different models and their results. *Best Pract & Res Clin Gastroent.* 2003;17(4):519-42.
6. Hirata H, Machado LS, Okuna CS, Brasolin A, Lopes GS, Smaili SS. Apoptotic effects of ethanol is potentiated by caffeine-induced calcium release in rat astrocytes. *Neurosci Lett.* 2006;393(2-3):136-40.
7. Kokoska ER, Smith GS, Deshpande Y, Wolff AB, Rieckenberg C, Miller TA. Calcium accentuates injury induced by ethanol in human gastric cells. *J Gastrointest Surg.* 1999;3(3):308-18.
8. Li W, Zheng T, Altura BT, Altura BM. Antioxidants prevent ethanol-induced contraction of canine cerebral vascular smooth muscle: relation to alcohol-induced brain injury. *Neurosci Lett.* 2001;301(2):91-4.
9. Altura BM, Edgarian H, Altura BT. Differential effects of ethanol and mannitol on contraction of arterial smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1976;197(2):352-61.
10. Belia S, Mannuci R, Lisciarelli M, Cacchio M, Fano G. Double effect of ethanol on intracellular Ca^{2+} levels in undifferentiated PC12 cells. *Cell Signal.* 1995;7(4):389-95.
11. Li W, Altura BT, Altura BM. Differential effects of methanol on rat aortic smooth muscle. *Alcohol.* 1998;16(3):221-9.
12. Sim SS, Choi JC, Min DS, Rhie DJ, Yoon SH, Hahn SJ et al. Effect of ethanol on spontaneous phasic contraction of cat gastric smooth muscle. *Scand J Gastroenterol.* 2002;37(1):23-7.
13. Kania BF, Dębski B, Wronska D, Zawadzka E. Verapamil-L type voltage gated calcium channel inhibitor diminishes aggressive behavior in male Siamese fighting fish. *Pol J Vet Sci.* 2015;18(2):401-6.

14. Prete DD, Checler F, Chami M. Ryanodine receptors: physiological function and deregulation in Alzheimer disease. *Molecular Neurodegeneration*. 2014;9:1-21.
15. PetkovGV, Boev KK. The role of sarcoplasmic reticulum and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in the smooth muscle tone of the cat gastric fundus. *Pflügers Arch-Eur J Physiol*. 1996;431(6):928-35.
16. Döndaş NY, Kaplan M, Kaya D, Şingirik E. The impact of extracellular and intracellular Ca^{2+} on ethanol-induced smooth muscle contraction. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2009;30(10):1421–7.
17. Xiao Z, Li L, Yu S, Lu Z, Li C, Zheng J. Effects of extracellular Ca^{2+} influx and release on ethanol-induced cytoplasmic Ca^{2+} overload in cultured superior cervical ganglion neurons. *Neurosci Lett*. 2005;390(2):98-103.
18. Simasko SM, Boyadjieva N, De A, Sarkar DK. Effect of ethanol on calcium regulation in rat fetal hypothalamic cells in culture. *Brain Res*. 1999;824(1):89-96.
19. Yang ZW, Weng J, Zheng T, Altura BT, Altura BM. Importance of extracellular Ca^{2+} and intracellular Ca^{2+} release in ethanol induced contraction of cerebral arterial smooth muscle. *Alcohol*. 2001;24(3):145-53.
20. Ren J, Brown RA. Hypertension augments ethanol-induced depression of cell shortening and intracellular Ca^{2+} transients in adult rat ventricular myocytes. *Biochem & Biophys Res Com*. 1999;261(1):202-8.