



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

KAN BASINCININ REGÜLASYONUNDA ROLÜ OLAN
MUSKARİNİK RESEPTÖRLER

1997-860

PROJE NO: TAG-0771

TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ

Tıp Araştırma Grubu

Medical Sciences Research Grant Committee

616.12-008.331.1:615.217.32

K16 b

KAN BASINCININ REGÜLASYONUNDA ROLÜ OLAN
MUSKARİNİK RESEPTÖRLER

1997-860

PROJE NO: TAG-0771

PROF.DR.ŞULE OKTAY
DOÇ.DR.İMER OKAR
YRD.DOÇ.DR.FİLİZ ONAT
DR.UĞUR ÖZKUTLU

TÜRKİYE BİLİMSEL ve
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ

40-sy-

Ref-52

EYLÜL 1993
İSTANBUL

Barış, Şubat 1994

18600

KAN BASINCININ REGÜLASYONUNDA ROLÜ OLAN
MUSKARİNİK RESEPTÖRLER

I

PROJE NO: TAG-0771

PROF.DR.ŞULE OKTAY

DOÇ.DR.İMER OKAR

YRD.DOÇ.DR.FİLİZ ONAT

DR.UĞUR ÖZKUTLU

EYLÜL 1993

İSTANBUL

ÖNSÖZ

Bu proje 1.9.1991 tarihinden başlamak üzere 2 yıl süreyle TÜBİTAK Tıp Araştırma Grubu tarafından desteklenmiştir. Elde edilen sonuçların bir bölümü XI. Türk Farmakoloji Kongresi'nde (4-8 Kasım 1992, Nevşehir) sunulmuş ve "Central M₂-cholinoceptors involved in cholinergic hypertension" başlığıyla European Journal of Pharmacology adlı uluslararası tıp mecmuasında yayına kabul edilmiştir. Sonuçların ikinci bölümü ise Türk Farmakoloji Derneği tarafından düzenlenen Prof.Dr.Alaaddin Akçasu toplantısında (22-24 Şubat 1993, Kayseri) sunulmuş olup, ayrıca yayına hazırlanmaktadır.

İÇİNDEKİLER:

ÖZ.....	1
ABSTRACT.....	2
GİRİŞ	
1) Kolinerjik hipertansiyon.....	3
2) Muskarinik reseptör alttıpleri.....	4
3) Santral sinir sisteminde kolinerjik hipertansiyondan sorumlu bölgeler ve muskarinik reseptör alttıpleri.....	5
4) Hemorajik şokta santral kolinerjik sistemin rolü.....	6
GELİŞME	
I) Normotensif sıçanlarda yapılan deneyler.....	8
II) Hemorajik şoktaki sıçanlarda yapılan deneyler.....	21
SONUÇ.....	32
KAYNAKLAR.....	34

ÖZ

Santral kolinergik reseptörlerin uyarılması hipertansif yanıtlara yol açmakta ve deney hayvanlarında oluşturulan hemorajik şokun düzelmesini sağlamaktadır. Ancak bu etkilerin ortaya çıkmasında hangi santral sinir sistemi yapılarının ve reseptör alttıplerinin rol oynadığı henüz kesin olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmada normotensif sıçanlara intravenöz yoldan fizostigmin ve oksotremorin verilmesiyle ortaya çıkan presör yanıtına selektif M_2 kolinoseptör antagonistleri AF-DX 116 ve metoktramin tarafından nasıl değiştirildiği incelendi. Her iki antagonistin de kullanılan düşük dozlarda fizostigmin ve oksotremorinin kan basıncını artırıcı etkilerini inhibe ettiği, yüksek dozlarında ise fizostigminin hipertansif etkisini artırdıkları halde, oksotremorinin etkisini değiştirmedikleri gözlemlendi. Bu sonuçlar, gerek direkt etkili muskarinik reseptör agonisti oksotremorinin, gerekse indirekt etkili asetilkolinesteraz inhibitörü fizostigminin normotensif sıçanda gözlenen hipertansif etkilerinde santral sinir sisteminde bulunan pre- ve postsinaptik M_2 muskarinik reseptörlerin rol oynadığını düşündürmektedir.

Çalışmanın ikinci bölümünde hemorajik şoktaki sıçanlarda oksotremorinin presör ve yaşama oranını artırıcı etkilerinin birbirinden bağımsız olduğuna, presör etkinin santral muskarinik reseptörler aracılığı ile olmasına karşılık, yaşama oranını iyileştirici etkide santral nikotinik reseptörlerin rolü olabileceğine dair veriler elde edildi. Yine hemorajik şoktaki hayvanlarda beyin sapı ve hipotalamusta bulunan muskarinik reseptörlerin sayısında bir değişiklik bulunamazken, radyoliganda afiniteye anlamlı artış olduğu bulundu. Son olarak da kardiyovasküler düzenlemede katkısı bulunan bölgelerden biri olan AV3V bölgesinin oksotremorinin gerek presör, gerekse antişok etkilerine aracılık ettiği gösterildi.

ABSTRACT

Stimulation of central cholinergic receptors elicits hypertensive responses and reverses hemorrhagic shock in experimental animals. Central nervous system sites and receptor subtypes involved in these actions are not yet clearly elucidated. In the present study, the effects of selective M_2 cholinceptor antagonists, AF-DX 116 and methoctramine on physostigmine- and oxotremorine-induced hypertension in normotensive rats were investigated. Both antagonists at their lower doses used in this study, inhibited the pressor effects of physostigmine and oxotremorine. At higher doses, AF-DX 116 and methoctramine potentiated the hypertensive response to physostigmine, but did not change that to oxotremorine. These results indicate that both pre- and postsynaptic central M_2 muscarinic receptors are involved in the hypertensive effects of direct muscarinic receptor agonist, oxotremorine and indirectly acting acetylcholinesterase inhibitor, physostigmine in normotensive rats. In the second part of the study, the pressor and antishock effects of oxotremorine in hemorrhagic shock are found to be independent from each other, which are likely to be mediated via central muscarinic and nicotinic receptors, respectively. In rats with hemorrhagic shock, the number of muscarinic receptors in the brain stem and hypothalamus are not different from that in normotensives, but a significant increase in their affinity for radioligand is found. Finally, it is demonstrated that AV3V region, which is one of the important cardiovascular regulatory centers, plays a role in both pressor and antishock effects of oxotremorine.

GİRİŞ

1. Kolinergik hipertansiyon:

Asetilkolin ve benzeri kolinomimetik maddeler ve asetilkolinesteraz inhibitörleri aracılığıyla santral sinir sistemindeki muskarinik reseptörlerin uyarılması kedi, köpek, sıçan ve insanda kan basıncının yükselmesine neden olmaktadır (Brezenoff ve Giuliano, 1982; Oktay ve diğ., 1984). İlk kez asetilkolinin intraserebroventriküler enjeksiyonuyla 1935'de gösterilen kolinergik hipertansiyon, 1955'de kan-beyin bariyerini geçebilen asetilkolinesteraz inhibitörü fizostigminin intravenöz enjeksiyonu ile sıçanda gösterilmiştir (Suh ve diğ., 1935; Varagic, 1955). Gerek gönüllü kişilerde, gerekse çeşitli amaçlarla kolinomimetik ilaç kullanan hastalarda da kan basıncının yükseldiği gözlenmiştir (Freeman ve Carmichael, 1936; Vandekar ve diğ., 1971; Aquillonius ve Sjöström, 1971; Nattel ve diğ., 1979).

Beyine geçebilen kolinomimetiklerin i.v., geçemeyenlerin ise santral sinir sistemine uygulanması sonucu ortaya çıkan hipertansif yanıt atropin tarafından ortadan kaldırılır (Brezenoff ve Giuliano, 1982). Beyine geçemeyen antikolinergik ajanlar (örn. metilatropin) tarafından inhibe edilmediği için bu yanıtın santral muskarinik reseptörlerin uyarılmasına bağlı olduğu anlaşılmıştır (Brezenoff, 1973; Kubo ve Tatsumi, 1979). Böylece santral muskarinik reseptörlerin uyarılması, henüz sırası aydınlatılmamış bir dizi nöron aracılığıyla kan basıncını yükseltmektedir. Bu yanıt, i.v. atropin, alfa- ve beta-adrenergik reseptör blokerleri tarafından antagonize edilirken, i.v.

metilatropin ve bilateral vagotomiden etkilenmemektedir (Brezenoff ve Rusin, 1974; Ozawa ve Uematsu, 1976; Krstic ve Djurkovic, 1978; Brezenoff ve Giuliano, 1982). Bu sonuçlar, santral muskarinik reseptörlerin uyarılması sonucu ortaya çıkan yanıtın periferik vagus aracılığıyla değil de, sempatik sinirler aracılığıyla iletilildiğini göstermektedir.

2. Muskarinik reseptör alttipleri:

Asetilkolinin etkileri ilk kez 1914'de Sir Henry Dale tarafından muskarinik ve nikotinik olmak üzere ikiye ayrılmıştır. 1980'e kadar bu etkilere aracılık eden reseptörler "nikotinik" ve "muskarinik" olarak adlandırılmıştır. Bu tarihe kadar muskarinik reseptörlerin tek tipte olduğu düşünülmüş, ancak asetilkolinin yalnızca bazı muskarinik etkilerini kaldırıp, diğerlerini etkilemeyen antagonistlerin bulunması, muskarinik reseptörlerin alttipleri olduğunu göstermiştir.

1980 yılında pirenzepinin bulunması, muskarinik reseptörlerin ikiye ayrılmasına yol açmıştır (Hammer ve diğ., 1980). Böylece pirenzepine yüksek afinite gösteren reseptörlere M_1 , düşük afinite gösterenlere M_2 denilmiştir. M_1 reseptörler esas olarak nöronal dokularda, M_2 'ler ise kalpte, düz kaslarda ve ekzokrin bezlerde bulunmuştur. Daha sonra geliştirilen ileoselektif 4-DAMP ve kardiyoselektif AF-DX 116 gibi seçicilik gösteren muskarinik antagonistlerle kalp ve düz kaslı yapılardaki muskarinik reseptörler de birbirinden ayrılmıştır (Barlow ve diğ., 1976; Giachetti ve diğ., 1986).

Son yıllarda hızla gelişen moleküler biyolojik yöntemler sayesinde 5 değişik muskarinik reseptör alt tipinin genetik

kodlaması yapılmıştır ve bunlar m_1 , m_2 , m_3 , m_4 ve m_5 şeklinde isimlendirilmiştir (Bonner ve diğ., 1987). Bu alttiplere uyan fonksiyonel muskarinik reseptörlerin üç tanesi (M_1 , M_2 , M_3) iyi tanımlanmıştır; M_4 ile ilgili veriler vardır; fonksiyonel M_5 reseptör ise henüz tanımlanamamıştır. Eldeki bulgulara göre muskarinik reseptör alttiplerinin dokulara dağılımı şöyledir (Goyal, 1989; Levine ve Birdsall, 1989; Michel ve diğ., 1989; Dörje ve diğ., 1990; Kurtel ve diğ., 1990; Lazareno ve diğ., 1990; Tietje ve diğ., 1990; Waelbroeck ve diğ., 1990; Özkutlu ve diğ., 1993):

M_1 : otonom gangliyonlar, serebral korteks, hippokampus, v.b. nöronal dokular.

M_2 : kalp kası, subkortikal beyin bölgeleri, bazı düz kaslar.

M_3 : ekzokrin bezler, düz kaslar, endotel hücreleri.

M_4 : sıçan striatumu, kobay uterusu, kobay safra kesesi, bazı hücre dizileri, tavşan akciğeri, civciv atriyumu.

3. Santral sinir sisteminde kolinerjik hipertansiyondan sorumlu bölgeler ve muskarinik reseptör alttipleri:

1955'den bu yana, uyarılmasıyla hipertansif yanıtların ortaya çıktığı muskarinik reseptörlerin santral sinir sisteminin hangi bölgelerinde bulunduğu araştırılmaktadır (Semba ve Fibiger, 1989). İleri sürülen olası bölgeler şunlardır: Posterior hipotalamik çekirdek, ventrolateral medüller presör bölge, hippokampus, lokus seruleus ve rostral ventrolateral medullanın C1 alanı (Buccafusco ve Brezenoff, 1979; Sundaram ve diğ., 1988; Nattie ve Li, 1989; Haruta ve diğ., 1992). 1990 yılında yayınlanan bir yazıda bir muskarinik agonist olan karbakolün hem

presör, hem de dipsojenik ve natriüretik etkilerinden anteroventral 3. ventrikül (AV3V) bölgesinin sorumlu olduğu bildirilmiştir (Menani ve diğ., 1990). Bu bölgenin kan basıncının regülasyonunda önemli rolü olduğu bilinmektedir (Sanders ve Johnson, 1989; Schaumloffel ve diğ., 1990).

Kolinerjik hipertansif yanıtın ortaya çıkmasında rol oynayan muskarinik reseptör alttipleri ile ilgili az sayıda çalışma vardır. Bunların sonuçlarına göre ventrolateral medüller presör bölgede bulunan M_2 reseptörlerin uyarılması kan basıncının yükselmesine (Sundaram ve diğ., 1988), NTS'nin orta bölümündeki M_2 reseptörlerin uyarılması ise aksine hipotansiyona neden olmaktadır (Sundaram ve diğ., 1989). M_1 -selektif muskarinik antagonist pirenzepin, i.v. fizostigminin presör etkisini değiştirmedeği halde, M_1 ve M_3 reseptörlere selektif muskarinik antagonist 4-DAMP bu etkiyi inhibe etmektedir (Brezenoff ve Vargas, 1988). Bu nedenle kolinerjik hipertansiyonda santral M_3 reseptörlerin de rolü olduğu iddia edilmiştir. Ek olarak, insandaki esansiyel hipertansiyonun hayvan modeli olarak kabul edilen spontan hipertansif sıçanlarda i.v. 4-DAMP'ın kan basıncını düşürdüğü bulunmuştur (Brezenoff ve diğ., 1988).

4. Hemorajik şokta santral kolinerjik sistemin rolü:

Sıçanlarda kanatma yöntemiyle oluşturulan hemorajik şok modelinde ACTH ve beyine geçebilen kolinomimetik ilaçlar (örn. fizostigmin, oksotremorin) presör etki göstermekte ve şoka bağlı mortaliteyi önemli ölçüde azaltmaktadır (Bertolini ve diğ., 1989; Guarini ve diğ., 1989). Hemorajik şokun düzeltilmesini sağlayan kolinerjik mekanizmaların santral sinir sistemi içindeki

lokalizasyonunun ve bunların etkisine aracılık eden reseptör alt tiplerinin ortaya konulması bu sistemin daha iyi anlaşılmasını sağlayacağı gibi bazı dolaşım sistemi hastalıklarının tedavisinde de önemli olabilecektir. İlginç olarak ACTH'nin antişok etkisinin santral muskarinik reseptörler aracılığıyla ortaya çıktığı gösterilirken (Bertolini ve diğ., 1989), kolinergik ilaçların hemorajik şoktaki hayvanlarda presör ve antişok etkilerinin santral nikotinik reseptörler aracılığıyla olduğu iddia edilmektedir (Guarini ve diğ., 1989). Oysa dolaşımları normal olan hayvanlarda santral kolinergik hipertansiyon, muskarinik reseptörlerin uyarılması ile ortaya çıkmaktadır. Bu çelişkili durumun aydınlatılması için yeni çalışmalara gereksinim vardır.

Merkezi sinir sistemi yapılarından biri olan III. ventrikül-önü (AV3V) alanı, metabolik ve endokrin fonksiyonların yanı sıra sistemik dolaşımın düzenlenmesinde de etkilidir (Menani ve diğ., 1990)). Bu bölgenin elektriksel uyarımla tahrip edilmesinin, sıçanlarda tuzlu diyetle bağlı hipertansiyon oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Sanders ve Johnson, 1989). Başka bir çalışmada, uzun süren hemorajik hipotansiyon sırasında bu bölgenin, kan basıncının normale döndürülmesine yönelik olarak perifere giden α -adrenerjik vazokonstriktör sinyal çıkışını arttırdığı gözlenmiştir (Schaumloffel ve diğ., 1990). Kolinomimetik bir ilaç olan karbakolün normal hayvanların kan basıncını arttırıcı etkisinden de bu bölge sorumludur (Menani ve diğ. 1990). Bu nedenle, kolinomimetik ilaçların hemorajik şoku düzeltici etkisinde de yine bu bölgenin önemli olduğu düşünülebilir.

GELİŞME

I) NORMOTENSİF SIÇANLARDA YAPILAN DENEYLER:

Materyal ve metod:

Bu çalışmada her iki seksten, 200-300 g ağırlığında Sprague Dawley sıçanları kullanıldı. Hayvanlar deney gününe kadar standart koşullarda tutuldu. Deneyler üretan (1.2 g/kg, i.p.) anestezisi altındaki sıçanlarda yapıldı. Deney boyunca rektal sıcaklıkları izlenerek, ısıtıcılı battaniye aracılığıyla 37.0 ± 1.0 °C'de sabit tutuldu.

Solunumun kontrol edilebilmesi için endotrakeal tüp, arteriyel kan basıncını yazdırabilmek için karotid artere ve ilaç enjeksiyonları için juguler vane kateterler yerleştirildi. Santral ilaç uygulaması yapılacak sıçanlarda lateral beyin ventrikülüne (bregmaya göre 1 mm posterior, 1.5 mm lateral, kafatası yüzeyinden 4 mm ventral) kanül implante edildi ve bu kanülün yerleşiminin doğruluğu deneyden sonra metilen mavisi verilerek kontrol edildi. Arteriyel kateter bir basınç transduseri ile bağlantılandırılarak arteriyel kan basıncı bir poligrafa (Nihon Kohden) kaydettirildi.

15-20 dakikalık bir dengelenme süresinden sonra bazal ortalama kan basıncı (OKB) ve kalp hızı (KH) belirlendi. Fizostigmin veya oksotremorin, i.v. yavaş enjeksiyonla uygulandı. Bu kolinomimetik maddelerden 10 dakika önce ise intraserebroventriküler olarak tuzlu su, M_2 reseptör antagonisti AF-DX 116 veya metoktramin verildi. Oksotremorin deneylerinde, bu maddenin periferik etkilerini önlemek için i.v. metilatropin (1 mg/kg) ön-uygulaması yapıldı.

Çalışmanın bu bölümünde kullanılan ilaçlar: fizostigmin salisilat (Sigma), oksotremorin (Sigma), AF-DX 116 (Karl Thomae laboratuvarından hediye, Almanya), metoktramin (Dr.C. Melchiorre'den hediye, Italya). İ.s.v. ve i.v. yoldan kullanılan ilaçlar %0.9'luk serum fizyolojik içinde çözündürüldüler ve sırasıyla 10 µl/sıçan ve 0.1 ml/100 g vücut ağırlığı olacak şekilde verildiler. AF-DX 116 1N HCl içeren asidifiye tuzlu su içinde çözündürüldü ve daha sonra pH, 1N NaOH ile 7.4'e ayarlandı.

Veri analizi: Sonuçlar "ortalama $\pm$ standard hata" olarak ifade edildi. Ortalama kan basıncı (OKB, mm Hg) "1/3 nabız basıncı $\pm$ diastolik basınç" olarak hesaplandı. Kalp hızı (KH, vuru/dak) pulsatil basınç dalgalarından direkt olarak hesaplandı. Yanıt-zaman eğrisinin altındaki alan hesaplandı. Veriler tek yönlü varyans analizi, Duncan ve Student'ın t-testleri aracılığıyla değerlendirildi.

Bulgular:

Fizostigmine kardiyovasküler yanıtlar:

Bu çalışmadaki bazal OKB ve KH değerleri sırasıyla 86.0 ± 2.5 mm Hg ve 310.0 ± 13.0 vuru/dak idi. İntravenöz fizostigmin (10-80 µg/kg) enjeksiyonu, hem kan basıncı hem de kalp hızında doza bağımlı artışlara neden oldu. Çalışmanın sonraki bölümlerinde kullanılan 60 µg/kg dozunda fizostigmin OKB'da maksimum 29.4 ± 2.9 mmHg'lık ve kalp hızında da 88.3 ± 13.2 vuru/dak'lık artışa yol açtı (Şekil 1-3). Bu presör ve taşikardik yanıtlar enjeksiyondan hemen sonra ortaya çıktı ve 5. dakikada maksimuma ulaştı.

Selektif muskarinik M_2 kolinoseptör antagonistleri AF-DX 116 ve metoktramin ön-uygulaması yapılan sıçanlarda, santral M_2 kolinoseptörlerin fizostigmine bağlı kardiyovasküler cevaplara katılımı araştırıldı. Fizostigmin verilişinden önce i.s.v. yoldan tuzlu su veya antagonist enjekte edildi. Tuzlu su enjeksiyonu herhangi bir kardiyovasküler etki oluşturmadiğı gibi, fizostigmine bağlı yanıtları da etkilemedi. AF-DX 116 (100 and 300 nmol/sıçan) ve metoktramin (10 ve 30 nmol/sıçan) tek başlarına kan basıncı ve kalp hızını etkilemediler.

AF-DX 116 100 nmol/sıçan dozunda fizostigmine bağlı OKB artışını anlamlı olarak inhibe etti ($P<0.01$; Şekil 1), ancak taşikardik yanıtta anlamlı bir değişiklik olmadı (Şekil 3). Öte yandan AF-DX 116 daha yüksek dozda (300 nmol/sıçan) fizostigmine bağlı presör ve taşikardik yanıtları arttırdı (Şekil 1 ve 3). AF-DX 116 ön-uygulaması yapılmış sıçanlarda fizostigminin hipertansif etkisi kontrol grubundan anlamlı derecede fazlaydı ($p<0.05$) (Şekil 1). Bu grupta kalp hızı, gözlem süresinin (30 dak) sonuna kadar kontrol seviyelerine dönmemesine rağmen, AF-DX 116 ön-uygulaması yapılan grup ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlı bulunamadı (Şekil 3).

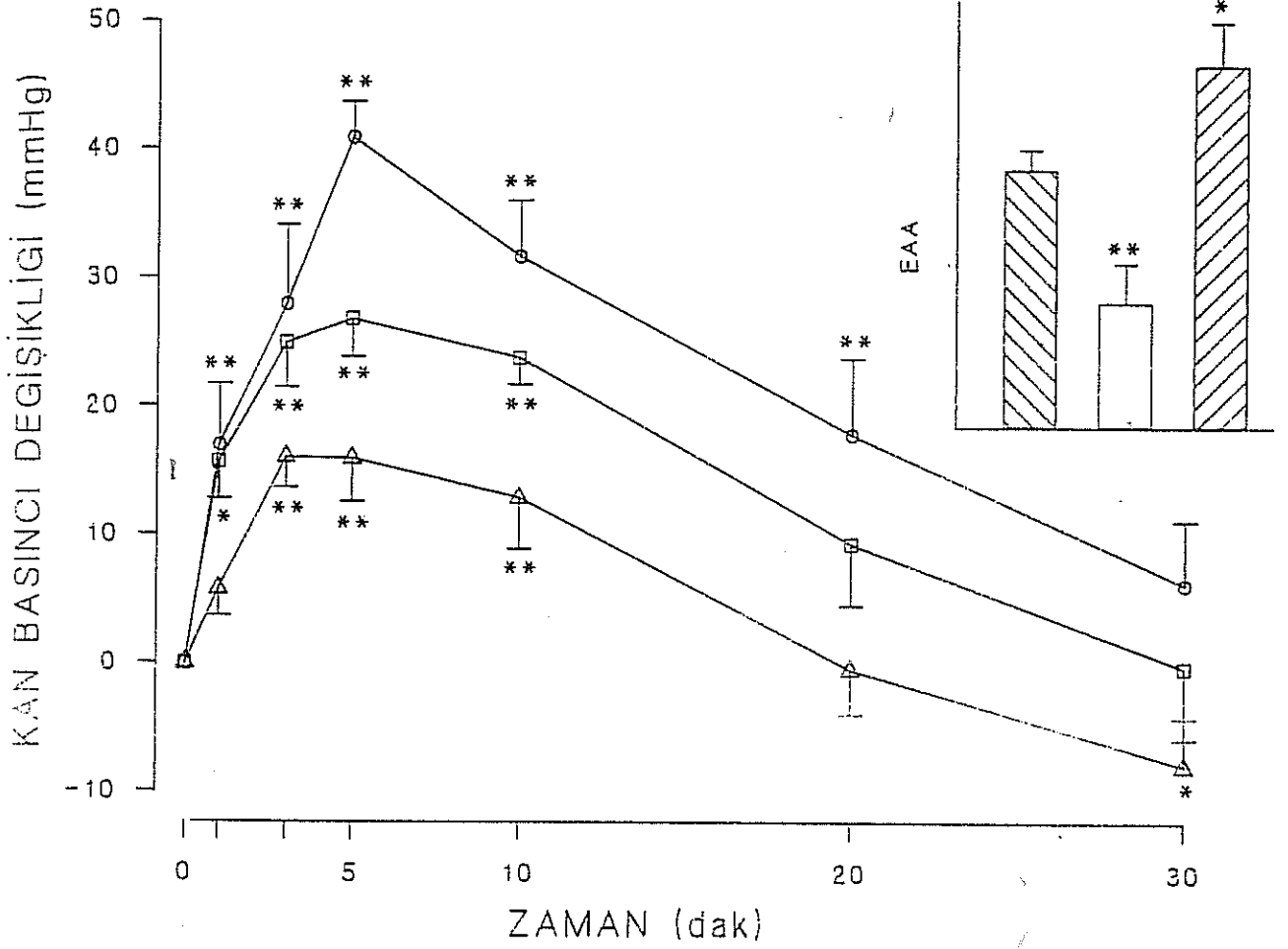
Benzer şekilde düşük dozda (10 nmol/sıçan) metoktramin de fizostigmine bağlı presör yanıtta anlamlı bir düşüşe yol açtı ($p<0.01$) ve kalp hızı yanıtını da hafifçe azalttı. Buna karşın yüksek dozda (30 nmol/sıçan) metoktramin fizostigminin presör ve taşikardik etkilerini arttırdı ($P<0.05$; Şekil 2 ve 3).

Oksotremorine bağlı kardiyovasküler yanıtlar:

Direkt etkili muskarinik kolinoseptör agonisti olan oksotremorine bağlı kardiyovasküler yanıtlar incelendi.

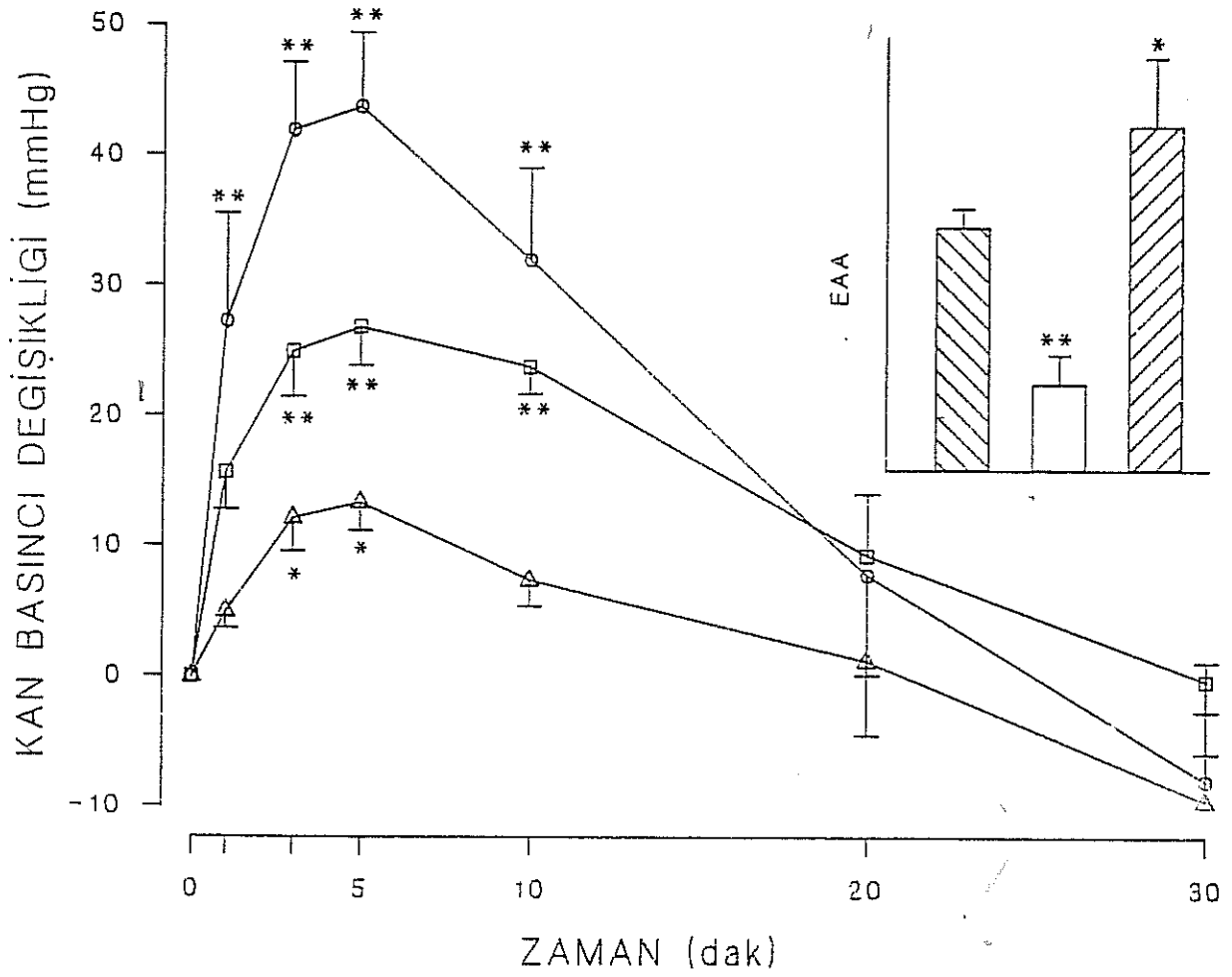
Oksotremorin injeksiyonu (20-40 µg/kg; i.v.) kan basıncını doza bağımlı bir şekilde arttırdı. Çalışmanın sonraki bölümlerinde kullanılan 20 µg/kg oksotremorin OKB'da 45.0 ± 1.4 mm Hg'lık bir artışa yol açtı. Presör yanıt çok hızlı başladı ve injeksiyondan 3 dakika sonra maksimuma ulaştı (Şekil 4 ve 5). Oksotremorinin periferik muskarinik kardiyovasküler etkilerini önlemek amacıyla sıçanlara metilatropin ön-uygulaması yapıldı. Metil atropin anlamlı ve sürekli bir taşikardiye yol açtığı için, bu hayvanlarda oksotremorinin kalp hızı üzerindeki etkisi değerlendirilmedi.

100 nmol/sıçan AF-DX 116 ve 10 nmol/sıçan metoktramin ön-uygulaması oksotremorine bağlı OKB yükselmesini kısmen inhibe etmesine ($P < 0.01$) karşın daha yüksek doz AF-DX 116 (300 nmol/sıçan) ve metoktramin (30 nmol/sıçan) oksotremorine bağlı OKB değişikliklerini etkilemedi (Şekil 4 ve 5).



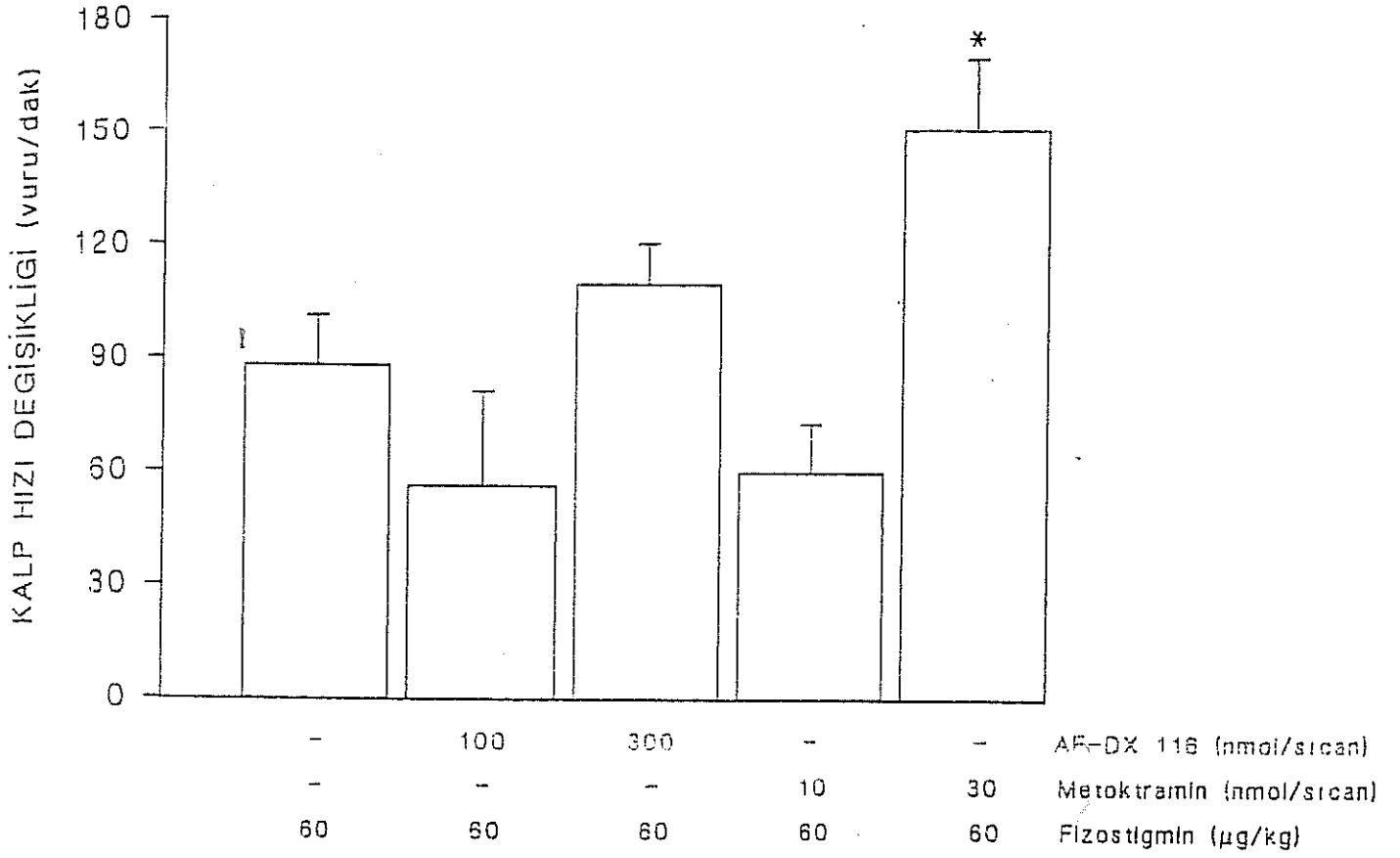
Şekil 1. Tek başına (kare; ) veya i.s.v. AF-DX 116 (üçgen; , 100 nmol/sıçan; daire; , 300 nmol/sıçan) uygulamasını takiben i.v. fizostigminin ortalama kan basıncına etkisi. EAA: 0-20 dakika arasında eğri altındaki alan.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

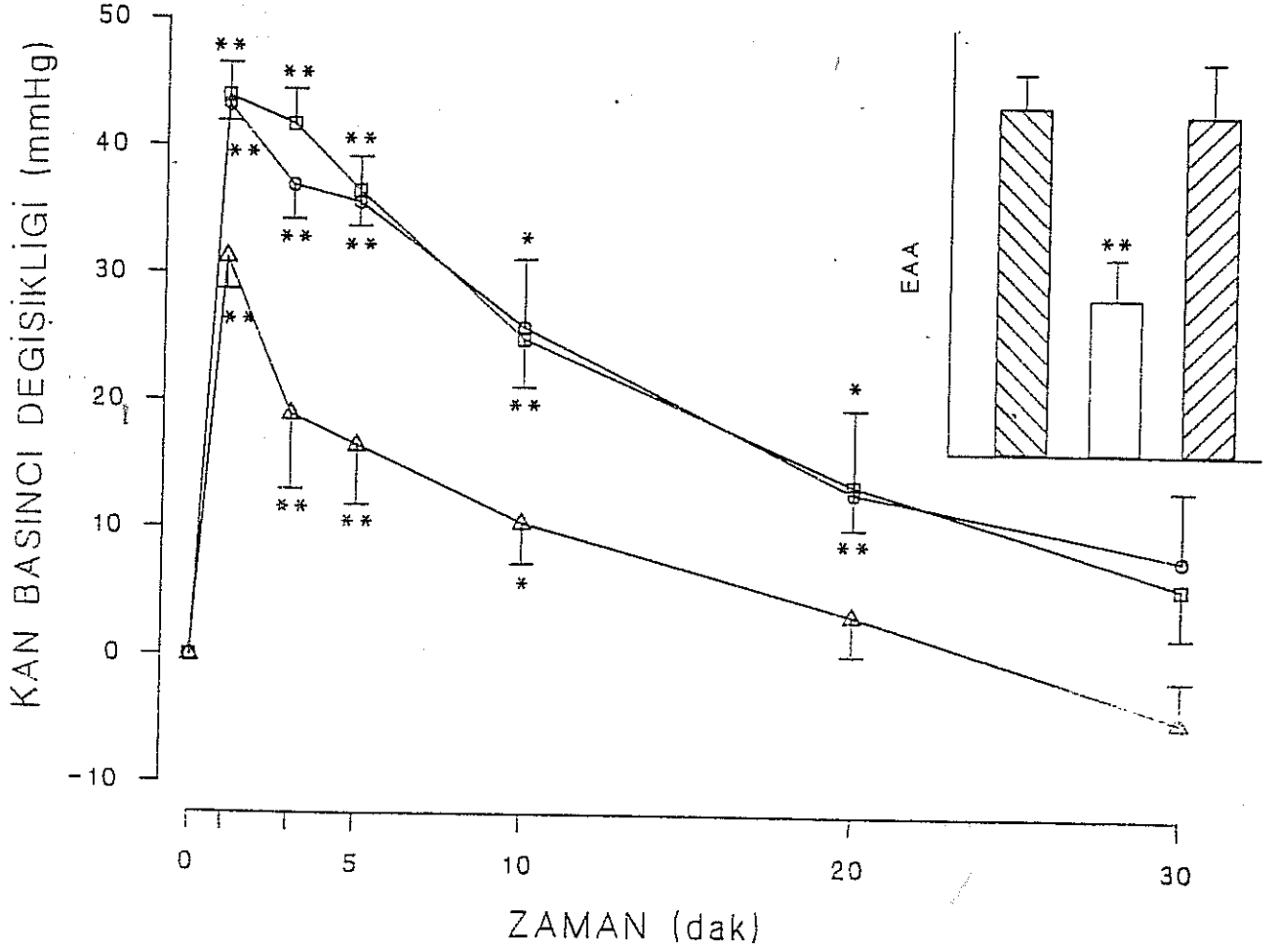


Şekil 2. Tek başına (kare; ) veya i.s.v. metoktramin (üçgen; , 10 nmol/sıçan; daire; , 30 nmol/sıçan) uygulamasını takiben i.v. fizostigminin ortalama kan basıncına etkisi. EAA: 0-20 dakika arasında eğri altındaki alan.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

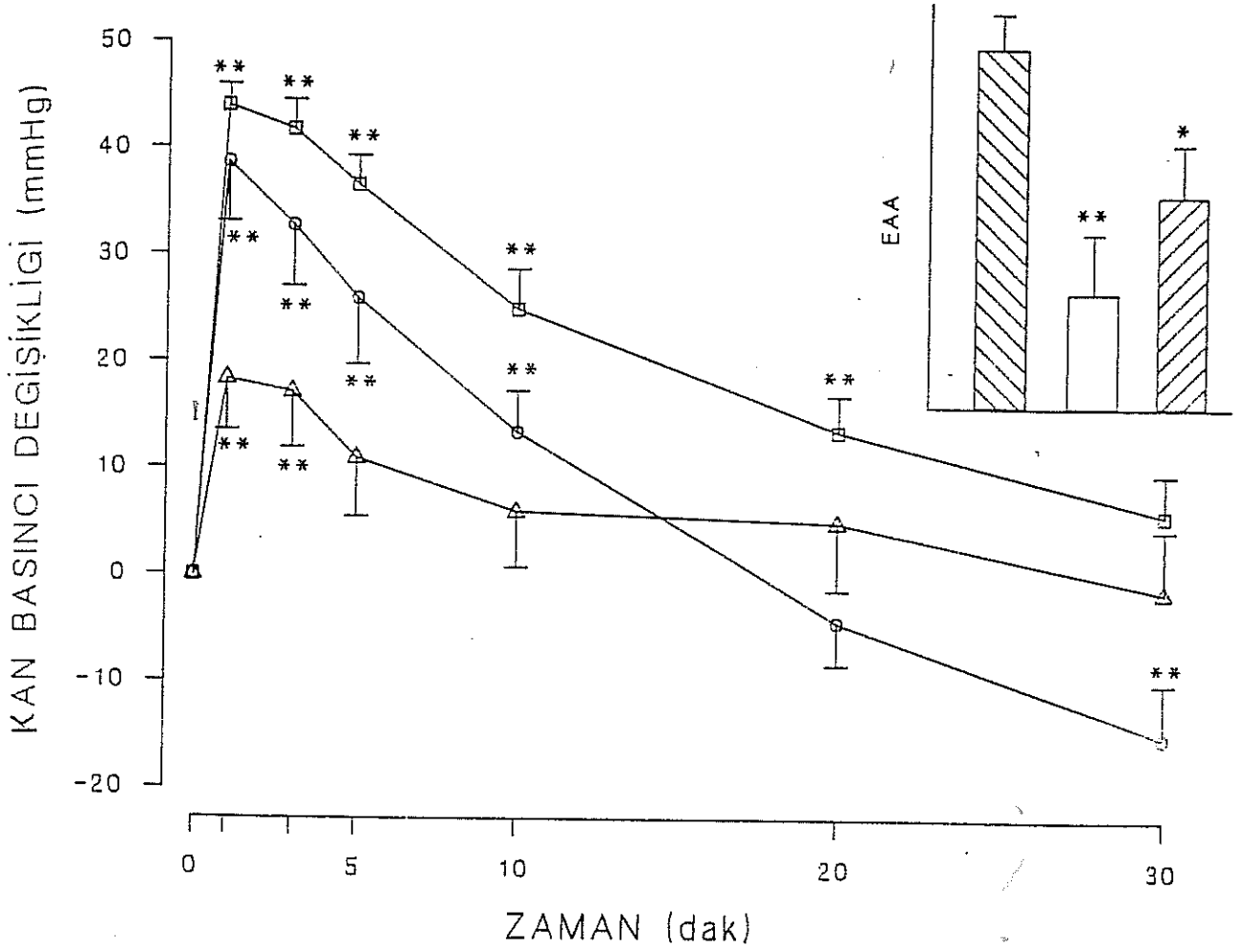


Şekil 3. Tek başına veya i.s.v. AF-DX 116 ya da metoktramin uygulamasını takiben i.v. fizostigminin kalp hızı üzerine etkisi. * $p < 0.05$.



Şekil 4. Tek başına (kare; ) veya i.s.v. AF-DX 116 (üçgen; , 100 nmol/sıçan; daire; , 300 nmol/sıçan) uygulamasını takiben i.v. oksotremorinin ortalama kan basıncına etkisi. EAA: 0-20 dakika arasında eğri altındaki alan.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.



Şekil 5. Tek başına (kare; ) veya i.s.v. metoktramin (üçgen; , 10 nmol/sıçan; daire; , 30 nmol/sıçan) uygulamasını takiben i.v. oksotremorinin ortalama kan basıncına etkisi. EAA: 0-20 dakika arasında eğri altındaki alan.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Tartışma:

Yukarıda da sözedildiği gibi günümüzde muskarinik reseptörlerin homojen bir reseptör popülasyonu olmadığı bilinmektedir. Moleküler biyolojik ve farmakolojik yaklaşımlarla muskarinik reseptör alttipleri tanımlanmıştır. Son 10 yıl içinde beş değişik muskarinik reseptör alttipinin sentezinden sorumlu genler klonlanmıştır (Bonner ve diğ., 1987). Selektif muskarinik kolinoseptör antagonistleri değişik dokulardaki alttiplerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bunlardan AF-DX 116 ve metoktramin M_2 muskarinik kolinoseptör antagonisti olarak tanınmaktadırlar (Giachetti ve diğ., 1986; Giraldo ve diğ., 1988). Bu antagonistler bizim çalışmamızda M_2 kolinoseptörlerin santral kolinerjik hipertansiyona katkısını araştırmak amacıyla kullanılmıştır.

Kolinesteraz inhibitörlerinin ve kolinerjik agonistlerin sıçanda gözlenen hipertansif etkilerini santral sinir sisteminde bulunan muskarinik reseptörler aracılığıyla gösterdiği bilinmektedir (Brezenoff ve Guilliano, 1982). Bir kolinesteraz inhibitörü olan fizostigmin ve bir muskarinik reseptör agonisti olan oksotremorin i.v. yoldan uygulandıklarında, bu çalışmada gösterildiği gibi, kan-beyin engelini aşarak hipertansif yanıt oluşturlar (Varagic ve diğ., 1955; Oktay ve diğ., 1984). Benzer bir etki kolinerjik maddelerin i.s.v. veya posterior hipotalamik çekirdek, ventromedüller presör alan, AV3V bölgesi, hippokampus, lokus seruleus ve rostral ventrolateral medullanın C1 bölgesi gibi çeşitli beyin bölgelerine direkt uygulanmaları halinde de gözlenir (Brezenoff, 1973; Krstic ve Djurkovic, 1978; Buccafusco ve Brezenoff, 1979; Brezenoff ve Giuliano, 1982; Oktay ve diğ.,

1984; Sundaram ve diğ., 1988; Giuliano ve diğ., 1989; De Luca ve diğ., 1990; Nattie ve Li, 1990; Menani ve diğ., 1990; Haruta ve diğ., 1992). Buna zıt olarak, nukleus traktus solitariusa kolinomimetik madde enjeksiyonu hipotansiyona neden olur (Criscione ve diğ., 1983; Sundaram ve diğ., 1989). Sonuç olarak, gerek i.v., gerekse i.s.v. yoldan uygulanan kolinomimetiklere bağlı presör yanıtın, santral sinir sisteminde çeşitli bölgelerdeki etkilerinin net sonucu olduğu anlaşılmaktadır.

Brezenoff ve arkadaşları (1988) selektif M_1 ve M_3 muskarinik reseptör antagonisti 4-DAMP'ın üretan anestezisi altındaki normotensif sıçanlarda i.v. fizostigmine bağlı presör yanıtı doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini, M_1 - selektif antagonist pirenzepinin ise etkisiz olduğunu bildirmiştir. Ek olarak, 4-DAMP'ın i.s.v. uygulanması da (25 µg/sıçan) spontan hipertansif sıçanlarda kan basıncını düşürmüştür (Brezenoff ve diğ., 1988). Bu sonuçlar M_3 muskarinik reseptör alttiplerinin, en azından kısmen santral kolinerjik hipertansiyonda rolü olduğunu düşündürmektedir. Öte yandan, M_2 kolinoseptör antagonisti AF-DX 116'nın ventrolateral medüller presör bölgeye mikroenjeksiyonun (0.2-1.6 nmol) pentobarbital anestezisi altındaki sıçanlarda hem kolinomimetiklere bağlı presör yanıtı inhibe ettiği, hem de kan basıncını düşürdüğü bildirilmiştir (Sundaram ve diğ., 1988). Buna göre, ventrolateral medüller presör bölgedeki M_2 kolinoseptörlerin kan basıncının regülasyonunda tonik etkileri olduğu düşünülebilir. Giuliano ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada da (1989) fizostigmin tarafından indüklenen hipertansiyonda rostral ventrolateral medullanın C1 bölgesinde bulunan M_2 reseptörlerin katkısı olduğu gösterilmiştir. Bu

çalışmada ise düşük dozda AF-DX 116 (100 nmol/sıçan) ve metoktraminin (10 nmol/sıçan) her iki kolinomimetik ajanın (fizostigmin ve oksotremorin) hipertansif etkilerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Özellikle direkt muskarinik reseptör agonisti oksotremorinin etkisinin inhibisyonu postsinaptik yerleşim gösteren M_2 muskarinik reseptörlerin tutulumunu göstermektedir.

İlginç olarak, AF-DX 116 ve metoktraminin bu çalışmada kullanılan yüksek dozları (sırasıyla 300 ve 30 nmol/sıçan) fizostigmine verilen presör ve taşikardik yanıtları potansiyalize etmiştir. Fizostigmin asetilkolin aracılığıyla etki gösteren indirekt etkili bir kolinomimetik madde olduğundan (Brezenoff ve Rusin, 1974), bu sonuçlar presinaptik inhibitör M_2 muskarinik reseptörlerin varlığını düşündürmektedir. Bu durumda direkt etkili muskarinik reseptör agonisti oksotremorinin hipertansif etkisinin bu dozlarda AF-DX 116 ve metoktramin tarafından artırılmaması, aksine daha fazla inhibe edilmesi beklenirdi. Ancak oksotremorinin etkisinde 300 nmol/sıçan AF-DX 116 ve 30 nmol/sıçan metoktramin tarafından değiştirilmemesi, kolinerjik hipertansiyona aracılık eden kolinerjik nöronlarda asetilkolin salıverilmesinin tonik olarak presinaptik inhibitör M_2 reseptörler tarafından regüle edildiğini göstermektedir. Sonuç olarak M_2 -seçici antagonistler presinaptik inhibitör muskarinik reseptörleri bloke ederek asetilkolin salıverilmesi üzerindeki inhibitör tonüsü kaldırmaktadırlar. Eş zamanlı olarak, postsinaptik M_2 reseptörlerin blokajı kolinerjik hipertansiyonu inhibe etmektedir. Bu iki etkinin net sonucunda oksotremorinin presör etkisi değişmemiş gibi görünmektedir. Bu sırada akılda

tutulması gereken önemli bir nokta, M_2 -seçici antagonist varlığında kolinomimetik ilacın etkisinin M_3 reseptörler aracılığıyla sürdürülmekte olduğudur. Fizostigmin etkisini gösterebilmek için asetilkolin salıverilmesine gereksindiğinden, presinaptik reseptörlerin inhibisyonu ön plana çıkmaktadır.

Kardiyovasküler regülasyonda rol oynayan kolinerjik merkezlerden biri olan lateral septal bölgede bulunan M_2 reseptörlerin esas olarak presinaptik yerleşim gösterdiği bildirilmiştir (Raiteri ve diğ., 1984). Hippokampusda bulunan muskarinik otoreseptörler de M_2 alttipindedir (Richards, 1990) ve bu bölgedeki muskarinik reseptörlerin uyarılması presör yanıtı açmaktadır. Ek olarak, spontan hipertansif sıçanlarda gösterilen santral kolinerjik aktivitenin presinaptik mekanizmalarla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Makari ve diğ., 1989; Scheucher ve diğ., 1990).

Kullanılan antagonistlerin pre- ve postsinaptik reseptörleri bloke eden dozlarının farklı olması bazı mekanizmalarla açıklanabilir: a) Presinaptik reseptörlerin dansitesi ve/veya asetilkolin salıverilmesi üzerine etkileri düşük olabilir. Bu nedenle sinaptaki nörotransmitter konsantrasyonunda anlamlı bir değişiklik yaratılabilmesi için bu reseptörlerin çoğunun kapatılması gerekir. b) Presinaptik reseptörler sinir ucunda sinapstan görece uzak yerleşim gösterebilirler. Eğer böyle ise asetilkolinin ve onun etkilerini bloke edecek olan antagonistin bu bölgelere ulaşabilmeleri için sinaps aralığında yüksek konsantrasyonlara ulaşmaları gerekir. c) Son olarak, pre- ve postsinaptik muskarinik reseptörler farklı alttipde olabilir. Bu olasılığın test edilmesi için daha seçici yeni antagonistlere

gereksinim vardır.

Çalışmanın bu bölümünde elde edilen sonuçlar kısaca şöyle özetlenebilir: Kolinomimetik maddelere bağlı hipertansiyon hem presinaptik hem de postsinaptik muskarinik reseptörler üzerindeki etkilerinin net sonucudur. Bu çalışmada kolinerjik hipertansiyonda kısmen postsinaptik M_2 reseptörlerin rol oynadığı ve presinaptik inhibitör M_2 reseptörlerin varlığı ve tonik etkisi ile ilgili deliller elde edilmiştir.

I

II) HEMORAJİK ŞOK OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA YAPILAN DENEYLER:

Materyal ve metod:

a) Hemorajik şok oluşturulması:

Çalışmanın bu bölümünde her iki seksden 200-300 g ağırlığındaki Sprague Dawley sıçanlara üretan (1.2 g/kg) anestezisi uygulandı. Deney süresince rektal temperatur, ısıtıcılı battaniye aracılığıyla $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 'de sabit tutuldu. Ortalama arteriyel kan basıncını izlemek amacıyla sağ iliyak artere polietilen kateter yerleştirildi ve bir basınç transdüseri ile poligrafa (Grass) bağlandı. Sol iliyak vene yerleştirilen kateter intravenöz ilaç uygulamaları için kullanıldı. Sol iliyak artere yerleştirilen polietilen kateterden 10 dakika aralıklarla, toplam 2.2 ml/100 g vücut ağırlığı kadar kan alınıp, kan basıncının 30 dak içinde 15-25 mm Hg'ya kadar düşmesi sağlandı. Santral ilaç uygulaması yapılacak sıçanlarda sağ lateral beyin ventrikülüne (bregmaya göre 1 mm posterior, 1.5 mm lateral, kafatası yüzeyinden 4 mm ventral) kanül yerleştirildi.

Bir grup sıçana hemorajik şok oluşturulmadan hemen önce tuzlu su (0.1 ml/100 g, i.v. ve/veya 10 µl/sıçan, i.s.v.), muskarinik antagonist atropin sülfat (2 mg/kg, i.v.), nikotinik antagonist mekamilamin (50 µg/sıçan, i.s.v.) veya atropin sülfat (2 mg/kg, i.v.) ile birlikte mekamilamin (50 µg/sıçan, i.s.v.) ön-uygulaması yapıldı. Bu hayvanlar, hemorajik şok oluşturulduktan sonra tuzlu su (0.1 ml/kg) veya oksotremorin (50 µg/kg) ile tedavi edildiler. Atropin sülfat verilen grup dışında, oksotremorinin periferik etkilerini önlemek için metilatropin (1 mg/kg, i.v.) ön-uygulaması yapıldı.

Veri analizi: Sonuçlar "ortalama $\pm$ standard hata" olarak ifade edildi. Ortalama kan basıncı (OKB, mm Hg) "1/3 nabız basıncı $\pm$ diastolik basınç" olarak hesaplandı. Kalp hızı (KH, vuru/dak) pulsatil basınç dalgalarından direkt olarak hesaplandı. Ayrıca hemorajik şok oluşturulmasından sonra 30 dakika ve 60 dakikada hayatta kalan hayvanların sayısının o gruptaki toplam denek sayısına oranı "yaşama oranı" olarak kaydedildi. Veriler tek yönlü varyans analizi, Duncan ve Student'in t-testleri aracılığıyla değerlendirildi.

b) AV3V bölgesi lezyonu oluşturulması:

Bir grup deneğin AV3V bölgesi hemorajik şok oluşturulmadan önce tahrip edildi. Bunun için hayvan üretan (1.2 g/100 g, i.p.) ile anesteziye edilip stereotaksik alete yerleştirildi. Pellegrino'nun (1986) sıçan beyin atlasından yararlanılarak belirlenmiş koordinatlara göre, uyarıcı bir elektrod aracılığıyla 3 mA'lık anodal doğru akım, 20 saniye süre ile uygulanarak bu bölge haraplandı. Ardından protokola uygun şekilde hemorajik şok

oluşturulup, oksotremorin tedavisi uygulandı. İstenen bölgenin haraplandığı, postmortem histolojik inceleme ile doğrulandı. Kontrol grubu olarak kullanılan hayvanlarda elektrot AV3V bölgesine kadar ilerletilmedi ve anterior kommissür civarına aynı şiddette akım uygulandı; bir diğer kontrol grubunda ise elektrot AV3V bölgesine yerleştirildi ancak akım verilmedi. Böylece elde edilen sonuçların spesifik olarak AV3V bölgesinden mi, yoksa beyinde herhangi bir bölgenin haraplanmasından mı kaynaklandığının ayırt edilmesi amaçlandı.

c) Muskarinik reseptör radyoligand bağlanma çalışması:

Normotensif kontrol ve hemorajik şoktaki sıçanlar dekapite edilerek beyinleri hızla çıkarıldı ve buz üzerine alındı. Beyin sapı ve hipotalamus bölgeleri ayrıldı. Bu dokular bağlanma çalışması gününe kadar -70°C 'de saklandı. Deney günü dokular 50 mM sodyum-potasyum fosfat tamponu içinde, Ultraturrax homojenizatör kullanılarak homojenize edildiler. Homojenat, 4°C 'de 1000 G'de 10 dakika süreyle santrifüjlendikten sonra pelette kalan nükleer fraksiyon atıldı. Süpernatanda bulunan membran fraksiyonu radyoligand bağlanma çalışması için kullanıldı.

Membran süspansiyonu 0.05-0.1 mg protein/ml olacak şekilde, $[^3\text{H}]\text{QNB}$ ile 60 dakika 25°C 'de, toplam 2 ml 50 mM sodyum, potasyum fosfat tamponu içinde inkübe edildi. Saturasyon çalışması için radyoligand 0.01-2.5 nM konsantrasyon aralığında, nonspesifik bağlanmanın tespiti için ise işaretsiz atropin 10^{-5} M konsantrasyonda kullanıldı. Inkübasyon süresinin sonunda örnek, bir vakum pompası aracılığıyla, hızla cam (glass fiber) filtreden

süzüldü ve filtre iki defa 3'er ml soğuk tampon ile yıkandı. Filtreler sıvı sintilasyon kokteyli içine alınarak 12 saat bekletildiler ve daha sonra her bir filtredeki radyoaktivite miktarı sıvı sintilasyon sayacında sayıldı. Elde edilen veriler Scatchard analizi ile değerlendirildi ve B_{max} ve K_D değerleri hesaplandı, ve Student'ın t-testi kullanılarak karşılaştırıldı.

Bulgular:

1) Hemorajik şok modelinde oksotremorinin kan basıncı ve yaşama oranı üzerine etkileri ve bunun muskarinik ve nikotinik antagonistler tarafından değiştirilmesi:

Oksotremorin hemorajik şoktaki hayvanlara verildiğinde kan basıncında ani ve anlamlı artışa yol açtı ve 30 dakikadaki yaşama oranını % 5.5 (1/18)'dan % 92 (12/13)'ye, 60 dakikadaki yaşama oranını ise % 0 (0/18)'dan % 85 (11/13)'e yükseltti (Şekil 6 ve 7).

Atropin ön-uygulaması yapılmış grupta oksotremorinin ilk 10 dakikada gözlenen tipik presör etkisinin anlamlı şekilde inhibe olduğu görüldü (Şekil 6). Ancak 30 dakikada yaşama oranı %100 (11/11), 60 dakikadaki yaşama oranı %64 (7/11) olarak bulundu (Şekil 7). Mekamilamin ön-uygulaması yapılan grupta oksotremorine bağlı kan basıncı artışı yanıtının zaman içindeki seyrinde önemli değişiklik gözlemlendi. Maksimum yanıtta anlamlı fark olmadığı halde etkinin süresi belirgin derecede kısaldı (Şekil 6). Bu grupta 30 dakikada yaşama oranı %40 (2/5), 60 dakikada % 0 (0/5) olarak bulundu (Şekil 7). Öte yandan atropin ve mekamilamin kombinasyonu ile ön-uygulama yapılan hayvanların %20 (2/10)'si 30 dakika

içinde öldüler, 60 dakikalık yaşama oranı % 0 (0/10) olarak bulundu ve oksotremorinin presör etkisinin tamamen ortadan kalktığı gözlemlendi (Şekil 6 ve 7).

2) Hemorajik şoklu hayvanlarda muskarinik reseptör [³H]QNB bağlanması:

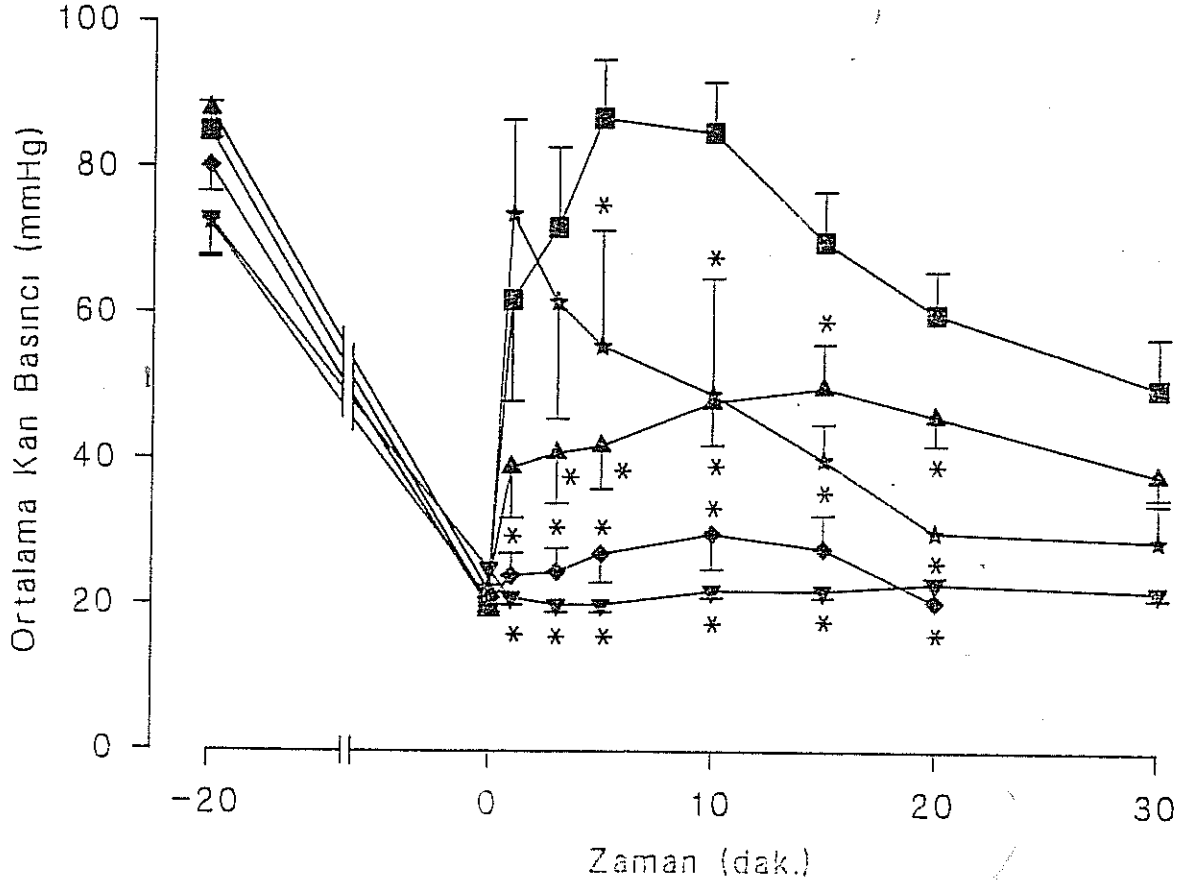
Tablo 1: Normotensif ve hemorajik şoklu sıçanlarda muskarinik reseptör [³H]QNB bağlanması. * normotensif gruptan anlamlı derecede farklı (p<0.05).

		B _{max} (fmol/mg protein)	K _D (nM)
Normotensif	Hipotalamus	225.8±33.9	0.321±0.066
	Beyin sapı	167.7±24.1	0.357±0.085
Hemorajik şok	Hipotalamus	247.4±21.4	0.129±0.024*
	Beyin sapı	180.6±25.6	0.094±0.021*

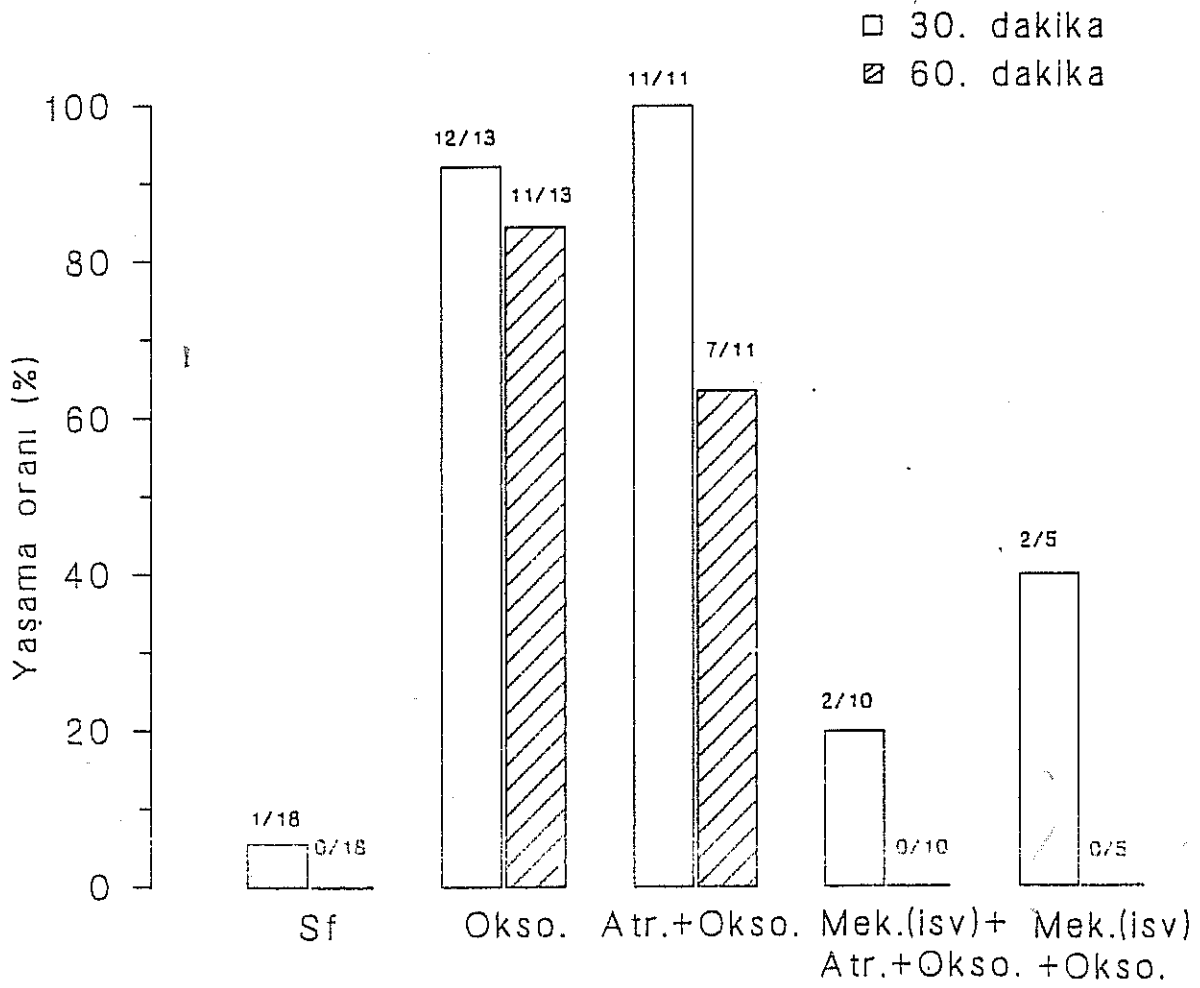
Görüldüğü gibi hemorajik şokta hipotalamus ve beyin sapında muskarinik reseptör sayısında herhangi bir azalma olmadığı halde, [³H]QNB'nin reseptöre bağlanma afinitesinde anlamlı artış olmaktadır.

3) AV3V lezyonu yapılmış sıçanlarda oksotremorinin antişok etkisi:

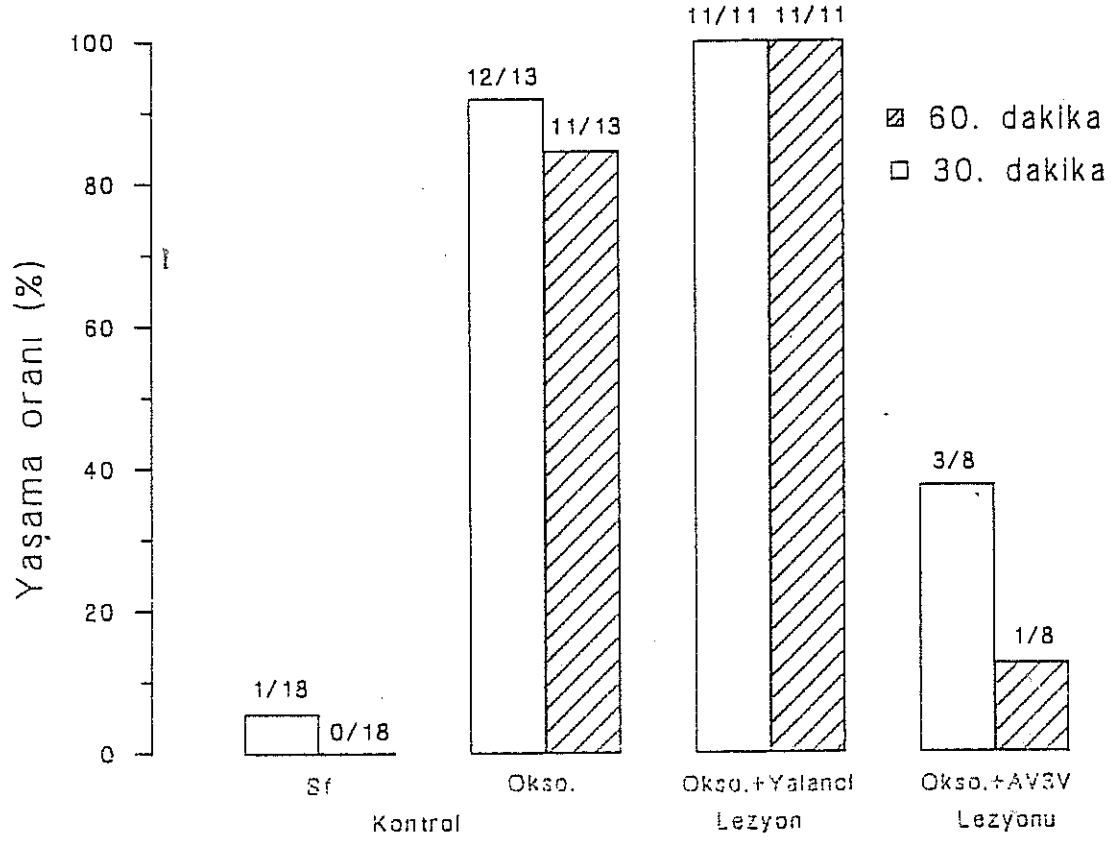
Hemorajik şoklu, gerek elektrot yerleştirilen, gerekse anterior komisür üzerindeki bir bölgeye akım uygulanan yalancı lezyon gruplarında oksotremorinin kan basıncı ve yaşama oranı üzerine olan etkileri kontrolden farklı bulunmadı. AV3V lezyonu yapılmış hayvanların 30 dakikada yalnızca % 48 (3/8)'i, 60 dakikada %12.5 (1/8)'u hayatta kaldı (Şekil 8) ve bu grupta oksotremorinin presör yanıtı anlamlı derecede inhibe oldu (Şekil 9).



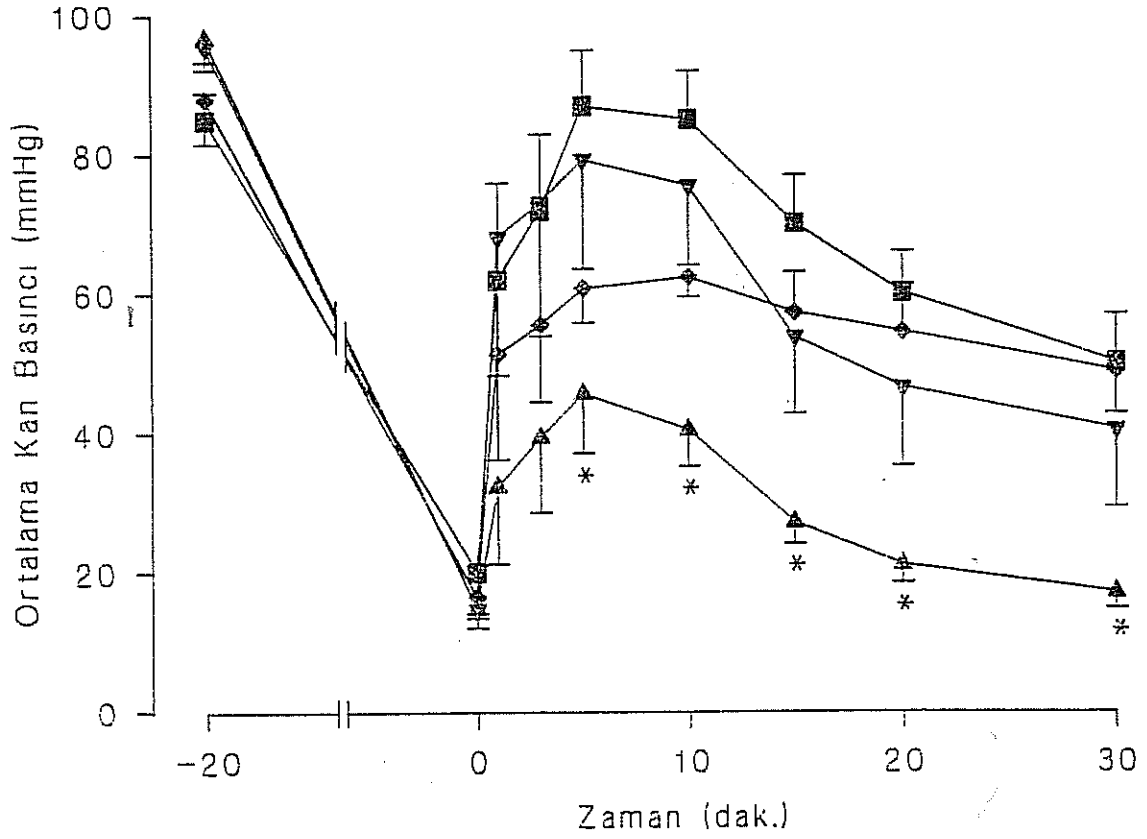
Şekil 6. Hemorajik şok oluşturulmuş sıçanlarda kan basıncı üzerine aşağıdaki tedavilerin etkileri: (kare) oksotremorin (50 µg/kg, i.v.); (yıldız) mekamilamin (50 µg/sıçan, i.s.v.) ve oksotremorin; (üçgen) atropin sülfat (2 mg/kg, i.v.) ve oksotremorin; (eşkenar dörtgen) tuzlu su (0.1 ml/kg, i.v.); (ters üçgen) mekamilamin, atropin sülfat ve oksotremorin. Oksotremorin şok oluşturulduktan sonra hemen sonra (0. dakika) verilmiştir. * $p < 0.05$.



Şekil 7. Hemorajik şok oluşturulduktan sonra 30 ve 60 dakikalık yaşama oranları. (Sf) tuzlu su, (Okso) oksotremorin, (Atr) atropin sülfat, (Mek) mekamilamin.



Şekil 8. Hemorajik şok oluşturulduktan sonra 30 ve 60 dakikalık yaşama oranları. (Sf) tuzlu su, (Kontrol) intakt hayvanlar, (Okso) oksotremorin.



Şekil 9. Hemorajik şok oluşturulmuş (kare) intakt, (üçgen) AV3V lezyonu yapılmış, (ters üçgen) AV3V bölgesine elektrot yerleştirilmiş, fakat lezyon yapılmamış, (eşkenar dörtgen) AV3V bölgesinin hemen dışında bir bölgeye lezyon yapılmış sıçanlarda oksotremorinin (50 µg/kg, i.v.) ortalama kan basıncına etkisi. Oksotremorin şok oluşturulduktan sonra hemen sonra (0. dakika) verilmiştir. * $p < 0.05$.

Tartışma:

Normotensif sıçanlarda gözlenen kolinerjik hipertansiyonun santral muskarinik reseptörler aracılığıyla ortaya çıktığı bilinmektedir (Brezenoff, 1973; Kubo ve Tatsumi, 1979). Hemorajik şoklu hayvanlarda ise kolinomimetiklerin presör etkilerinde santral muskarinik reseptörlerin rolü olmadığı iddia edilmiştir (Guarini ve diğ., 1989). Oysa yukarıda sunulan deney sonuçları, en azından, oksotremorinin hemorajik şoklu sıçanlarda gözlenen akut presör etkisinin santral muskarinik reseptörler aracılığıyla olduğunu göstermektedir. Bu sonuçları desteklemek amacıyla, hemorajik şoka bağlı olarak, özellikle kan basıncının kontrolundan sorumlu iki önemli yapıda, hipotalamus ve beyin sapında muskarinik reseptörlerin sayı ve afinitelerinde bir değişiklik olup olmadığı araştırmak için radyoligand ($[^3\text{H}]\text{QNB}$) bağlanma çalışması yapılmış, hemorajik şokta hipotalamus ve beyin sapında muskarinik reseptör sayısında herhangi bir azalma olmadığı gibi, QNB'nin reseptöre bağlanma afinitesinde de anlamlı artış olduğu bulunmuştur.

Yapılan fonksiyonel deneylerin sonucunda oksotremorinin antişok etkisinin yalnızca kan basıncının akut artışına bağlı olmadığı anlaşılmaktadır. Bu akut hipertansif etki, periferik metilatropin ön-uygulamasına rağmen gözlemlendiği ve atropin sülfat ile inhibe olduğundan büyük ölçüde santral muskarinik reseptörler aracılığıyla ortaya çıkmaktadır. Ancak, hemorajik şokta ölüm oranı oksotremorin tarafından, atropin sülfata rağmen azaltıldığından, bu etkide santral muskarinik reseptörlerin rolü yok gibi görünmektedir. İ.s.v. uygulanan mekamilamin oksotremorinin kan basıncına etkisini kısmen değiştirirken,

yaşama oranı üzerine iyileştirici etkisini hemen hemen tamamen ortadan kaldırmıştır. Bu nedenle bu sonuncu etkinin santral nikotinik reseptörler aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. İlginç olarak, Guarini ve arkadaşları (1989) ise hemorajik şoktaki sıçanlarda kolinomimetik ilaçların presör etkilerinin de kısmen santral nikotinik reseptörler aracılığıyla olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmadan farklı olmak üzere, bu araştırmacıların çalışmalarında kolinomimetiklere bağlı presör etki muskarinik antagonistler tarafından bloke edilmemiştir. Santral kolinergik hipertansif yanıtın hemorajik şok halinde, neden normotensif hayvanlardan farklı olarak muskarinik reseptörleri değil de nikotinik reseptörleri uyardığı hakkında bir açıklama yapılmamıştır. Bizim çalışmamızda ise, yukarıda da sunulduğu gibi, gerek normotensif, gerekse hemorajik şoktaki sıçanlarda oksotremorinin presör etkisinde ağırlıklı olarak santral muskarinik reseptörlerin katılımı gösterilmiştir.

Guarini ve arkadaşları (1991) tarafından yapılan bir diğer çalışmada hemorajik şoktaki sıçanda i.v. nikotin uygulamasının yaşama oranını artırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada kanamaya bağlı hipovolemik şokta nikotinin etkisinin kemoreseptör ve/veya baroreseptör mekanizmalar aracılığıyla olabileceği düşünülmüştür. Öte yandan köpeğe i.s.v. yoldan uygulanan asetilkolinin kan vazopresin düzeyinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (Rascol ve diğ., 1990). Bizim çalışmamızda ortaya çıkan sonuçlar da kolinomimetiklerin antişok etkilerinde nikotinik mekanizmalar aracılığıyla vazopresin salınımını olasılığını akla getirmektedir. Gerçekten de yapılan bir ön çalışmada hemorajik şoktaki sıçanlarda oksotremorinin plazma vazopresin seviyelerini

artırdığı görülmüştür (yayınlanmamış ön veriler). Daha ileri çalışmalarda bu santral nikotinik etki komponentinin vazopresin ile ilişkisinin araştırılması planlanmaktadır.

Üçüncü beyin ventrikülünün anteroventral bölümünde yer alan AV3V bölgesinin kolinomimetik maddelerin presör ve natriüretik etkilerinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Menani ve diğ. 1990; Colombari ve diğ., 1992; Vallado ve diğ., 1992). Bu nedenle AV3V bölgesi haraplanmış sıçanlarda oksotremorinin antişok etkisinin araştırılması planlanmıştır. Sonuçta, AV3V bölgesinin oksotremorinin gerek hipertansif, gerekse şoka bağlı mortaliteyi azaltıcı etkilerinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir.

SONUÇ:

a) Bu projenin amaçlarından biri kolinerjik hipertansiyonda rol oynayan muskarinik reseptör alttiplerini araştırmaktı. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, yukarıda sunulan sonuçlar, kolinomimetik maddelere bağlı olarak gözlenen hipertansif yanıtta santral sinir sisteminde bulunan ve presinaptik yerleşim gösteren M₂ muskarinik reseptörlerin modülatör rolü olduğunu göstermiştir.

b) Diğer bir amacımız, kolinomimetik maddelerin hemorajik şoktaki presör etkilerinde santral muskarinik reseptörlerin katılımını incelemektir. İlgili deneylerin sonuçları da yukarıda sunulmuştur. Kısaca, kolinomimetik ilaçlar, hemorajik şok oluşturulmuş sıçanlarda da, normotensif hayvanlardakine benzer şekilde, santral muskarinik reseptörler aracılığıyla kan basıncını artırmaktadırlar. Ancak hemorajik şoka bağlı ölüm oranını azaltıcı etkilerinde santral nikotinik reseptörler rol oynamaktadır.

c) Normotensif hayvanlarda kolinomimetik maddelerin presör etkilerinde AV3V bölgesinin önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Bu projede AV3V bölgesinin kolinomimetiklerin antişok etkilerinden de sorumlu olduğu gösterilmiştir.

d) Proje önerisinde sözü edilen ve ticari olarak satın alınması mümkün olmayan DKJ-21, BM-5, BoK-1, BR-370, v.b. santral muskarinik reseptör antagonistleri, ve norneostigmin, norpridostigmin gibi santral etkili antikolinesteraz maddeler ilgili araştırmacılarından istenmiş, ancak temin edilememiştir. Bu nedenle çalışmada bu maddeler kullanılamamıştır.

Bu çalışmada santral sinir sisteminde bulunan, gerek pre-gerekse postsinaptik M_2 -kolinoseptörlerin kolinerjik hipertansiyonda rolleri olduğu gösterilmiştir. Daha ileri çalışmalarla bu reseptörlerin santral sinir sistemindeki dağılımlarının incelenmesi ilginç olacaktır. Bu amaçla selektif muskarinik reseptör agonist ve/veya antagonistleri değişik beyin bölgelerine verilerek kardiyovasküler yanıtlar ve asetilkolin salıverilmesi izlenmelidir. Diğer taraftan hemorajik şok durumunda da santral muskarinik reseptörlerin kolinomimetiklere bağlı presör etkiye aracılık ettiği gösterilmekle birlikte, bu reseptörlerin alttipleri ve olası bölgeleri, yine selektif etkili maddeler kullanılarak incelenmelidir. Bu bölgelerden biri olarak karşımıza çıkan AV3V bölgesindeki muskarinik reseptör alttipleri de incelenmeye değer gibi görünmektedir. Kolinomimetik ilaçların hemorajik şoka bağlı mortaliteyi azaltıcı etkilerine aracılık etme olasılığı olan vazopresin salıverilmesinin, antişok etkiye katkısı da araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Aquilonius S.M., Sjöström R.S., Cholinergic and dopaminergic mechanisms in Huntington's chorea, *Life Sci.*, 10, 405, (1971).
- Barlow R.B., Berry K.J., Glenton P.A.M., Nikolaou N.M., Soh K.S., A comparison of affinity constants for muscarine-sensitive acetylcholine receptors in guinea-pig atrial pacemaker cells at 29° C and in ileum at 29° C and 37° C, *Br. J. Pharmacol.*, 58, 613, (1976).
- Bertolini A., Ferrari W., Guarini S., ACTH and centrally-acting cholinomimetic drugs improve survival of rats with severe hemorrhagic shock through distinct central cholinergic mechanisms, *Resuscitation*, 18, 289, (1989).
- Bonner T.I., Buckley N.J., Young A., Brann M.R., Identification of a family of muscarinic receptor genes, *Science* 237, 527, (1987).
- Brezenoff H.E., Centrally induced pressor responses to intravenous and intraventricular physostigmine evoked via different pathways, *Eur. J. Pharmacol.*, 23, 290, (1973).
- Brezenoff H.E., Rusin J., Brain acetylcholine mediates the hypertensive response to physostigmine in the rat, *Eur. J. Pharm.* 29, 262, (1974).
- Brezenoff H.E., Giuliano R., Cardiovascular control by cholinergic mechanisms in the central nervous system, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22, 341, (1982).
- Brezenoff H.E., Vargas H., Xiao Y.F., Blockade of brain M₂ muscarinic receptors lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats, *Pharmacology*, 36, 101, (1988).

- Buccafusco J.J., Brezenoff H.E., Pharmacological study of a cholinergic mechanism within the rat posterior hypothalamic nucleus which mediates a hypertensive response, *Brain Res.*, 165, 295, (1979).
- Collins J.A., Braitberg A., Margraf H.W., Butcher H.R., Hemorrhagic shock in rats, *Arch. Surg.*, 99, 484, (1969).
- Colombari D.S.D.A., Saad W.A., Arruda L.A.D.A., ve diğ., AV3V lesion impairs responses induced by cholinergic activation of SFO in rats, *Am. J. Physiol.*, 263, R1277, (1992).
- Criscidne L., Reis D.J., Talman W.T., Cholinergic mechanisms in the nucleus tractus solitarii and cardiovascular regulation in the rat, *Eur. J. Pharm.*, 88, 47, (1983).
- De Luca L.A., Franci C.R., Saad W.A., Camargo L.A.A., Antunes-Rodrigues J., Natriuresis induced by cholinergic stimulation of the locus coeruleus in the rat, *Physiol. Behav.*, 47, 605, (1990).
- Dirnhuber P., Cullumbine H., The effect of anti-cholinesterase agents on the rat's blood pressure, *Brit. J. Pharmacol.*, 10, 12, (1955).
- Dörje F., Friebe T., Tacke R., Mutschler E., Lambrecht G., Novel pharmacological profile of muscarinic receptors mediating contraction of the guinea-pig uterus, *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, 342, 284, (1990).
- Freeman H., Carmichael H.T., A pharmacodynamic study of the autonomic nervous system in normal men. The effects of intravenous injections of epinephrine, atropine, ergotamine and physostigmine upon the blood pressure and pulse rate, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 58, 409, (1936).

- Giachetti A., Micheletti R., Montagna E., Cardiosselective profile of AF-DX 116, a muscarine M₂ receptor antagonist, *Life Sci.*, 38, 1663, (1986).
- Giraldo E., Micheletti R., Montagna E., Giachetti A., Vigano M.A., Ladinsky H., Melchiorre C., Binding and functional characterization of the cardiosselective muscarinic antagonist methoctramine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 1016, (1988).
- Giuliano R., Ruggiero D.A., Morrison S., Ernsberger P., Reiss D.J., Cholinergic regulation of arterial pressure by the C1 area of the rostral ventrolateral medulla, *J. Neurosci.*, 9, 923, (1989).
- Goyal R.K., Muscarinic receptor subtypes. Physiology and clinical implications. *N. Engl. J. Med.*, 321, 1022,29 (1989).
- Guarini S., Tagliavini S., Ferrari W., Bertolini A., Reversal of hemorrhagic shock in rats by cholinomimetic drugs, *Br. J. Pharmacol.*, 98, 218, (1989).
- Guarini S., Tagliavini S., Bezzani C., Bertolini A., Ferrari W., Nicotine reverses hemorrhagic shock in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 343, 427, (1991).
- Hammer R., Berrie C., Birdsall N.J.M., Burgen A.S.V., Hulme E.C., Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors, *Nature*, 283,90-92 (1980).
- Haruta K., Iguchi A., Matsubara T., Itoh K., Che-Lang C., Yoshida S., Terada R., Kanashiro M., Suzuki O, Nishimura H., Sakamoto N., Stimulation of muscarinic cholinceptive neurons in the hippocampus evokes a pressor response with bradycardia. *Life Sci.* 50, 427, (1992).

- Kayaalp S.O., The action of tetrahydroaminacrine on the blood pressure of the rat, *Arch. int. Pharmacodyn.* 156, 446 (1965).
- Krstic M.K., Djurkovic D., Cardiovascular responses to injection of cholinomimetic drugs into the cerebral ventricles of unanesthetized dogs, *Brit. J. Pharmacol.* 17, 341 (1973).
- Kubo T., Tatsumi M., Increased pressor response to physostigmine in spontaneously hypertensive rats, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 306, 81, (1979).
- Kurtel H., Yeğen B.Ç., Dedeoğlu A., Ulusoy N.B., Oktay Ş., Muscarinic receptor subtypes of guinea-pig gallbladder smooth muscle, *Arch. int. Pharmacodyn.*, 308, 39, (1990).
- Levine R.R., Birdsall N.J.M., Subtypes of muscarinic receptors, *Trends Pharmacol. Sci.*, 10 (Suppl), (1989).
- Lazareno S., Buckley N.J., Roberts F.F., Characterization of muscarinic M₄ binding sites in rabbit lung, chicken heart and NG108-15 cells, *Mol. Pharmacol.* 38, 805, (1990).
- Makari N.F., Trimarchi G.R., Buccafusco J.J., Contribution of pre- and post-synaptic components to heightened central cholinergic activity in spontaneously hypertensive rats, *Neuropharmacology*, 28, 379 (1989).
- Menani J.V., Saad W.A., Camargo L.A.A., Renzi A., De Luca A.A., Colombari E., Anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbachol, *Neurosci. Lett.*, 113, 339, (1990).

- Michel A.D., Delmondo R., Stefanich E., Whiting R.L., Binding characteristics of the muscarinic receptor subtype of the NG108-15 cell line, *Nauny-Schmied. Arch. Pharmacol.*, 340, 62, (1989).
- Nattel S., Bayne L., Ruedy J., Physostigmine in coma due to drug overdose, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 25, 96, (1979).
- Nattie E.E., Li A., Ventral medulla sites of muscarinic receptor subtypes involved in cardiorespiratory control, *J. Appl. Physiol.*, 69, 33, (1990).
- Oktay Ş., İlhan M., Onur R., Kayaalp S.O., Antagonism of the hypertensive effect of physostigmine in anesthetized rat by morphine, *Arch. int. Pharmacodyn.* 271, 275, (1984).
- Ozawa H., Uematsu T., Centrally mediated cardiovascular effects of intracisternal application of carbachol in anesthetized rat, *Jap. J. Pharmacol.*, 26, 339, (1976).
- Özkutlu U., Alican İ., Karahan F., Onat F., Yeğen B.Ç., Ulusoy N.B., Oktay Ş., Are m-cholinoceptors of guinea-pig gallbladder smooth muscle of m_4 subtype? *Pharmacology*, 46, 308, (1993).
- Pellegrino L.J., Pellegrino A.S., Cushman A.J., A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain, Plenum Press, New York, (1986).
- Raiteri M., Leardi R., Marchi M., Heterogeneity of presynaptic muscarinic receptors regulating neurotransmitter release in the brain, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 228, 209, (1984).
- Richards M.H., Rat hippocampal muscarinic autoreceptors are similar to the M_2 (cardiac) subtype: comparison with hippocampal M_1 , atrial M_2 and ileal M_3 receptors, *Br. J. Pharmacol.*, 99, 753, (1990).

- Sanders B.J., Johnson A.K., Lesions of the anteroventral third ventricle prevent salt-induced hypertension in the borderline hypertensive rats, *Hypertension*, 14, 619, (1989).
- Schaumloffel V., Pugh V., Bealer S.L., Preoptic hypothalamic lesions reduce adrenergic vascular compensation during hemorrhagic shock, *Circ. Shock*, 31, 193, (1990).
- Scheucher A., Alvarez A.L., Torres N., Dabsys S.M., Finkielman S., Nahmod V.E., Pirola C.J., Cholinergic hyperactivity in the lateral septal area of spontaneously hypertensive rats: Depressor effect of hemicholium-3 and pirenzepine, *Neuropharmacology*, 30, 391, (1991).
- Semba K., Fibiger HC., Organization of central cholinergic systems, *Prog Brain Res.*, 79, 37, (1989).
- Sundaram K., Krieger K., Sapru H., M₂ muscarinic receptors mediate pressor responses to cholinergic agonists in the ventrolateral medullary pressor area, *Brain Res.*, 449, 141, (1988).
- Sundaram K., Murugaian J., Watson M., Sapru H., M₂ muscarinic receptor agonists produce hypotension and bradycardia when injected into the nucleus tractus solitarii, *Brain Reserach*, 477, 358, (1989).
- Tietje K.M., Goldman P.S., Nathanson N.M., Cloning and functional analysis of a gene encoding a novel muscarinic acetylcholine receptor expressed in chicken heart and brain, *J. Biol. Chem.*, 265, 2828, (1990).
- Vandekar M., Plestina R., Wilhelm K., Toxicity of carbamates for mammals, *Bull. WHO*, 44, 241, (1971).

Valladao A.S., Saad W.A., Camargo L.A.D.A., ve diğ., AV3V lesions reduces the pressor, dipsogenic, and natriuretic responses to ventromedial hypothalamus activation, Brain Res., 28, 909, (1992).

Varagic V., The action of eserine on the blood pressure of the rat, Brit. J. Pharmacol., 10, 349, (1955).

Waelbroeck M., Tastenoy M., Camus J., Christophe J., Binding of selective antagonists to muscarinic receptors (M_1 to M_4) in rat forebrain, Mol. Pharmacol., 38, 267, (1990).