

3161

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNTRASEREBROVENTRİKÜLER UYGULANAN
KARBAKOL'ÜN SIÇAN KAN GLUKOZ DÜZEYİNE ETKİSİ:
ETKİDEN SORUMLU MERKEZİ KOLİNERJİK
RESEPTÖRLERİN VE MUHTEMEL PERİFERİK
MEKANİZMALARIN TANIMLANMASI**

DR. M. SİBEL GÜRÜN

UZMANLIK TEZİ

BURSA 1993

TEŞEKKÜR

Eđitimimde ve tezimi hazırlamamda, bilgi ve deneyimleri ile bana büyük katkılarda bulunan Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Dr. Burhan K. Kıran, Dr. İsmail H. Ulus, Dr. Levent R. Büyükuysal'a, řu anda yurt dışında bulunan arkadaşım Dr. Vahide Savcı'ya, tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve Farmakoloji Anabilim Dalı personeline teşekkür ederim.

T.C. YÜKSEKÖRETİM KURULU
DÖNÜŐANTASTIĐI

31619

İÇİNDEKİLER

SAYFA

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
GEREÇ VE YÖNTEM	9
BULGULAR	15
TARTIŞMA	28
ÖZET	33
KAYNAKLAR	34

GİRİŞ VE AMAÇ

İlk olarak Claude Bernard 1854'de, sıçanların dördüncü ventriküllerinin tabanına iğne ile dokunmanın hiperglisemi meydana getirdiğini gözlemiştir. Bu ilginç gözlemden sonra yapılan araştırmalar sayesinde santral sinir sisteminde bulunan birçok nörotransmitter ve nöropeptidin, kan glukoz seviyesinin kontrolünde rolü olduğu anlaşılmıştır (*Benzo, 1983; Sasaki ve ark., 1988*). Santral sinir sisteminde kolinerjik sinir uçlarından salınan asetilkolin (ACh), periferik glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan önemli nörotransmitterlerden birisidir (*Korner ve Ramu, 1975, 1976; Iguchi ve ark., 1986*). Kolinerjik agonist olan karbakol'ün veya asetilkolinesteraz inhibitörü olan neostigmin veya malathion'un merkezi yolla uygulanması, kan glukoz düzeylerini arttırmaktadır (*Korner ve Ramu, 1975, 1976; Iguchi ve ark., 1985, 1986, 1988; Migliorini ve ark., 1989; Honmura ve ark., 1992*). Bizim laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada da, kolinerjik sinir uçlarından ACh sentez ve salıverilmesini arttıran kolin'in intraserebroventriküler (ICV) yolla uygulanması hiperglisemi meydana getirmiştir (*Ulus ve Gürün, basılmamış gözlem*).

Karbakol veya neostigmin'in hiperglisemik etkileri, kolinerjik muskarinik reseptör antagonisti olan atropin'in merkezi yolla uygulanması ile önlenmektedir (*Korner ve Ramu, 1975; Iguchi ve ark., 1985, 1986, 1990*). Merkezi kolinerjik sistemin uyarılmasının neden olduğu kan glukoz düzeylerindeki artmadan genel olarak muskarinik kolinerjik reseptörlerin sorumlu olduğu ifade edilmekle birlikte, bu etkiden sorumlu muskarinik reseptör alt tipleri belli değildir.

Periferik glukoz metabolizmasının kontrolünde rol oynayan başlıca faktörler olan; adrenal medulladan salınan katekolaminler ile endokrin pankreasdan salınan insülin ve glukagon'un, merkezi yolla uygulanan kolinerjik maddelerin meydana getirdiği hiperglisemideki muhtemel rolleri tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. ICV yolla uygulanan neostigmin sıçanlarda kan glukoz düzeyleri ile birlikte, plazma glukagon, adrenalın ve noradrenalin düzeylerini yükseltirken, insülin seviyesini değiştirmemektedir (*Iguchi ve ark., 1988; Gotoh ve ark., 1989*). Adrenalektomi uygulanmış sıçanlarda, neostigmin'in neden olduğu kan glukoz düzeyindeki artış ortadan kalkmaktadır. Bu nedenle merkezi yolla uygulanan neostigmin'in hiperglisemik etkisine,

büyük oranda sempato-adrenal sistemin aracılık ettiği düşünülmektedir (*Iguchi ve ark., 1988; Gotoh ve ark., 1989*). ICV yolla uygulanan karbakol'ün neden olduğu kan glukoz düzeyindeki artışta ise, sempato-adrenal sistemin rolü ile ilgili çelişkili bilgiler bulunmaktadır (*Komer ve Ramu, 1975; Iguchi ve ark., 1985*). Komer ve Ramu'nun çalışmasında; ICV uygulanan karbakol'ün hiperglisemik etkisi, merkezi yolla uygulanan atropin ön tedavisi ile bloke olurken, adrenalectomi, rezerpin ön tedavisi veya hipofizektomi ile ortadan kaldırılamamaktadır. Bu nedenle, karbakol'ün söz konusu etkisine merkezi muskarinik reseptörlerin stimülasyonu ile tanımlanmamış birtakım humoral faktörlerin aracılık edebileceği sonucuna varılmaktadır (*Komer ve Ramu, 1975*). *Iguchi ve arkadaşlarının* çalışmasında ise; ICV yolla uygulanan karbakol'ün hiperglisemik etkisi, atropin (ICV) ön tedavisi veya adrenalectomi ile tamamen bloke olduğu için karbakol'ün hiperglisemik etkisine, sempato-adrenal sistem aktivasyonunun aracılık ettiği öne sürülmektedir (*Iguchi ve ark., 1989*).

Bu tezdeki çalışmalarda, ICV yolla uygulanan karbakol'ün kan glukoz seviyesine etkisi ve etkiden sorumlu reseptör alt tiplerinin sınıflandırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın diğer amacı ise, ICV yolla uygulanan karbakol'ün hiperglisemik etkisinde sempato-adrenal sistemin ve endokrin pankreas hormonlarının rolünü aydınlatmaktır.

Kan glukoz seviyesinin düzenlenmesinde rolü olan başlıca periferik mekanizmalar (karaciğer ve endokrin pankreasın otonomik innervasyonu ve katekolaminler) ve muskarinik reseptör alt tipleri ile ilgili ayrıntılı bilgi "Genel Bilgiler" bölümünde verilmiştir.

GENEL BİLGİLER

Metabolizmada karbonhidratların başlıca fonksiyonu yakıt olarak okside olmak ve diğer metabolik olaylar için enerji sağlamaktır. Hücreler tarafından başlıca kullanılan karbonhidrat glukozdur (*Mathews ve von Holde, 1990; Newsholme ve Leach, 1991*). Kan glukozu, diyetle alınan karbonhidratların sindirilmesi, karbonhidrat olmayan kaynaklardan glukoz oluşturulması (glukoneogenez) ve karaciğerde depo edilmiş glikojenin yıkılması (glikojenoliz) ile sağlanır (*Mathews ve von Holde, 1990; Newsholme ve Leach, 1991*).

Kanda kararlı glukoz düzeylerinin sürdürülmesi, özellikle santral sinir sisteminin normal fonksiyonlarının devamı açısından önemlidir (*Cryer ve Gerich, 1985*). Genel olarak kan glukoz seviyelerinin kontrolünde karaciğerin ve ekstrahepatik dokuların yanısıra hormonların ve glukoregülasyon ile direk ilişkisi olan organların otonomik innervasyonunun da önemli rol oynadıkları tanımlanmıştır (*Nijima, 1989; Yamaguchi, 1991*).

GLUKOREGÜLASYONDA ROL OYNAYAN BAŞLICA HORMONLAR

1.) Endokrin pankreasdan salınan hormonlar: Pankreasın endokrin fonksiyonları, pankreas dokusunun %1'ni oluşturan hücre kümelerinden oluşmuş Langerhans adacıklarında lokalizedir (*Lacy, 1967; Woods ve Porte, 1974; Miller, 1981*). Langerhans adacıkları, endokrin hücrelerin fonksiyonel olarak tanımlanmış 4 tipinden oluşmuş kompleks bir ünitidir (*Lacy, 1967; Woods ve Porte, 1974; Miller, 1981*). A hücrelerinde glukagon, B hücrelerinde insülin, F hücrelerinde pankreatik polipeptidler ve D hücrelerinde somatostatin sentez edilir (*Smith ve Davis, 1983*). Bunlardan glukagon ve insülin glukoz homeostazisinin düzenlenmesinde rol oynarlar (*Hems ve Whitton, 1980; Sacca, 1987*).

Glukagon, molekül ağırlığı 3485 olan, 29 amino asit dizisinden oluşmuş bir polipeptiddir (*Newsholme ve Leach, 1991*). Glukagon yapımında rol alan pankreatik endokrin A hücreleri, kan glukoz konsantrasyonlarına çok duyarlıdır. Azalmış glukoz seviyelerine cevap olarak bu hücrelerde glukagon sentez ve saliverilmesi artar (*Gerich, 1988*). Glukagon için asıl hedef organ karaciğerdir ve en önemli etkisi karaciğer hücrelerinde spesifik membran reseptörlerine bağlanarak adenilat siklazı aktive etmesidir (*Hems ve Whitton, 1980*). Adenilat siklaz hücre içi

çembersel AMP (çAMP) düzeylerini artırır. çAMP, kendisine bağlı olan protein kinazları uyararak glikojen yıkımında rol alan fosforilazların fosforile ve aktive olmasına neden olur. Sonuç olarak glikojen yıkımı artarken, glikojen sentezi inhibe edilir ve karaciğerden glukoz çıkışı artırılır (*Hems ve Whitton, 1980*). Glukagon ayrıca glukoneogenezi ve yağ dokusunda lipidlerin parçalanmasını artırır (*Sacca, 1987; Gerich, 1988*).

İnsülin, glukozun hücre içine girmesini ve kullanılmasını artıran en önemli hormondur. Molekül ağırlığı 5734 olan insülin, 51 amino asit dizisinden oluşmuş bir polipeptiddir (*Mathews ve von Holde, 1990*). Kanda glukoz düzeyinin artması, insülin'in sentez ve sekresyonunu artırır. Doğrudan vena porta içine sekrete edilen insülin karaciğerde glikojenoliz ve glukoneogezi inhibe ederken, glikojen sentezini ve glukoz yıkımını artırır (*Hems ve Whitton, 1980*). İnsülin'in glikojenolizi inhibe edici etkisi kısmen glukagon'un neden olduğu hücre içi çAMP düzeylerindeki artışı inhibe etmesine bağlıdır (*Hems ve Whitton, 1980*). İnsülin ayrıca, kas ve yağ dokusunda glukoz ve amino asitlerin hücre membranlarından transportunu kolaylaştırır. Kas dokusunda protein yıkımının azalmasına, sentezinin ise artmasına neden olurken, yağ dokusunda glukagon ve adrenalinin etkisi ile artmış olan yağ asitlerinin serbestleştirilmesini önler (*Cherrington ve ark. 1987*).

2.) Katekolaminler: Adrenal medulla bir sempato-endokrin organdır. Embriyolojik olarak bir sempatik ganglion, fonksiyonel olarak ise periferel sempatetik nöro-effektör sistemin integral bir komponenti olarak düşünülebilir (*Cryer, 1980*). Adrenalin geleneksel anlayışa göre bir hormondur ve adrenal medullada yer alan kromaffin hücreler tarafından sentez ve sekrete edilerek hedef hücrelere taşınır (*Ungar ve Phillips, 1983; Winkler ve ark., 1986; Esler ve ark., 1990*). Noradrenalin ise, bir nörotransmitterdir ve büyük oranda sempatetik postganglionik nöronların akson uçları tarafından sentez edilir ve bu sinirlerin uyarılması ile salıverilir (*Ungar ve Phillips, 1983; Winkler ve ark., 1986; Esler ve ark., 1990*).

Katekolaminler'in glukoregülasyonda önemli rolleri vardır. Kan glukoz seviyesi azaldığı zaman, adrenal medulladan salınan katekolaminler karbonhidrat metabolizmasını hem direk olarak etkiler, hem de endokrin pankreasdan salınan insülin ve glukagon gibi glukoregülatuar

hormonların sekresyonlarında değişiklik meydana getirerek indirek olarak etkiler (*Cryer, 1980; Hems ve Whitton, 1980*). Katekolaminler kas dokusu ve karaciğerde glikojenolizi arttırırken, glikojen sentezini inhibe ederler. Ayrıca kas dokusu tarafından glukoz kullanımını azaltırken, yağ dokusundan serbest yağ asitleri ve gliserolü mobilize ederler (*Cryer, 1980; Hems ve Whitton, 1980*).

HEPATİK GLUKOZ METABOLİZMASINDA SEMPATETİK VE PARASEMPATETİK SİSTEMİN ROLÜ

Karaciğer sempatetik ve parasempatetik sinirlerle zengin şekilde innerve edilmiştir. Bu sinirlerin her ikisi de karaciğerin metabolik fonksiyonu için önemlidir (*Sawchenko ve Friedman, 1979*). Sempatetik sinirler, splanknik sinirden ve Çölyak gangliondan kökenini alan postganglionik liflerden, parasempatetik sinirler ise vagal sinirden gelirler (*Sawchenko ve Friedman, 1979; Nijima, 1983, 1989*). Ayrıca vagal sinirin glukozu sensitif afferent lifleri, karaciğerin sensory fonksiyonları için önemlidir (*Nijima, 1983, 1989*).

Hepatik sempatetik sinirlerin uyarılması, glikojenolitik enzimlerin aktivitesini arttırır. Bu da karaciğerden glukoz çıkışının artması ile sonuçlanır (*Lautt ve ark., 1979a; Jarhult ve ark., 1980*). Sempatetik sinirlerin stimölasyonu ile oluşturulmuş glikojenolizde rol alan adrenerjik nörotransmitter noradrenalindir (*Yamaguchi, 1991*). Karaciğerde katekolaminlerin neden olduğu bu etkide hem α , hem de β adreno reseptörlerin rolü vardır (*Hems ve Whitton, 1980; Kunos, 1984*). Bunlardan β adrenerjik reseptörler, membranda bulunan adenilat siklaz enzimi ile bağlantılıdır ve bu reseptörlerin uyarılması hücre içinde ikinci haberci olan çAMP'nin artışına yol açmaktadır. çAMP düzeyindeki yükselme, bu enzime bağımlı protein kinazların artışına yol açarak glikojenolizin regölasyonunda rol oynayan birçok intrasellüler enzimi fosforile eder (*Hems ve Whitton, 1980; Leach ve ark., 1986; Essler ve ark., 1990*). α_1 adrenerjik reseptörlerin aracılığı ile olan glikojenolizde başlıca mekanizma inositoltrifosfat'ın (IP_3) etkisi ile sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun artmasıdır (*Hems ve Whitton, 1980*). Sempatetik sinirlerin stimölasyonu ile oluşturulmuş glikojenolitik cevaba α_1 adreno reseptörler (*Yamaguchi, 1991*),

dolaşımda artmış olan katekolaminlerin meydana getirdiği glikojenolitik cevaba ise muhtemelen hem α hem de β reseptörler aracılık etmektedir (*Yamaguchi, 1991*).

Hepatik parasempatetik sinirlerin uyarılması karaciğerde glikojen sentez eden enzimlerin aktivitesini arttırarak glukoz çıkışını azaltır (*Boyle ve ark., 1988*). Parasempatetik sinirlerin bu etkisine muskarinik kolinerjik reseptörler aracılık etmektedir. Çünkü vagal sinirin uyarılmasının meydana getirdiği etki, atropin ön tedavisi ile önlenmektedir (*Boyle ve ark., 1988*). Muskarinik kolinerjik etkinin sonuçları, sempatetik sinirlerin hakim rolü nedeni ile maskelenmiştir. Hepatik sinir stimülasyonu glukoz çıkışında artma ile sonuçlanır (*Boyle ve ark., 1988*). Hepatik glukoregülasyonunun nöral kontrolünde parasempatetik sistemin rolü, insanlarda son dönemlerde gösterilmiştir. Bu konuda başka çalışmalara da ihtiyaç olmakla birlikte, Diabetes Mellitus'lu hastalardaki şiddetli hepatik glukoz üretimi üzerine parasempatetik nöropatinin de katkısı olabileceği düşünülmektedir (*Lautt ve ark., 1979; Boyle ve ark., 1988*).

PANKREASIN SEMPATETİK VE PARASEMPATETİK İNNERVASYONUNUN GLUKOZ METABOLİZMASINA ETKİSİ

Pankreası innerve eden başlıca sempatetik sinirler Çölyak ganglion splanknik sinirlerden, parasempatetik sinirler ise vagus yolu ile gelirler (*Woods ve Porte, 1974; Miller, 1981; Smith ve Davis 1983*). Langerhans adacıklarının değişik sellüler elementlerinde peptiderjik, kolinerjik ve noradrenerjik sinir terminalleri mevcuttur (*Woods ve Porte, 1974; Miller, 1981; Smith ve Davis, 1983*). Pankreas aynı zamanda vagus ve splanknik sinirlerin her ikisi ile de gelen, afferent sensory nöronlar tarafından da uyarılır (*Woods ve Porte, 1974; Miller, 1981; Smith ve Davis, 1983*). Otonomik sinir sisteminin, pankreatik endokrin fonksiyonunda rol oynadığı çok iyi bilinmektedir. Splanchnik sinirin elektrik ile stimülasyonu bazal ve glukoz ile uyarılmış insülin sekresyonu bir çok türde azaltır (*Bloom ve Edvars, 1984; Bloom ve ark., 1984; Ahren ve ark., 1987; Dunnig ve ark., 1988*). İnsülin sekresyonunda rol alan adrenerjik reseptör mekanizmaları oldukça kompleksdir. Deneysel koşullara ve türlere bağlı olarak değişebilmektedir. Bununla birlikte insülin sentez ve salıverilmesinde rolü olan pankreatik B hücrelerinin hem α , hem de β adrenoreseptörlere sahip olduğu genel olarak kabul edilmiştir (*Yamaguchi, 1991*). İnsülin

sekresyonu üzerine α reseptörlerin inhibitör, β reseptörlerin ise stimülatör etkileri vardır (Ahren ve ark., 1984; John ve ark., 1990). Dolaşımda artmış olan adrenalin, B hücrelerindeki postsinaptik α_2 adrenoreseptörler aracılığı ile insülin sekresyonunu inhibe eder (Angel ve Langer, 1988; John ve ark., 1990). İnsülin sekresyonunun kontrolünde rol alan α adrenoreseptörlerin α_{2A} alt tipi olabileceği ifade edilmiştir (Niddam ve ark., 1990). İnsülin sekresyonunun düzenlenmesinde parasempatetik sistemin de rolü olduğu bilinmektedir. Çeşitli türlerde yapılan çalışmalarda vagal stimülasyonun, pankreatik B hücreleri üzerinde bulunan muskarinik kolinerjik reseptörler aracılığı ile insülin sekresyonunda artma meydana getirdiği gösterilmiştir (Kaneto ve ark., 1968; Honey ve Weir, 1980; Lundquist, 1982; Berthoud ve ark., 1983; Lee ve Miller, 1985; Ahren ve Taborsky, 1986).

Pankreası uyaran sempatetik sinirlerin stimülasyonu glukagonun da bazal sekresyonunu artırır (Woods ve Porte, 1974; Miller, 1981; Ahren ve ark., 1987). Bu olaydan sorumlu olan reseptörleri ortaya çıkarmak amacı ile yapılan çalışmalarda, pankreatik A hücrelerinin hem α hem de β adrenerjik reseptörlere sahip olduğu ve bu reseptörlerin her ikisinin de uyarılmasının glukagon sekresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Miller, 1981). Bu adrenerjik reseptörlerin glukagon sekresyonundan sorumlu olan muhtemel alt tipleri α_2 ve β_2 reseptörlerdir (Iguchi ve ark., 1989; Blazquez ve Munoz, 1990; Oda ve ark., 1990; Hirose ve ark., 1992). Vagal sinirin stimülasyonu ise, insülin sekresyonunda olduğu gibi, pankreatik A hücreleri üzerinde yer alan muskarinik reseptörler aracılığı ile glukagon sekresyonunu artırır (Honey ve Weir, 1980; Ahren ve Taborsky, 1986).

MUSKARİNİK RESEPTÖRLERİN SINIFLANDIRILMASI

Muskarinik ve nikotinik asetilkolin reseptörleri ilk olarak 1914'de Sir Henri Dale tarafından tanımlanmıştır. Bu tanımlamaya göre, muskarinik reseptörler muskarin ile selektif olarak aktive, atropin ile de bloke edilebilen reseptörlerdir (Birsdall ve Hulme, 1983; Hulme ve ark., 1990). Bu tanımlama halen geçerliliğini korumakla birlikte, yeni ilaçların bulunması, reseptör bağlama tekniklerinin ilerlemesi ve moleküler biyolojide elde edilen gelişmeler sayesinde, muskarinik reseptörlerin bazı alt tipleri olduğu anlaşılmıştır (Sokolowsky, 1989;

Birsdall ve Hulme, 1989, 1989). Başlangıçta pirenzepin ve AF-DX 116 ile yapılan çalışmalar, muskarinik reseptörlerin M_1 ve M_2 olmak üzere iki alt grubu olduğunu ortaya çıkarmıştır (*Burke, 1986; Giachetti ve ark., 1986; 1986; Hammer ve ark., 1986*). Önceleri M_2 reseptörler kardiyak ve glandular olmak üzere iki alt tipe ayrılmış, daha sonra bu tanımlamadan vazgeçilmiştir (*London, 1986; Giraldo ve ark., 1987; Delmundo ve ark., 1989*). Seçici agonist ve antagonistler ile yapılan in vivo ve in vitro çalışmalara dayanarak, muskarinik kolinerjik reseptörlerin bugün en az 3 alt tipi olduğu kabul edilmiştir (*Sokolowsky, 1989; Birsdall ve ark., 1989; Birsdall ve Hulme, 1989; Buckley, 1990*). Muskarinik M_1 reseptörleri pirenzepin, M_2 reseptörleri AF-DX 116 ve metoktramin için yüksek affinite gösteren reseptörlerdir (*Burke, 1986; Melchiorre ve ark., 1987; Schulte ve ark., 1991; Receptor nomenclature Supplement, 1993*). M_3 reseptörler HHSiD (hekzahidrosila difenidol) için yüksek affinite gösteren reseptörlerdir (*Kilbinger ve ark., 1991; Receptor Nomenclature Supplement, 1993*). 4-DAMP hem M_1 hem de M_3 reseptörlere yüksek affinite gösterir (*Doods ve ark., 1987; Barlow ve ark., 1991*). Muskarinik reseptörlerin sınıflandırılması için yapılan bu tanımlamalar, farmakolojik tanımlamalardır. Moleküler biyolojik tekniklerden elde edilen sonuçlara göre ise, muskarinik reseptörler amino asit dizilişlerine göre m_1 , m_2 , m_3 , m_4 ve m_5 olmak üzere 5 alt tipe ayrılmışlardır (*Buckley, 1990; Schwartz ve ark., 1993*).

GEREÇ VE YÖNTEM

Genel: Çalışmada, 250-300g ağırlığında dişi, Wistar türü sıçanlar (Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Bursa) kullanıldı. Sıçanlar çalışmadan bir gün önce merkezden alınarak sıcaklığı (18-24 °C) ve ışığı (12 saat karanlık, 12 saat aydınlık) kontrollü odada, 4-6 kadar bir kafesde olacak şekilde, su ve yem alımları serbest bırakılarak bakıldılar.

Cerrahi ve deneysel işlemler: Eter anestezisi altında, sıçanların sol karotis arterine heparinli tuzlu su (250 Ü/ml) ile doldurulmuş kateter (PE 50) yerleştirildi. ICV karbakol enjeksiyonu için, kafatasına orta hattın 1.5 mm kadar sağ yanında ve bregmanın 1-1.5 mm kadar arkasında olacak şekilde, bir delik açıldı. Bu delikten sağ yan ventriküle 10 mm kadar uzunluktaki bir zerk kanülü (20 numara hipodermik paslanmaz çelik iğneden kesilerek hazırlanmış) yerleştirildi. Kanülün alt ucu, kafatası yüzeyinden 4-4.5 mm kadar derinliğe inecek şekilde ve dik olarak yerleştirildi. Üstte kalan kısım, dışı akriliği ile kafatasına tutturuldu. Bazı çalışmalarda intravenöz (İV) ilaç enjeksiyonu için, sıçanların sol juguler venine de kanül (PE 10) yerleştirildi. Intraperitoneal (İP) ilaç enjeksiyonları sıçanların, arka ekstremitelerinin hizasından periton içine yapıldı. Bir grup sıçanda da bu işlemlere ek olarak, adrenalectomi (ADK) yapıldı. Abdomen önce orta hattın sol tarafından yapılan bir insizyon ile açıldı. Sol adrenal iki başlı redüktörlerle ortaya çıkarıldı. Mide, barsaklar ve karaciğer, tuzlu su ile ıslatılmış bir gazlı bez ile, çalışılan yönün ters tarafına itildi. İnce, künt uçlu pensler yardımı ile adrenal gland çıkarıldı ve o bölgeye 2 dakika kadar tampon yapılarak kanama önlendi. Aynı işlem daha sonra sağ tarafta gerçekleştirildi. İnsizyon hattı dikilerek işlem tamamlandı. Kontrol adrenalectomi (Sham) çalışması için, cerrahi işlemler aynı sırayla, adrenaller çıkarılmadan tekrarlandı.

Cerrahi işlemlerin bitiminde sıçanlar tek tek kutulara yerleştirilerek anesteziden çıkmaları için 2.5-3 saat kadar beklendi.

Birinci seri çalışmada, sıçanların deney öncesi kontrol kan glukoz düzeylerini saptamak için, anestezinin etkisinden çıktıktan sonra arteriyel kanülden kan örnekleri alındı. Daha sonra, karbakolün kan glukoz düzeylerine etkisi ve etkide aracılık eden reseptörler araştırıldı. Bu

amaçla ilk olarak değişen dozlarda karbakol (2.5, 5, 10 µg) veya tuzlu su (10 µl) ICV yolla enjekte edildi. Tuzlu su veya karbakol enjeksiyonundan sonra 15, 30, 60 ve 120. dakikalarda arteryel kanülden, 0.5 ml hacmindeki konik eppendorf tüplere yaklaşık 100 µl kan alındı. Karbakol'ün kan glukozuna etkisinde aracılık eden kolinerjik reseptörleri saptamak amacı ile, atropin (10 µg) veya mekamilamin (50 µg) ICV yolla zerk edildi. Enjeksiyondan 15 dakika sonra karbakol (10 µg; ICV) veya tuzlu su (ICV) zerk edildi. Karbakol veya tuzlu su enjeksiyonundan sonra 15, 30 ve 60. dakikalarda kan glukoz düzeyinin ölçümü için kan alındı. Muskarinik reseptör antagonistlerinin, karbakol'ün neden olduğu hiperglisemideki etkilerini araştırmak amacı ile, pirenzepin (10, 25, 50, 100 µg), 4-DAMP (10 µg), metoktramin (10, 25, 50 µg), AF-DX 116 (20, 40, 100 µg) ve HHSiD (heksa-hidro-sila-difenidol) (10, 20, 50, 100 µg) ICV yolla enjekte edildiler. Enjeksiyondan 15 dakika sonra karbakol (10 µg;ICV) veya tuzlu su (ICV) zerk edildi. Karbakol veya tuzlu su enjeksiyonundan sonra 15, 30, 60. dakikalarda kan glukoz ölçümü için arteryel kanülden kan örnekleri alındı.

İkinci seri çalışmada, ICV yolla uygulanan karbakol'ün plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine etkisi ve etkide aracılık eden reseptörler araştırıldı. Bu amaçla ilk olarak ICV yolla tuzlu su enjeksiyonundan sonra değişen dozlarda karbakol (1, 5, 10 µg) veya tuzlu su ICV yolla zerk edildi. Karbakol veya tuzlu su enjeksiyonundan 15, 30 ve 60 dakika sonra arteryel kanülden plazma glukagon ve serum insülin düzeylerinin ölçümü için kan alındı. Bu çalışmalarda her zaman aralığı için, ayrı grup hayvan kullanıldı. ICV yolla uygulanan karbakol'ün (10 µg), plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine etkisinde aracılık eden kolinerjik reseptör ve reseptör alt tiplerini test etmek amacı ile karbakol veya tuzlu su enjeksiyonundan 15 dakika önce atropin (10 µg), mekamilamin (50 µg), pirenzepin (25 µg), 4-DAMP (10 µg), AF-DX 116 (20 µg) veya tuzlu su ICV yolla zerk edildi. Karbakol enjeksiyonundan sonra 30. dakikada arteryel kanülden alınan kan örneklerine plazma glukagon ve serum insülin düzeyleri ölçüldü.

Üçüncü seri çalışmada, ICV yolla uygulanan karbakol'ün kan glukoz, plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine etkisinde sempato-adrenal sistemin aracılığı test edildi. İlk olarak karbakol (10 µg;ICV) enjeksiyonundan sonra 30. dakikada arteryel kanülden alınan kanda

plazma katekolamin düzeyleri ölçüldü. Karbakol'ün plazma katekolamin düzeylerine etkisinde aracılık eden muskarinik reseptörleri test etmek için de, atropin (10 µg;ICV) zerkinden 15 dakika sonra karbakol (10 µg;) veya tuzlu su ICV yolla enjekte edildi. 30. dakikada alınan kanda plazma katekolamin düzeyi ölçüldü. Daha sonra bir grup sıçana iki taraflı olarak cerrahi adrenalectomi uygulandı. Bu sıçanların bir grubuna tuzlu su, diğer grubuna ise karbakol (10 µg) ICV yolla zerk edildi. 30 dakika sonra alınan kan örneklerinden glukoz, plazma glukagon ve serum insülin düzeyleri ölçüldü. Çalışmada cerrahi girişimin etkisini test etmek için, taklit (sham) operasyon uygulanmış (adrenalleri yerinde bırakılmış) sıçanlarda benzer işlemler tekrarlandı

Dördüncü seri çalışmada, karbakol'ün kan glukoz, plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine olan etkisine aracılık eden periferik adrenerjik reseptörleri test etmek amacı ile, ICV yolla karbakol (10 µg) veya tuzlu su enjeksiyonundan 15 dakika önce, nonselektif β adrenerjik reseptör antagonisti propranolol (0.5 mg/kg), selektif α₁ adrenerjik reseptör antagonisti prazosin (0.3 mg/kg) veya selektif α₂ adrenerjik reseptör antagonisti yohimbin (0.5 mg/kg) İP yolla uygulandı. Karbakol veya tuzlu su enjeksiyonundan 30 dakika sonra arteryel kanülden alınan kan örneklerinde glukoz, glukagon ve insülin düzeyleri ölçüldü.

Kan glukoz düzeyinin ölçülmesi: Enjeksiyonlardan sonra uygun zaman aralıklarında arteryel kanülden eppendorf tüplere alınan 100 µl kan, santrifüje edildi (oda ısısında; 48g; 5 dakika). Elde edilen serumlardaki glukoz düzeyleri, ticari olarak bulunabilen kit (Biotrol, Fransa) kullanılarak, "Glukoz oksidaz" metoduyla kolorimetrik olarak ölçüldü. Kullanılan yöntemin esası, serumda bulunan glukozun ilk önce oksijen ve glukoz oksidaz enzimi aracılığı ile glukonik asit ve hidrojen peroksida çevrilmesidir. Meydana gelen hidrojen peroksid; fenol, amino-4-antipirin ve peroksidaz enzimi yardımı ile renkli bileşiklere dönüştürülmektedir. Ölçüm için 10 µl serum kullanıldı. Serum ve standart (100 mg/dl) bulunan tüplerin üzerine, amino-4-antipirin, glukoz oksidaz, peroksidaz, fosfat ve fenol içeren solüsyondan 1ml eklendi. Takiben 15 dakika 37 °C su banyosunda inkübe edilen örneklerin optik dansiteleri, spektrofotometrede (Vitatron, Hollanda), 492 nm dalga boyunda okutuldu. Ölçümler çalışmalar ile aynı günde yapılmıştır.

Plazma glukagon düzeyinin ölçülmesi: Plazma glukagon düzeyinin ölçümü için arterdeki kanülden, içinde 2 mg EDTA ve 50 µl Trasyolol (500 Ü Kallikrein inhibitörü) bulunan soğutulmuş cam tüplere yaklaşık 0.5 ml kan alındı. Alınan kan örneği soğutmalı santrifüjde çevrildi (+4 °C; 2000 g; 15 dakika). Plazmaları ayrılarak, ölçüm gününe kadar, -20 °C derin dondurucuda saklandı. Plazma glukagon düzeyi, ticari olarak bulunabilen kit (DPC, ABD, Biobak, Bursa, Türkiye) kullanılarak, radioimmunoassay (RIA) ile ölçüldü (kullanılan insan kitindeki antikorlar, sıçan glukagonu ile %90 çapraz reaksiyon vermektedir, sonuçlar düzeltilmeden verilmiştir). Kullanılan ölçüm yönteminde, 200 µl plazma, blank ve standart içeren tüplerin üzerine 100 µl glukagon antiserumu eklendikten sonra tüpler, 2-8 °C'de 24 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda 100 µl I¹²⁵ ile işaretlenmiş glukagon eklenen tüpler, 2-8 °C'de 24 saat süre ile ikinci bir inkübasyona bırakıldı. Takiben tüplerin üzerlerine 1 ml çöktürücü solüsyon eklenerek, santrifüje edildikten sonra (15 dakika; 1500 g), üstte kalan sıvı kısmı (süpernatant) aspire edildi ve oto-gama skintillasyon spektrometresinde (Packard, Cobra, Auto-Gamma Scintillation Analyzer, ABD) radyoaktivite ölçüldü. Çalışmada belirtilen plazma glukagon düzeyi, plazma immünoreaktif glukagon düzeyidir.

Serum insülin düzeyinin ölçülmesi: Serum insülin düzeyinin ölçümü için, arterdeki kanülden polipropilen tüplere yaklaşık 0.5 ml kan alındı. Alınan kan örneği soğutmalı santrifüjde çevrildi (+4 °C; 2000 g; 15 dakika). Serumları ayrılarak, ölçüm gününe kadar, -20 °C derin dondurucuda saklandı. Serum insülin düzeyi, ticari olarak bulunabilen kit (DPC, ABD, Biobak, Bursa, Türkiye) kullanılarak, RIA ile ölçüldü (kullanılan insan kitindeki antikorlar, sıçan insülini ile %90 çapraz reaksiyon vermektedir, sonuçlar düzeltilmeden verilmiştir). Kullanılan ölçüm yönteminde, insülin antikoruna bağlanmış polipropilen tüplere 200 µl serum, blank ve standart eklendi. Takiben I¹²⁵ ile işaretlenmiş insülinden 1 ml eklenen tüpler, 18-24 saat süre ile oda ısısında inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, tüplerdeki süpernatant aspire edildi ve oto-gama skintillasyon spektrometresinde (Packard, Cobra, Auto-Gamma Scintillation Analyzer, ABD) radyoaktivite ölçüldü. Çalışmada belirtilen serum insülin düzeyi, plazma immünoreaktif insülin düzeyidir.

Plazma katekolamin düzeyinin ölçülmesi: Plazma katekolamin düzeylerinin ölçüldüğü çalışmada, arterdeki kanülden soğutulmuş ve içinde EGTA (90mg/2ml) + Glutasyon (60mg/ml) solüsyonundan 10 µl bulunan eppendorf tüplere 200 µl kan alındı. Alınan kan örnekleri süratle santrifüje edildiler (+4 °C; 2000 g; 15 dakika). Plazmalar ayrılarak ölçüm gününe kadar, - 20 °C derin dondurucuda saklandılar. Plazma katekolamin düzeyleri, ticari olarak bulunabilen Catecholamine Research Assay System kiti (Amersham, UK, Nükleer Anonim Şirketi, Ankara, Türkiye) kullanılarak ölçüldü.

Kullanılan radyoenzimatik yöntemin esası plazma içerisinde bulunan adrenalin, noradrenalin ve dopamini, COMT (Catechol-o-metiltransferaz) ve ³H-SAM (tirityum ile işaretlenmiş S-Adenosyl-L-methionin) yardımı ile radyoaktif olarak işaretli metoksi ürünlerine dönüştürmektir. Buna göre noradrenalin, adrenalin ve dopamin sırasıyla; ³H-normetanefrin, ³H-Metanefrin ve ³H-metoksitiramine dönüştürülür. Bu metod, katekolamin ölçümünde kullanılan diğer metodlara göre çok daha hassastır ve adrenalin ve noradrenalin 2-5 pg/ml, dopamin 15-20 pg/ml düzeylerde ölçülebilmektedir. Ölçümler buzlu su banyosu içinde ve 50 µl plazma kullanılarak yapıldı. Plazmalar ile birlikte hazırlanan blank ve standartların üzerine ilk olarak asidik glutasyon içeren 10 µl stabilizan solüsyon eklendi. Takiben tüplere COMT, ³H-SAM (2.5 µCi), tampon çözelti (EGTA ve MgCl₂ içerir) ve distile su bulunan ölçüm karışımından 40 µl eklendi ve 37 °C su banyosunda bir saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tüpler buzlu su banyosuna alınarak enzimatik reaksiyon durduruldu. Daha sonra tüplerin üzerine içinde 4mM metanefrin, normetanefrin ve metoksitiramin (bunlar kromatografi sırasında "³H-" ürünlerinin taşınmasını kolaylaştırır) içeren solüsyondan 50 µl eklendi. Takiben toluen / isoamilalkol (3:2 v/v) ve asetik asit (0.1 M) kullanılarak katekolaminler ekstrakte edildiler ve vakum (Jouan, RC-10.10, Fransa) altında kurutuldular. Bu tüplerin üzerlerine 50 µl etanol eklendi ve vortexleme işleminden sonra, ince tabaka kromatografi plakları (Kiesegel 60 F₂₅₄, Merck, Almanya) üzerine pipet ve kurutma makinesi yardımı ile etanol emdirildi. Takiben plaklar tersiyeramilalkol / benzen / metilamin (6:2:3 v/v/v) içeren banyo küvetinde 3-4 saat süre ile bırakılarak, reaksiyon ürünlerimizin göç ederek ayrılmaları sağlandı. Katekolaminlerin ³H-O-metil ürünlerinin bulunduğu

zonlar, 254 nm ultraviyole ışığı (GAMAG, UV-Betrachter, Almanya) altında belirlendi. En üstteki (başlama hattından en uzaktaki) zon ^3H -metoksitiramin, orta zon ^3H -metanefrin, en alt zon ise ^3H -normetanefrin'e aittir. Bu zonlardan ^3H -metanefrin ve ^3H -normetanefrin'i içerenler ince uçlu iğne ile işaretlendi ve silika, bistüri yardımı ile kazınarak sayım şişelerinde toplandı. Çalışmamızda dopamin düzeylerini ölçmediğimiz için, en üst zon dikkate alınmadı ve silikada bırakıldı. Şişeler üzerine 1 ml amonyum hidroksit (0.05 M), 50 µl sodyum metaperiodat ve gliserol eklenerek metanefrin ve normetanefrin vanilin'e dönüştürüldü. Daha sonra şişelere 1 ml asetik asit (0.1 M), 4 ml toluen / liquiflor (1000:50 v/v) karışımından eklendi ve likit skintillasyon spektrometresi ile (Packard,1600 TR, Liquid Scintillation Analyzer, ABD) radyoaktivite ölçüldü. Paralel yapılmış ve miktarları bilinen standartlar yardımı ile örneklerdeki noradrenalin ve adrenalin düzeyleri hesaplandı.

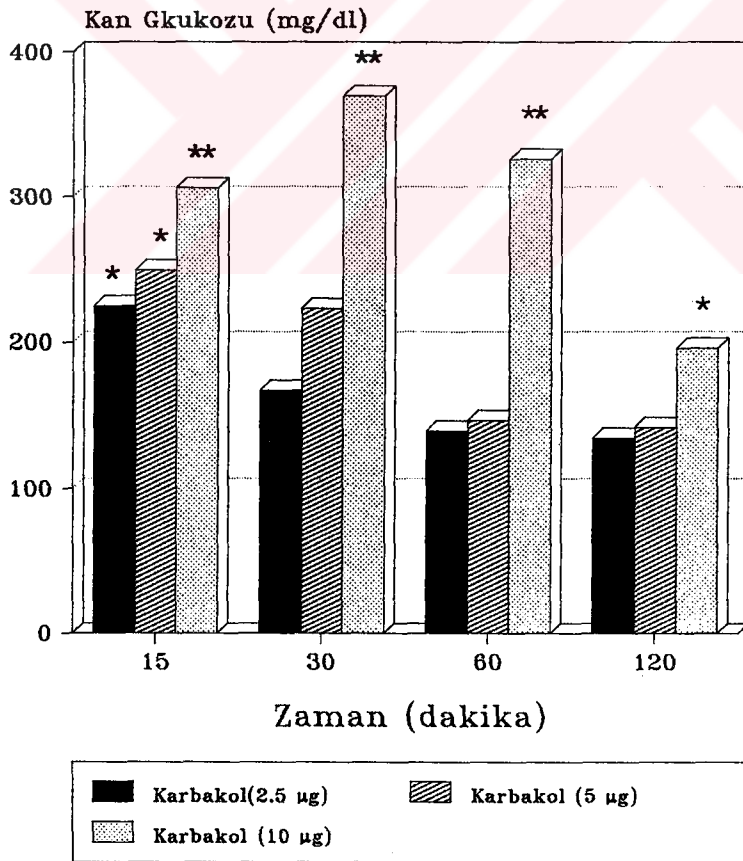
İlaçlar: Bu çalışmada kullanılan karbakol (karbamilkolin), atropin sülfat, mekamilamin hidroklorür, pirenzepin dihidroklorür, prazosin hidroklorür ve yohimbin hidroklorür Sigma'dan (Sigma Chem. Co., MO, ABD), propranolol hidroklorür Doğu İlaç Fabrikası'ndan, HHSiD, metoktramin hidroklorür ve 4-DAMP RBI'dan (Research Biochemicals Inc., ABD), AF-DX 116 Dr. Karl Thomae'den (Dr. Karl Thomae, Gmbh Biberach and Der Riss, Almanya) satın alınmıştır. Prazosin ve AF-DX 116 hariç tüm ilaçlar tuzlu su (%0.9 NaCl) içinde, Prazosin distile su, AF-DX 116 ise HCl içinde (pH: 7.34'e ayarlandı) hazırlanmıştır. ICV enjeksiyonlar için, ilaçların metinde belirtilen dozları 10 µl içinde zerk edilecek şekilde, serbest baz üzerinden hesaplanmıştır. ICV enjeksiyonlar Hamilton mikroenjektör'ü kullanılarak yapılmıştır. İP zerk için kullanılan ilaçların metinde belirtilen dozları kg başına 1 ml içinde verilecek şekilde hazırlanmış ve 1 ml hacmindeki enjektör yardımı ile zerk edilmiştir.

İstatistikî değerlendirilmeler: Bulgular, bilgisayar istatistik paket programı kullanılarak (Pharmacologic Calculation System, 2., Springer Verlag, 1986) bilgisayar ile değerlendirilmiştir. P'nin 0.05'den küçük olduğu değerler istatistikî olarak anlamlı sayılmıştır. Tüm sonuçlar ortalama \pm ortalamanın standart hatası olarak verilmiş ya da gösterilmiştir.

BULGULAR

ICV YOLLA UYGULANAN KARBAKOL'ÜN KAN GLUKOZUNA ETKİSİ

Cerrahi işlemleri yapılmış ve 2.5-3 saat kadar anestezinin etkisinden çıkmaları için bekletilmiş sıçanlarda kan glukoz düzeyleri ortalama 144 ± 5 mg/dl'dir (n=20). ICV yolla verilen karbakol (2.5, 5 μ g) kan glukozunu 15. dakikada dozla ilişkili olarak arttırdı (Şekil 1). 2.5 μ g karbakol'ün etkisi sonraki dakikalarda geri dönerken, 5 μ g karbakol'ün etkisi 30. dakikada azalmaya başladı, 60. dakikada geri döndü (Şekil 1). Yüksek doz (10 μ g) karbakol ise kan glukozunu diğer dozlar ile kıyaslandığında çok daha fazla arttırdı. Artış karbakol enjeksiyonundan 15 dakika sonra başladı, 30. dakikada en yüksek düzeye ulaştı. 60 ve 120. dakikalarda karbakol'ün etkisi azalmakla birlikte, halen kontrol düzeylerinin üzerindeydi (Şekil 1). Tuzlu su enjeksiyonundan sonra kan glukozunda yaklaşık 40-45 mg/dl kadar bir artma meydana geldi. Tuzlu suyun etkisi 120. dakikaya kadar azalarak devam etti.



Şekil 1: Karbakol'ün kan glukozuna etkisi ve doz-cevap ilişkisi. Değişen dozlarda karbakol'ün (2.5, 5, 10 μ g) ICV yolla zerkinden 15, 30, 60, 120 dakika sonra kan alındı. Her grup için 6-10 sıçan kullanıldı.

: Tuzlu su tedavisinden farkı göstermektedir (: P<0.05 ** : P<0.001).

ICV YOLLA UYGULANAN KARBAKOL'ÜN HİPERGLİSEMİK ETKİSİNDE, MERKEZİ KOLİNERJİK RESEPTÖRLERİN ROLÜ

ICV karbakol'ün hiperglisemik etkisinde kolinerjik reseptörlerin hangisinin aracılık ettiğini belirlemek için, sıçanlara nikotinic reseptör antagonisti mekamilamin (50 µg), nonspesifik muskarinic reseptör antagonisti atropin (10 µg) veya tuzlu su ICV yolla zerk edildi. Zerkten 15 dakika sonra yine serebral yan ventriküle karbakol (10 µg) veya tuzlu su enjekte edildi. Atropin ön tedavisi uygulanmış sıçanlarda, karbakol'e bağlı kan glukoz artışı 15. dakikada bir miktar görülmekle birlikte belirgin şekilde azaldı (Tablo 1). Mekamilamin uygulanmış grupta ise, karbakol sonrası kan glukozu daha fazla artış gösterdi ($P<0.05$) (Tablo 1). Atropin ve mekamilamin tek başlarına kullanıldıklarında, kan glukoz düzeylerini değiştirmediler (Tablo 1).

Tablo 1: Kolinerjik reseptör antagonistleri ile tedavi edilmiş sıçanlarda, karbakol'ün kan glukoz düzeyine etkisi.

Gruplar	Glukoz (mg/dl)		
	15'	30'	60'
Tuzlu su + Tuzlu su	194 ± 9	187 ± 8	164 ± 8
Tuzlu su + Karbakol	306 ± 7	369 ± 8	326 ± 13
Atropin + Tuzlu su	174 ± 5	168 ± 10	157 ± 17
Atropin + Karbakol	195 ± 8 *	181 ± 19 *	138 ± 8 *
Mekamilamin + Tuzlu su	184 ± 5	180 ± 5	168 ± 5
Mekamilamin + Karbakol	333 ± 10	413 ± 8 #	398 ± 5

Atropin (10 µg), mekamilamin (50 µg) veya tuzlu su ICV yolla zerk edildi. Antagonistlerin zerkinden 15 dakika sonra karbakol (10 µg) veya tuzlu su enjekte edildi ve 15, 30, 60 dakika sonra kan glukoz düzeyleri ölçüldü. Her grup için 5-10 sıçan kullanıldı.

* , # : Tuzlu su + Karbakol tedavisinden farkı göstermektedir (* : $P<0.001$, # : $P<0.05$).

KARBAKOL'ÜN HİPERGLİSEMİK ETKİSİNDE MUSKARİNİK RESEPTÖR ALT TİPLERİNİN ROLÜ

A) Pirenzepin'in etkisi: ICV yolla uygulanan karbakol'ün kan glukozunu arttırıcı etkisinin atropin ile bloke olması, karbakol'ün etkisine merkezi muskarinik reseptörlerin aracılık ettiğini göstermektedir. Karbakol'ün hiperglisemik etkisine aracılık eden muskarinik reseptör alt tiplerinin saptanması amacı ile, karbakol (10 µg;ICV) enjeksiyonundan 15 dakika önce muskarik M₁ reseptör antagonisti pirenzepin, değişen dozlarda (10, 25, 50 100 µg) ICV yolla zerk edildi. Pirenzepin kullanılan bütün dozlarda, atropin ön tedavisine benzer şekilde, tüm zaman aralıklarında karbakol'ün kan glukozunu arttırıcı etkisini bloke etti. Pirenzepin'in etkisi dozla ilişkili olarak arttı (Tablo 2). Pirenzepin (100 µg;ICV) tek başına kullanıldığında, tuzlu su enjeksiyonunun etkisine benzer şekilde kan glukozununun arttırdı (Tablo 2).

Tablo 2: Pirenzepin ön tedavisi uygulanmış sıçanlarda, karbakol'ün kan glukoz düzeyine etkisi.

Gruplar	Glukoz (mg/dl)		
	15'	30'	60'
Tuzlu su + Tuzlu su	194 ± 9	187 ± 8	164 ± 8
Tuzlu su + Karbakol	306 ± 7	369 ± 8	326 ± 13
Pirenzepin (10 µg) + Karbakol	219 ± 11 *	194 ± 20 *	146 ± 8 *
Pirenzepin (25 µg) + Karbakol	223 ± 14 *	158 ± 10 *	150 ± 5 *
Pirenzepin (50 µg) + Karbakol	182 ± 8 *	156 ± 8 *	126 ± 5 *
Pirenzepin (100 µg) + Karbakol	196 ± 9 *	137 ± 6 *	146 ± 9 *
Pirenzepin (100 µg) + Tuzlu su	174 ± 10	176 ± 13	153 ± 9

Değişen dozlarda pirenzepin (ICV) veya tuzlu su (ICV) zerkinden 15 dakika sonra karbakol (10 µg) veya tuzlu su ICV yolla enjekte edildi ve 15, 30, 60 dakika sonra kan glukoz düzeyleri ölçüldü. Her grup için 5-10 sıçan kullanıldı.

* : Tuzlu su + Karbakol tedavisinden farkı göstermektedir (p<0.001).

B) 4-DAMP'nin etkisi: Muskarinik M_1 ve M_3 reseptör antagonisti olan 4-DAMP (10 μ g;ICV), karbakol (10 μ g;ICV) enjeksiyonundan 15 dakika önce zerk edildi. 4-DAMP ön tedavisi karbakol'e bağlı kan glukoz artışını bloke etti (Tablo 3). 4-DAMP tek başına kullanıldığında, tuzlu su enjeksiyonunun etkisine benzer şekilde kan glukozunu arttırdı (Tablo 3).

Tablo 3: 4-DAMP ön tedavisi uygulanmış sıçanlarda, karbakol'ün kan glukoz düzeyine etkisi.

Gruplar	Glukoz (mg/dl)		
	15'	30'	60'
Tuzlu su + Tuzlu su	194 \pm 9	187 \pm 8	164 \pm 8
Tuzlu su + Karbakol	306 \pm 7	369 \pm 8	326 \pm 13
4-DAMP + Tuzlu su	206 \pm 3	196 \pm 5	171 \pm 5
4-DAMP + Karbakol	185 \pm 7 *	180 \pm 7 *	153 \pm 4 *

4-DAMP (10 μ g;ICV) veya tuzlu su (ICV) zerkinden 15 dakika sonra, karbakol (10 μ g) veya tuzlu su ICV yolla enjekte edildi ve 15, 30, 60 dakika sonra kan glukoz düzeyleri ölçüldü. Her grup için 6-10 sıçan kullanıldı.

* : Tuzlu su + Karbakol tedavisinden farkı göstermektedir ($P < 0.001$).

C) Metoktramin'in etkisi: Muskarinik M_2 reseptör antagonisti olan metoktramin (10 μ g), karbakol (10 μ g;ICV) zerkinden 15 dakika önce ICV yolla uygulandı. Metoktramin enjeksiyonundan yaklaşık 3-4 dakika sonra sıçanlar konvülsiyon geçirdiler. Metoktramin'in bu etkisi karbakol enjeksiyonundan sonra daha da şiddetlendi ve sıçanların bir kısmı öldü. Bu nedenle çalışmada karbakol 2.5 μ g dozunda kullanıldı. Metoktramin karbakol'ün kan glukozunu arttırıcı etkisini önlememekle birlikte, dozla artan şekilde kan glukoz düzeyini arttırdı (Tablo 4).

Tablo 4: Metoktramin ön tedavisi uygulanmış sıçanlarda, karbakol'ün kan glukoz düzeyine etkisi.

Gruplar	Glukoz (mg/dl)		
	15'	30'	60'
Tuzlu su + Karbakol	225 ± 7	167 ± 13	140 ± 3
Metoktramin (10 µg) + Karbakol	240 ± 9	244 ± 17*	144 ± 4
Metoktramin (25 µg) + Karbakol	310 ± 15 **	333 ± 15 **	179 ± 3 *
Metoktramin (50 µg) + Karbakol	312 ± 12 **	296 ± 11 **	174 ± 12 *

Metoktramin (10, 25, 50 µg; ICV) veya tuzlu su (ICV) zerkinden 15 dakika sonra karbakol (2.5 µg) veya tuzlu su ICV yolla enjekte edildi ve 15, 30, 60 dakika sonra kan alındı. Her grup için 5-8 sıçan kullanıldı.

* : Tuzlu su + Karbakol tedavisinden farkı göstermektedir (* : P<0.01 , ** :P<0.001)

Metoktramin (10, 25, 50 µg) tek başına kullanıldığında, dozla ilişkili şekilde kan glukoz düzeylerini arttırdı. Metoktramin'in etkisi 15. dakikada maksimumdu, 30. dakikada azalarak, 1. saatin sonunda kontrol düzeylerine geri döndü (Tablo 5).

Tablo 5: Metoktramin ön tedavisi uygulanmış sıçanlarda, karbakol'ün kan glukoz düzeyine etkisi.

Gruplar	Glukoz (mg/dl)				
	-15'	0	15'	30'	60'
Tuzlu su + Tuzlu su (Ts)	148 ± 5	170 ± 3	194 ± 9	187 ± 8	164 ± 8
Metoktramin (10 µg) + Ts	155 ± 1	161 ± 6	159 ± 8	157 ± 8	148 ± 7
Metoktramin (25 µg) + Ts	140 ± 20	220 ± 10 *	160 ± 4	152 ± 6	157 ± 6
Metoktramin (50 µg) + Ts	139 ± 5	270 ± 9 *	216 ± 22	207 ± 22	167 ± 11

Değişen dozlarda metoktramin, tuzlu su (ICV) zerkinden 15 dakika önce, ICV yolla enjekte edildi. Metoktramin enjeksiyonundan önce (-15), tuzlu su enjeksiyonundan önce (0) ve tuzlu su enjeksiyonundan 15, 30, 60 dakika sonra kan glukoz düzeyleri ölçüldü. Her grup için 5-8 sıçan kullanıldı.

* : Tuzlu su + Tuzlu su tedavisinden farkı göstermektedir (* : P<0.01, ** : P<0.001).

D) AF-DX 116'nin etkisi: Bir diğer muskarinik M_2 reseptör antagonisti olan AF-DX 116 değişen dozlarda (20, 40, 100 μg), karbakol (10 $\mu\text{g};\text{ICV}$) zerkinden 15 dakika sonra ICV yolla enjekte edildi. AF-DX 116, metoktramin çalışmasında olduğu gibi sıçanlarda konvülzyona neden olmadı ve kullanıldığı dozlarda karbakol'ün kan glukoz düzeyine olan etkisini 15 ve 30. dakikalarda değiştirmezken, 60. dakikada anlamlı şekilde azalttı (Tablo 6). AF-DX 116 (20 $\mu\text{g};\text{ICV}$) tek başına kan glukoz seviyesini değiştirmedi (Tablo 6).

Tablo 6: AF-DX 116 ön tedavisi uygulanmış sıçanlarda, karbakol'ün kan glukoz düzeyine etkisi.

Gruplar	Glukoz (mg/dl)		
	15'	30'	60'
Tuzlu su + Tuzlu su	194 \pm 9	187 \pm 8	164 \pm 8
Tuzlu su + Karbakol	306 \pm 7	369 \pm 8	326 \pm 13
AF-DX 116 (20 μg) + Karbakol	292 \pm 9	312 \pm 26	205 \pm 13 **
AF-DX 116 (40 μg) + Karbakol	298 \pm 18	317 \pm 32	219 \pm 30 **
AF-DX 116 (100 μg) + Karbakol	270 \pm 18	306 \pm 27	213 \pm 27 *
AF-DX 116 (20 μg) + Tuzlu su	158 \pm 1	152 \pm 1	154 \pm 4

Değişen dozlarda AF-DX 116 (ICV) veya tuzlu su (ICV) zerkinden 15 dakika sonra karbakol (10 μg) veya tuzlu su ICV yolla enjekte edildi ve 15, 30, 60 dakika sonra kan glukoz düzeyleri ölçüldü. Her grup için 6-10 sıçan kullanıldı.

* :Tuzlu su + Karbakol tedavisinden farkı göstermektedir (* : $P<0.01$, ** : $P<0.001$).

E) HHSiD'nin etkisi: Muskarinik M_3 reseptör antagonisti olan HHSiD değişen dozlarda (10, 25, 50, 100 μg), karbakol'den (10 $\mu\text{g};\text{ICV}$) 15 dakika önce ICV yolla zerk edildi. HHSiD kullanıldığı dozlarda karbakol'ün hiperglisemik etkisini değiştirmedi (Tablo 7). HHSiD (100 $\mu\text{g};\text{ICV}$) tek başına kan glukozunda değişiklik meydana getirmede (Tablo 7).

Tablo 7: HHSiD ön tedavisi uygulanmış sıçanlarda, karbakol'ün kan glukoz düzeyine etkisi.

Gruplar	Glukoz (mg/dl)		
	15'	30'	60'
Tuzlu su + Tuzlu su	194 ± 9	187 ± 8	164 ± 8
Tuzlu su + Karbakol	306 ± 7	369 ± 8	326 ± 13
HHSiD (10 µg) + Karbakol	305 ± 13	331 ± 10	269 ± 5
HHSiD (20 µg) + Karbakol	324 ± 13	322 ± 15	243 ± 19
HHSiD (50 µg) + Karbakol	314 ± 8	327 ± 5	270 ± 11
HHSiD (100 µg) + Karbakol	308 ± 4	343 ± 10	274 ± 9
HHSiD (100 µg) + Tuzlu su	161 ± 4	156 ± 1	144 ± 5

Değişen dozlarda HHSiD (ICV) veya tuzlu su (ICV) zerkinden 15 dakika sonra karbakol (10 µg) veya tuzlu su ICV yolla enjekte edildi. Takiben 15, 30, 60 dakika sonra kan glukoz düzeyleri ölçüldü. Her grup için 5-8 sıçan kullanıldı.

ICV YOLLA UYGULANAN KARBAKOL'ÜN PLAZMA GLUKAGON VE SERUM İNSÜLİN DÜZEYLERİNE ETKİSİ VE ETKİDEN SORUMLU MERKEZİ KOLİNERJİK RESEPTÖRLER

Kan glukoz seviyelerinin düzenlenmesinde rol oynayan insülin ve glukagon düzeylerinin ICV karbakol ile değişip değişmediğini belirlemek için, ilk olarak karbakol'den 15 dakika sonra alınan kan örneklerinde plazma glukagon ve serum insülin düzeyleri ölçüldü. Karbakol dozla ilişkili şekilde plazma glukagon düzeylerini arttırdı, serum insülin düzeylerini azalttı (Tablo 8). Kan glukoz düzeylerinde olduğu gibi (Şekil 2a), plazma glukagon düzeyinde meydana gelen yükselme, karbakol (10 µg;ICV) enjeksiyonundan 15 dakika sonra başladı, 30. dakikada en yüksek düzeye ulaştı, 60. dakikada halen kontrol düzeylerden yüksekti (Şekil 2b). Karbakol'ün serum insülinin düzeylerini inhibe edici etkisi 15. dakikada maksimumdu, 30. dakikada azalarak

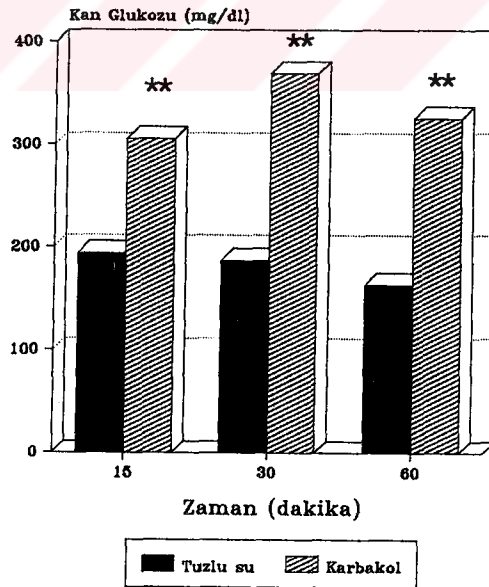
devam etti. İnsülin düzeyleri karbakol zerkinden 60 dakika sonra kontrol düzeylerine geri döndü (Şekil 2c).

Tablo 8: Değişen dozlarda karbakol'ün kan glukoz, plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine etkisi.

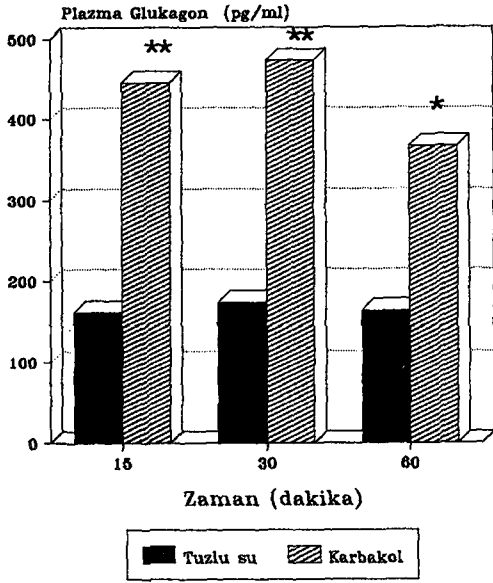
Gruplar	Glukoz (mg/dl)	Glukagon (pg/ml)	İnsülin (μ Ü/ml)
Tuzlu su	194 \pm 9	162 \pm 19	32 \pm 1
Karbakol (1 μ g)	232 \pm 17 **	285 \pm 32 **	24 \pm 2 *
Karbakol (5 μ g)	249 \pm 16 **	410 \pm 72 **	14 \pm 3 **
Karbakol (10 μ g)	306 \pm 7 **	445 \pm 82 **	10 \pm 2 **

Tuzlu su (ICV) zerkinden 15 dakika sonra değişen dozlarda karbakol ICV yolla enjekte edildi ve 15 dakika sonra kan alındı. Her grup için 5-6 sıçan kullanıldı.

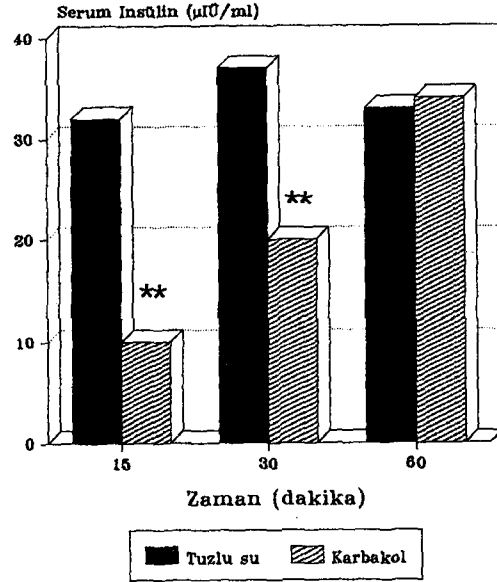
* : Tuzlu su tedavisinden farkı göstermektedir (* : P< 0.05, ** : P< 0.001).



Şekil 2a



Şekil 2b



Şekil 2c

Şekil 2a, 2b, 2c: Karbakol'ün kan glukoz, plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine etkisi. Tuzlu su (ICV) enjeksiyonundan 15 dakika sonra karbakol 10 µg dozunda ICV yolla zerk edildi ve 15, 30, 60 dakika sonra kan örnekleri toplandı. Her grup için 5-6 sıçan kullanıldı.

* : Tuzlu su + Tuzlu su tedavisinden farkı göstermektedir (* : P<0.05 , ** : P<0.001).

Karbakol'ün plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine etkisinde aracılık eden kolinerjik reseptör ve reseptör alt tiplerini test etmek amacı ile karbakol (10 µg;ICV) enjeksiyonundan 15 dakika önce atropin (10 µg), mekamilamin (50 µg), pirenzepin (25 µg), 4-DAMP (10 µg) veya AF-DX 116 (20 µg) ICV yolla zerk edildi. Karbakol veya tuzlu su enjeksiyonundan 30 dakika sonra alınan kan örneklerinde kan şekeri, plazma glukagon ve serum insülin düzeyleri ölçüldü. Atropin, pirenzepin ve 4-DAMP ön tedavisi, karbakol'ün plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine olan etkisini bloke etti (Tablo 9). Mekamilamin ve AF-DX 116 ön tedavisi ise karbakol'ün insülin ve glukagon düzeylerine olan etkisini değiştirmedii (Tablo 9).

Tablo 9: Kolinerjik antagonistlerle tedavi edilmiş sıçanlarda, karbakol'ün kan glukoz, plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine etkisi.

Gruplar	Glukoz (mg/dl)	Glukagon (pg/ml)	İnsülin (μ lÜ/ml)
Tuzlu su + Tuzlu su	187 \pm 8	174 \pm 25	37 \pm 3
Tuzlu su + Karbakol	369 \pm 8	474 \pm 84	20 \pm 2
Atropin + Tuzlu su	168 \pm 10	217 \pm 24	32 \pm 4
Atropin + Karbakol	181 \pm 10 *	184 \pm 14 *	41 \pm 9 *
Mekamilamin + Karbakol	180 \pm 5	246 \pm 9	31 \pm 2
Mekamilamin + Tuzlu su	413 \pm 8	438 \pm 64	24 \pm 2
Pirenzepin + Tuzlu su	137 \pm 2	211 \pm 14	30 \pm 3
Pirenzepin + Karbakol	158 \pm 10 *	203 \pm 15 *	39 \pm 6 *
4-DAMP + Tuzlu su	206 \pm 7	167 \pm 12	41 \pm 8
4- DAMP + Karbakol	185 \pm 7 *	192 \pm 8 *	34 \pm 3 *
AF-DX 116 + Tuzlu su	131 \pm 3	230 \pm 35	36 \pm 3
AF-DX 116 + Karbakol	312 \pm 26	435 \pm 65	20 \pm 2

Atropin (10 μ g), mekamilamin (50 μ g), pirenzepin (25 μ g), 4-DAMP (10 μ g), AF-DX 116 (20 μ g) veya tuzlu su ICV yolla zerk edildi. Antagonistlerin zerkinden 15 dakika sonra karbakol (10 μ g; ICV) enjekte edildi ve 30. dakikada kan alındı. Her grup için 5-7 sıçan kullanıldı.

* : Tuzlu su + Karbakol tedavisinden farkı göstermektedir ($P < 0.001$).

ICV YOLLA UYGULANAN KARBAKOL'ÜN HİPERGLİSEMİK ETKİSİNDE PLAZMA KATEKOLAMİNLERİNİN ROLÜ

Kan glukoz seviyelerinin düzenlenmesinde önemli rolü olduğunu bildiğimiz sempato-adrenal sistemin karbakol'ün hiperglisemik etkisine de aracılık edip etmediğini araştırmak için, ilk olarak plazma katekolamin düzeyleri ölçüldü. Bu amaçla karbakol (10 μ g) veya tuzlu su ICV yolla enjekte edildi, 30 dakika sonra plazma adrenalin ve noradrenalin düzeyleri ölçüldü (Tablo 10). Karbakol plazma adrenalin ve noradrenalin düzeylerini anlamlı şekilde arttırdı. Sonuçlar tuzlu su ile tedavi edilmiş sıçanlarla karşılaştırıldığında, plazma adrenalin düzeyindeki artış

%300, plazma noradrenalin düzeyindeki artış ise %50 oranında oldu (Tablo 10). Karbakol'ün plazma katekolamin düzeylerine etkisinde muskarinik kolinerjik reseptörlerin rolünü test etmek için, karbakol (10 µg;ICV) enjeksiyonundan 15 dakika sonra atropin (10 µg) ICV yolla zerk edildi. Karbakol'e bağlı plazma adrenalin ve noradrenalin düzeyindeki artış atropin ön tedavisi ile ortadan kalkarken, atropin'in kendisi plazma katekolamin düzeylerini değiştirmede (Tablo 10).

Tablo 10: Karbakol'ün hiperglisemik etkisinde katekolaminlerin rolü ve bu etkiden sorumlu olan merkezi kolinerjik reseptörler.

Gruplar	Noradrenalin (pg/ml)	Adrenalin (pg/ml)
Tuzlu su + Tuzlu su	557 ± 45	399 ± 56
Tuzlu su + Karbakol	793 ± 65 *	1451 ± 85 **
Atropin + Tuzlu su	491 ± 55	320 ± 50
Atropin + Karbakol	370 ± 62 #	557 ± 79 #

ICV yolla tuzlu su veya atropin (10 µg) zerkinden 15 dakika sonra karbakol (10 µg;ICV) veya tuzlu su (ICV) enjekte edildi ve 30. dakikada alınan kan örneklerinden plazma katekolamin düzeyleri ölçüldü. Her grup için 5-6 sıçan kullanıldı.

* : Tuzlu su + tuzlu su tedavisinden farkı göstermektedir (*: P< 0.05 , **: P< 0.001).

: Tuzlu su + Karbakol tedavisinden farkı göstermektedir (# : P< 0.001).

MERKEZİ YOLLA UYGULANAN KARBAKOL'ÜN HİPERGLİSEMİK ETKİSİNDE ADRENAL GLANDIN ROLÜ

Merkezi uygulanan karbakol'ün hiperglisemik etkisinde aracılığı olduğunu düşündüğümüz sempato-adrenal sistemin rolünü araştırmak için yaptığımız çalışmaların ikinci aşamasında bir grup sıçanda iki taraflı adrenal gland çıkarıldı, diğer bir grup sıçana ise sham operasyon uygulandı. ADK veya sham operasyon uygulanmış sıçanlara tuzlu su (10 µl;ICV) veya karbakol (10 µg;ICV) zerk edildi. 30 dakika sonra alınan kan örneklerinden glukoz, plazma glukagon ve serum insülin düzeyleri ölçüldü. ADK uygulanmış ve tuzlu su zerk edilmiş sıçanlarda

kan glukoz ve serum insülin düzeyleri, sham grubuna göre anlamlı şekilde azaldı, plazma glukagon düzeyleri ise arttı (Tablo 11). ADK uygulanmış ve karbakol ile tedavi edilmiş sıçanlarda ise, karbakol'e bağlı kan glukoz artışı, sham grubuna göre çok daha az oranda oldu (Tablo 11). Plazma glukagon düzeyleri, ADK uygulanmış sıçanlarda karbakol enjeksiyonundan sonra arttı. Plazma glukagon düzeyindeki bu artış, bazal değerler göz önüne alındığında, sham grubuna göre daha az oranda oldu (Tablo 11). Serum insülin düzeyleri ise, karbakol enjeksiyonundan sonra ADK uygulanmış sıçanlarda sham grubunun aksine arttı (Tablo 11).

Tablo 11: ADK ve sham operasyon uygulanmış sıçanlarda, karbakol'ün kan glukoz, plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine etkisi.

Gruplar	Glukoz (mg/dl)	Glukagon (pg/ml)	İnsülin (μ lÜ/ml)
ADRENALEKTOMİ			
Tuzlu su	84 \pm 3	301 \pm 26	16 \pm 1
Karbakol	132 \pm 3 #	598 \pm 54 #	33 \pm 4 #
SHAM OPERASYON			
Tuzlu su	133 \pm 3 *	152 \pm 12 *	31 \pm 2 *
Karbakol	320 \pm 7 *	689 \pm 8 *	16 \pm 2 *

ADK veya sham operasyon uygulanmış sıçanlara, tuzlu su veya karbakol (10 μ g) ICV yolla uygulandı. Uygulamadan 30 dakika sonra kan örnekleri alındı. Her grup için 5-6 sıçan kullanıldı.

* : ADK grubundan farkı göstermektedir (P < 0.001).

: Tuzlu su tedavisinden farkı göstermektedir (P < 0.001).

MERKEZİ UYGULANAN KARBAKOL'ÜN HİPERGLİSEMİK ETKİSİNDE PERİFERİK ADRENERJİK RESEPTÖRLERİN ROLÜ

Adrenallerin iki taraflı olarak çıkarılması ile ICV karbakol'ün kan glukoz, plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine olan etkisinin bloke olması (veya değişmesi) bu etkilerde adrenal kaynaklı katekolaminlerin rolü olabileceğini düşündürmektedir. Dolaşımda katekolaminlerin

etkilerine hangi adrenerjik reseptörlerin aracılık ettiğini belirlemek için, ICV yolla karbakol (10 µg) veya tuzlu su enjeksiyonundan 15 dakika önce, nonselektif β adrenerjik reseptör blokörü propranolol (0.5 mg/kg), selektif α₁ adrenerjik reseptör blokörü prazosin (0.3 mg/kg), selektif α₂ adrenerjik reseptör blokörü yohimbin (0.5 mg/kg) veya tuzlu su İP yolla zerk edildi. Karbakol veya tuzlu zerkinden 30 dakika sonra kan alındı. Karbakol'ün kan glukoz, plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine etkisini propranolol veya prazosin ön tedavisi değiştirmede (Tablo 12). Yohimbin ön tedavisi ise karbakol'ün kan glukoz ve plazma glukagon düzeylerini artırıcı etkisini ortadan kaldırdı (Tablo 12). Karbakol bu sıçanlarda, serum insülin düzeyini azaltmadığı gibi yaklaşık iki kat arttırdı (Tablo 12). Kullanılan antagonistlerden sadece prazosin tek başına kan glukoz ve plazma glukagon düzeylerini kontrol grubuna göre bir miktar arttırdı. Artış, kan glukozunda anlamlı ölçüdeydi (P < 0.05) (Tablo 12). Diğer antagonistler ise herhangi bir değişme yapmadılar.

TABLO 12: Adrenerjik reseptör antagonistleri ile tedavi edilmiş sıçanlarda, karbakol'ün kan glukoz, plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine etkisi.

Gruplar	Glukoz (mg/dl)	Glukagon (pg/ml)	İnsülin (µÜ/ml)
Tuzlu su + Tuzlu su	143 ± 5	176 ± 12	33 ± 2
Tuzlu su + Karbakol	329 ± 8	499 ± 26	18 ± 2
Propranolol + Tuzlu su	136 ± 3	110 ± 11	30 ± 2
Propranolol + Karbakol	316 ± 10	545 ± 61	18 ± 2
Prazosin + Tuzlu su	183 ± 11	205 ± 24	35 ± 1
Prazosin + Karbakol	333 ± 13	511 ± 60	16 ± 2
Yohimbin + Tuzlu su	132 ± 5	126 ± 8	36 ± 4
Yohimbin + Karbakol	163 ± 9 *	143 ± 11 *	64 ± 6 *

Karbakol (10 µg; ICV) veya tuzlu su (ICV) enjeksiyonundan 15 dakika önce propranolol (0.5 mg/kg), prazosin (0.3 mg/kg), yohimbin (0.5 mg/kg) veya tuzlu su İP yolla zerk edildi ve 30 dakika sonra kan alındı. Her grup için 5-6 sıçan kullanıldı.

* : Tuzlu su + Karbakol tedavisinden farkı göstermektedir (P < 0.001).

TARTIŞMA

Çalışmamızdan elde edilen bulgular, uyanık tok sıçanlarda lateral serebral ventriküle enjekte edilen karbakol'ün, dozla ilişkili şekilde kan glukozunu arttırdığını göstermiştir (Şekil 1). Karbakol'ün hiperglisemik etkisi, muskarinik reseptör antagonisti atropin ile bloke olurken, nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin karbakol'ün etkisini bloke etmemiş, tersine karbakol'ün etkisinde artmaya neden olmuştur (Tablo 1). Bu sonuçlar bize, ICV yolla uygulanan karbakol'ün neden olduğu hipergliseminin kolinerjik muskarinik reseptörler aracılığı ile olduğunu göstermektedir.

ICV karbakol'ün hiperglisemik etkisinin atropinle önlenmesi, önceki çalışmalarda merkezi kolinerjik aktivitenin artmasına bağlı kan glukoz düzeyinde meydana gelen artışın, muskarinik reseptörler aracılığı ile olduğuna dair bulgularla uyumludur (*Korner ve Ramu, 1975; Iguchi ve ark., 1985, 1986, 1990*). Ancak seçici muskarinik antagonistler ile yaptığımız bu çalışmada, muskarinik reseptör alt tiplerinin rolü ile ilgili bulgular oldukça karmaşıktır. Muskarinik M₁ reseptör antagonisti pirenzepin, M₁ ve M₃ reseptör antagonisti 4-DAMP, karbakol'ün kan glukozuna olan etkisini tamamen ortadan kaldırmaktadır (Tablo 2, Tablo 3). M₃ reseptör antagonisti HHSiD ise karbakol'ün hiperglisemik etkisini değiştirmemektedir (Tablo 7). Muskarinik M₂ reseptör antagonisti AF-DX 116 ön tedavisi karbakol enjeksiyonundan sonra 15 ve 30. dakikalarda meydana gelen kan glukoz artışını değiştirmezken, 60. dakikada görülen hiperglisemik etkiyi bloke etmiştir (Tablo 6). Bir diğer M₂ reseptör antagonisti olan metoktramin'in kendisi de hiperglisemi meydana getirmekte (Tablo 5) ve karbakol'ün hiperglisemik etkisini arttırmaktadır (Tablo 4). Ancak bu ilaç ile tedavi edilmiş sıçanlarda konvülzyon görülmesi nedeni ile ortaya çıkan hipergliseminin, ilaca mı bağlı olduğu yoksa konvülzyonun bir sonucu mu olduğunu bilmek mümkün değildir. Ancak ortaya çıkan konvülzyon, bazı M₂ reseptör antagonistlerinin kolinerjik aktiviteyi arttırdığı ve buna bağlı birtakım motor fonksiyon bozuklukları ile birlikte nöbet oluşturabildiğini bildiren diğer bazı bulgular ile uyumludur (*Hoss ve ark., 1990*). Bu sonuçlar beraberce dikkate alındığında, merkezi yolla uygulanan karbakol'ün hiperglisemik etkisinde aracılık eden muskarinik reseptör alt tipini tam bilmemekle beraber, M₁

alt tipi olduğu sonucuna varmamıza yol açmaktadır. ICV uygulanan karbakol'ün plazma adrenalin, noradrenalin, glukagon ve serum insülin düzeylerine etkisine de aracılık eden kolinerjik reseptörler, muskarinik tiptedir (Tablo 9, Tablo 10). Aynı zamanda karbakol'ün glukagon ve insülin düzeylerine olan etkisi, pirenzepin ve 4-DAMP ön tedavileri ile önlenirken, metoktramin ve AF-DX 116 karbakol'ün söz konusu etkilerini değiştirmemiştir (Tablo 9). Bu sonuçlar, karbakol'ün hiperglisemik etkisine aracılık eden muskarinik reseptörlerin M₁ alt tipi olabileceğine dair bulgularımız ile uyum içerisindedir.

ICV yolla uygulanan karbakol'ün neden olduğu hiperglisemide, karbakol'ün merkezi sinir sistemindeki etki yeri bu çalışmalar sırasında lokalize edilmemiştir. Ventromedial hipotalamus (VMH), kan glukoz konsantrasyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan en önemli merkezlerden birisidir (Benzo, 1983; Rohner-Jeanrenaud, 1983; Sasaki ve ark., 1988). Bu bölgenin elektrik veya kimyasal maddeler ile uyarılması, sempato-adrenal aktivitede artma ile birlikte kan glukoz düzeylerinin de hızla yükselmesine neden olur (Benzo, 1983; Rohner-Jeanrenaud, 1983; Sasaki ve ark., 1988). İndirek kolinerjik agonist olan neostigmin'in VMH içine direk enjeksiyonu, hiperglisemiye neden olmaktadır (Honmura ve ark., 1992). Bu bulgular beraberce ele alındığında ICV karbakol'ün de VMH'a etki ile hiperglisemi yaptığı düşünülebilir. Ancak bunun deneysel verilerle desteklenmesi gerekir.

ICV karbakol'ün hiperglisemik etkisine dolaşımda glukagon ve katekolaminlerin artışı, insülinin azalması eşlik etmektedir (Tablo 8, Şekil 2a,b,c, Tablo 10). Gerek katekolaminler ve gerekse glukagon hiperglisemi oluşturan endojen maddelerdir (Cryer, 1980; Hems ve Whitton, 1980). Dolayısı ile ICV karbakol'den sonra kan glukozunda gözlenen artış, katekolaminlere veya glukagona veya her ikisine bağlı olabilir. İnsülin ise kan glukozunu azaltan bir hormondur (Hems ve Whitton, 1980; Cherrington ve ark., 1987). Hiperglisemik etkide serum insülin azalmasının da katkısı olabilir. Katekolaminler insülin sekresyonunu α_2 -adrenerjik reseptörler aracılığı ile azaltan, glukagon sekresyonunu ise arttıran maddelerdir (Ahren ve ark., 1984; John ve ark., 1990; Angel ve Langer, 1988). Bu bilgiler dikkate alındığında karbakol'ün yol açtığı hiperglisemi, glukagon

artışı ve insülin azalması gibi etkilerin hepsi katekolamin artışına bağlı olabilir. Bu olasılık, çalışmamızdan elde ettiğimiz 2 bulgu ile güçlü şekilde desteklenmektedir.

İlk olarak; ICV uygulanan karbakol plazma adrenalin ve noradrenalin düzeylerini arttırmaktadır (Tablo 10). Katekolamin düzeyinin artmış olması, karbakol enjeksiyonundan sonra sempato-adrenal aktivitenin önemli ölçüde artmış olduğunu göstermektedir. Adrenal glandı çıkarılmış sıçanlarda ise ICV karbakol'ün hiperglisemik etkisi büyük oranda azalmaktadır. Bu şartlarda glukagon artışı da sınırlı kalmaktadır. Aynı sıçanlarda serum insülin düzeyleri ise artmaktadır (Tablo 11). Kolinerjik maddeler ile merkezi sinir sisteminin uyarılmasının, sempatik olduğu kadar parasempatik aktivitede de artmaya neden olduğu ve parasempatik aktivitedeki artışının etkilerinin (pankreasdan glukagon ve insülin salımında artma gibi), artmış sempatik aktivite nedeni ile maskelendiği öne sürülmektedir (*Iguchi ve ark., 1986; Gotoh ve ark., 1989*). Çalışmamızda, ICV yolla uygulanan karbakol'ün ADK uygulanmış sıçanlarda serum insülin düzeylerini arttırması (Tablo 11), bu hipotez ile uyumludur. Bu sıçanlarda ICV karbakol sonrası insülin düzeylerinde meydana gelen artma, muhtemelen artmış glukagon düzeylerine rağmen kan glukoz düzeyinin artışını önlemektedir. ADK uygulanmış ve tuzlu su ile tedavi edilmiş sıçanlarda kan glukoz düzeyleri önemli ölçüde azalmaktadır (Tablo 11). Bu bulgu, adrenal glandın kan glukoz düzeylerinin belirli sınırlar içinde sürdürülmesi için önemli olduğunu göstermektedir. Bu sıçanlarda, muhtemelen azalmış olan kan glukoz düzeylerini kompanse etmek için glukagon düzeyi artarken, insülin düzeyi azalmaktadır (Tablo 11). Bulgularımız, ADK sonrası sempatik aktivitenin önemli ölçüde arttığını gösteren çalışmalar ile uyumludur (*Darlington ve ark., 1989*).

İkinci olarak; α_2 adrenerjik reseptör antagonisti olan yohimbin, ICV uygulanan karbakol'ün glukoz, glukagon ve insülin düzeylerine olan etkisini tamamen ortadan kaldırmaktadır (Tablo 12). Nonselektif β adrenerjik reseptör antagonisti propranolol ve seçici α_1 adrenerjik reseptör antagonisti prazosin ön tedavileri ise, karbakol'ün kan glukoz, plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine etkisini değiştirmemektedir (Tablo 12). Daha önce sıçanlarda yapılan çalışmalarda, artmış sempato-adrenal aktivitenin pankreastan glukagon

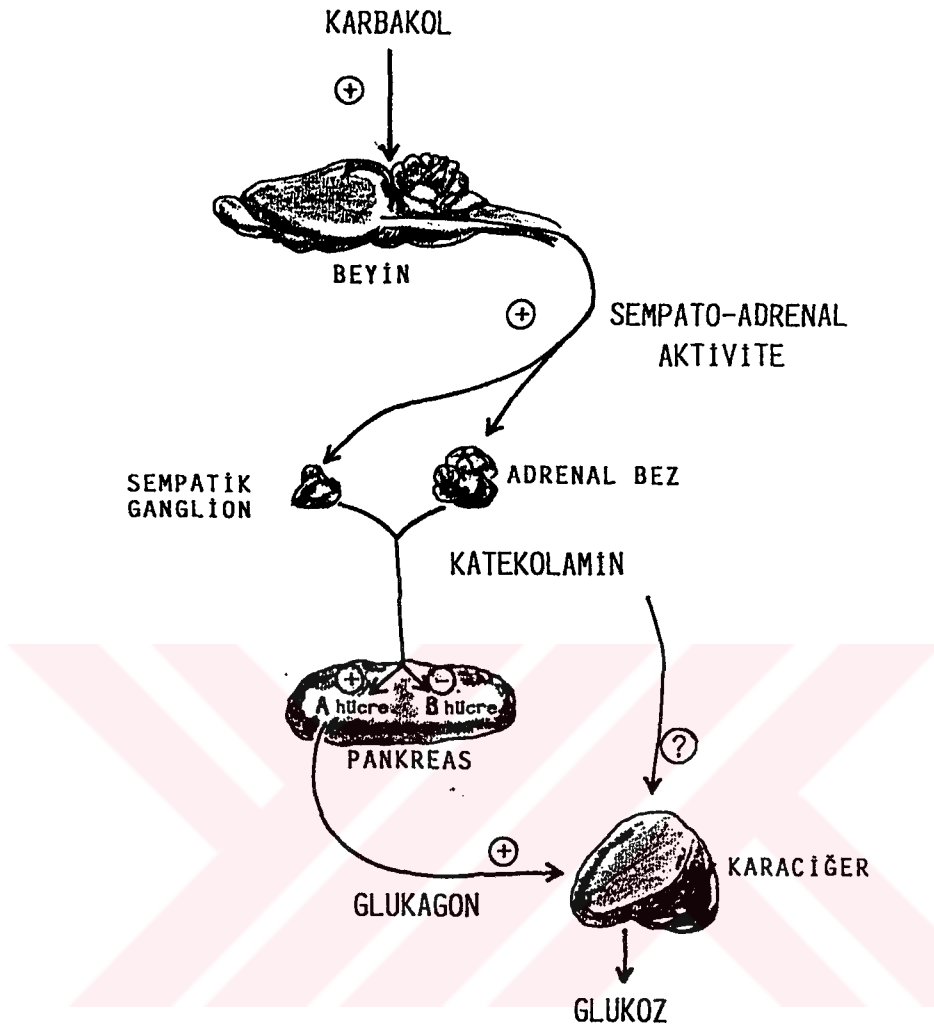
sekresyonunu hem α_2 hem de β_2 adrenoreseptörler aracılığı ile artırırken, insülin sekresyonunu β_2 adrenoreseptörler ile arttırdığı, α_2 adrenerjik reseptörler aracılığı ile de azalttığı gösterilmiştir (Ahren ve ark., 1984; John ve ark., 1990; Angel ve Langer, 1988). Normal şartlarda, pankreastan insülin sekresyonu üzerine α_2 adrenoreseptörlerin baskılayıcı etkisi hakim durumdadır (Ahren ve ark., 1984; John ve ark., 1990; Angel ve Langer, 1988). Bizim bulgularımıza göre, ICV yolla uygulanan karbakol'e bağlı dolaşımda artan katekolaminler, pankreasdan α_2 adrenoreseptörler aracılığı ile glukagon sekresyonunu arttırmakta ve insülin sekresyonunu azaltmaktadır. Muhtemelen β adrenerjik reseptörler, karbakol'ün insülin ve glukagon düzeylerine olan etkisinde aracılık etmemektedir.

Kolinerjik maddeler ile merkezi sinir sisteminin uyarılması sonucunda, sempato-adrenal aktivite meydana gelen artma nedeni ile dolaşımda artmış olan katekolaminler, hem pankreas hormonlarının salınımını değiştirerek (glukagonda artma, insülinde azalma), hem de karaciğerdeki adrenoreseptörler aracılığı ile glikojenolizi arttırarak, kan glukoz düzeylerinin artışına neden olmaktadır (Iguchi ve ark., 1986, 1988). Çalışmamızda, yohimbin ön tedavisinin ICV karbakol'ün neden olduğu hiperglisemiye ortadan kaldırması (Tablo 12), karbakol'ün hiperglisemik etkisinde katekolaminlerin direk olarak karaciğerde glikojenolizi stimüle etmesinin çok fazla katkısı olmadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, yohimbin uygulanmış sıçanlarda ICV karbakol'den sonra serum insülin düzeyinde meydana gelen önemli miktardaki artışın da (Tablo 12), kan glukoz seviyelerini azaltabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre;

1.) Merkezi sinir sisteminin bir kolinerjik agonist olan karbakol ile uyarılması; muhtemelen M1 alt tipi olan muskarinik kolinerjik reseptörler aracılığı ile hiperglisemiye neden olmaktadır.

2.) Karbakol'ün hiperglisemik etkisinde, dolaşımda artmış olan katekolaminlerin α_2 adrenerjik reseptörler aracılığı ile pankreastan glukagon sekresyonunu arttırmasının, insülin sekresyonunu ise azaltmasının önemli katkısı bulunmaktadır (bu hipotez, arka sayfadaki şemada özet olarak verilmiştir).



Bu araştırmanın bulguları, ICV uygulanan karbakol'ün hiperglisemik etkisinde, merkezi muskarinik reseptörler aracılığı ile sempato-adrenal sistemin uyarılmasının rolünü ortaya koymaktadır. Bu bulguların, merkezi uygulanan karbakol'ün hiperglisemik etkisinde, sempato-adrenal sistemin aracılığına dair çelişkili sonuçlara (Korner ve Ramu, 1975; Iguchi ve ark., 1985) bir açıklık getireceği şüphesizdir. Diğer taraftan çalışmamızda; kolinerjik maddelerin ICV yolla uygulanmasının neden olduğu hiperglisemide muskarinik reseptör alt tiplerinin muhtemel rolü ilk kez tanımlanmıştır. Kullandığımız muskarinik reseptör alt tiplerine spesifik antagonist ilaçların dozları ile ilgili bulgularımızın, daha sonra yapılacak in vivo çalışmalara katkısı olacağı düşüncesindeyiz.

ÖZET

1.) Çalışmada, ICV yolla değişen dozlarda uygulanan karbakol, dozla ilişkili olarak, kan glukoz ve plazma glukagon düzeylerini artırırken, serum insülin düzeylerini azalttı.

2.) Karbakol'ün kan glukoz, plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine olan etkilerini nikotinic reseptör antagonisti mekamilamin, muskarinik M_2 reseptör antagonistleri metoktramin ve AF-DX 116, muskarinik M_3 reseptör antagonisti HHSiD ön tedavileri değiştirmede. Nonspesifik muskarinik reseptör antagonisti atropin, muskarinik M_1 reseptör antagonisti pirenzepin, muskarinik M_1 ve M_3 reseptör antagonisti 4-DAMP ön tedavileri ise karbakol'ün söz konusu etkilerini bloke ettiler.

3.) ICV yolla uygulanan karbakol, plazma katekolamin düzeylerini arttırdı. Karbakol'ün bu etkisi atropin ön tedavisi ile ortadan kalktı.

4.) Adrenalektomi uygulanmış sıçanlarda, merkezi yolla uygulanan karbakol'e bağlı kan glukoz artışı ve serum insülin düzeyinde görülen azalma bloke oldu. Aynı sıçanlarda plazma glukagon düzeyi ise sham operasyon uygulanmış grup ile karşılaştırıldığında daha az oranda arttı.

5.) Periferik yolla (İP) uygulanan β adreno reseptör antagonisti propranolol ve α_1 adreno reseptör antagonisti prazosin ön tedavileri, karbakol'ün (ICV) kan glukoz, plazma glukagon ve serum insülin düzeylerine olan etkilerini değiştirmede. α_2 adreno reseptör antagonisti yohimbin ön tedavisi ise, karbakol'ün etkilerini bloke etti.

6.) Bulgular; a) ICV yolla uygulanan karbakol'ün merkezi muskarinik kolinerjik reseptörler aracılığı ile hiperglisemi meydana getirdiğini ve karbakol'ün söz konusu etkisine aracılık eden muskarinik reseptör alt grubunun muhtemelen muskarinik M_1 tipi reseptörler olduğunu göstermektedir. b) Karbakol'ün hiperglisemik etkisinde, dolaşımda artmış olan katekolaminlerin, α_2 adrenerjik reseptörler aracılığı ile pankreasdan glukagon sekresyonunu arttırması, insülin sekresyonunu ise azaltmasının önemli katkısı olduğunu düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahren B., Lunquist I., Jarhult J.: Effects of α_1 -, α_2 - and β - adrenoceptor blockers on insulin secretion in the rat. *Acta Endocrinol.*, **105:78-82**, 1984.
- Ahren B., Taborsky J. G. Jr.: The mechanism of vagal nerve stimulation of glucagon and insulin secretion in the dog. *Endocrinol.*, **118:1551-1557**, 1986
- Ahren B., Veith C. R., Taborsky J., G., Jr: Sympathetic nerve stimulation versus pancreatic norepinephrine infusion in the dog: 1) Effect on basal release insulin and glucagon. *Endocrinol.*, **121:323-331**, 1987.
- Angel I., Langer S. Z: Adrenergic-induced hyperglycemia in anaesthetized rats: Involvement of peripheral α_2 -adrenoceptors. *Europ. J. Pharmacol.*, **154:191-196**, 1988.
- Barlow R. B., Mc Millen L. S., Veale M. A.: The use of 4-diphenylacetoxy-N-(2-chloroethyl)-piperidine (4-DAMP mustard) for estimating the apparent affinities of some agonists acting at muscarinic receptors in guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.*, **102:657-662**, 1991.
- Benzo A. C.: The hypothalamus and blood glucose regulation. *Life Sci.*, **32:2509-2515**, 1983.
- Berthoud H. R., Nijima A., Sauter J-F., Jeanrenaud B.: Evidence for a role of the gastric, coeliac and hepatic branches in vagally stimulated insulin secretion in the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **7:97-110**, 1983.
- Birsdall N. J. M., Hulme E. C.: Muscarinic receptor subclasses. *Trends Pharmacol Sci.*, **11:459-463**, 1983.
- Birsdall N. J. M., Hulme E. C.: The binding properties of muscarinic receptors. *The Muscarinic Receptors*, editör: J. H. Brown, s. 31-91, Humana Press, New Jersey, 1989.
- Birsdall N. J. M., Hulme E. C.: Future directions. *The Muscarinic Receptors*, editör: J. H. Brown, s. 457-471, Humana Press, New Jersey, 1989.
- Blazquez E., Munoz-Barragan L.: Stimulation of gastric glucagon secretion by epinephrine administration in dogs. *Revis. Espanol. Fisiol.*, **46:231-236**, 1990.
- Bloom S. R., Edwards A. V., Ghatei M. A.: Neuroendocrine responses to stimulation of the splanchnic nerves in bursts in the conscious adrenalectomized calf. *J. Physiol.*, **346:519-531**, 1984.
- Blomm S. R., Edwards A. V.: Characteristics of the neuroendocrine responses to stimulation of the splanchnic nerves in bursts the conscious calf. *J. Physiol.*, **346:533-545**, 1984.
- Boyle J. R., Liggett S. B., Shah S. D., Cryer E. P.: Direct muscarinic cholinergic inhibition of hepatic glucose production in humans. *J. Clin. Invest.*, **82:445-449**, 1988.

- Buckley N. J.: Molecular pharmacology of cloned muscarinic receptors. *Transmembrane Signalling, Intracellular Messengers and Implications for Drug Development*, editor: S. R. Nahorski, *chapter 2, s. 11-29, John Wiley and Sons Ltd., London, 1990.*
- Burke R. E.: The relative selectivity of anticholinergic drugs for the M₁ and M₂ muscarinic receptor subtypes. *Mov. Disord.*, **1**:135-144, 1989.
- Cherrington A. D., Stevenson Z. W., Steiner K. E., Davis M. A., Myers S. R., Adkins B. A., Abumrad N. N., Williams P. E.: Insulin, glucagon and glucose as regulators of hepatic glucose uptake and production in vivo. *Diabetes Metab. Rev.*, **3**:307-332, 1987.
- Cryer P. E.: Physiology and pathophysiology of the human sympathoadrenal neuroendocrine system. *N. Engl. J. Med.*, **303**:436-444, 1980.
- Cryer P. E., Gerich J. E.: Glucose counterregulation hypoglycemia, and intensive insulin therapy in diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, **313**:232-241, 1985.
- Darlington D. N., Keil L. C., Dallman M. F.: Potentiation of hormonal responses to hemorrhage and fasting, but not hypoglycemia in conscious adrenalectomized rats. *Endocrinol.*, **125**:1398-1405, 1989.
- Delmundo R. E., Michel A. D., Whiting R. L.: Affinity of muscarinic receptor antagonists for three putative muscarinic receptor binding sites. *Br. J. Pharmacol.*, **96**:457-464, 1989.
- Doods H. N., Mathy M.-J., Davidesko D., van Charldop K. I., Jonge A., Zwieter P. A.: Selectivity of muscarinic antagonists in radioligand and in vivo experiments for the putative M₁-M₂ and M₃ receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **242**:257-262, 1987.
- Esler M., Jennings G., Lambert G., Meredith I., Home M., Eisenhofer G.: Overflow of catecholamine neurotransmitters to the circulation.: source, fate, and functions. *Physiol. Rev.*, **70**:963-985, 1990.
- Giachetti A., Micheletti R., Montagna E.: Cardioselective profile of AF-DX 116, a muscarinic M₂ receptor antagonist. *Life Sci.*, **38**:1663-1672, 1986.
- Giachetti A., Giraldo E., Ladinsky H., Montagna E.: Binding and functional profiles of the selective M₁ muscarinic receptor antagonists trihexyphenidyl and dicyclomine. *Br. J. Pharmacol.*, **89**:83-30, 1986.
- Giraldo E., Hammer R., Ladinsky H.: Distribution of muscarinic receptor subtypes in rat brain as determined in binding studies with AF-DX 116 and pirenzepin. *Life Sci.*, **49**:833-840, 1987.
- Gotoh M., Iguchi A., Yatomi., Uemura K., Miura H., Futenma A., Kato K., Sakamoto N.: Vagally mediated insulin secretion by stimulation of brain cholinergic neurons with neostigmine in bilateral adrenalectomized rats. *Brain Res.*, **493**:97-102, 1989.

- Hammer R., Giraldo E., Schiavi G. B., Monferini E., Ladinsky H.: Binding profile of a novel cardioselective muscarine receptor antagonist, AF-DX 116, to membranes of peripheral tissues and brain in the rat. *Life Sci.*, **38**:1653-1662, 1986.
- Hems D. A., Whitton D. P.: Control of hepatic glycogenolysis. *Am. J. Physiol.*, **60**:1-60, 1980.
- Hiroshi H., Maruyama H., Itoh K., Koyama K., Kido K., Saruta T.: Alpha-2 adrenergic agonism stimulates islet glucagon release from perfused rat pancreas: possible involvement of alpha-2 adrenergic receptor subtype. *Acta Endocrinol.*, **127**:279-283, 1992.
- Honey R., Weir G.C.: Acetylcholine stimulates insulin, glucagon, and somatostatin release in the perfused chicken pancreas. *Endocrinol.*, **107**:1665-1668, 1980.
- Honmura A., Yanase M., Saito H., Iguchi A.: Effect of intrahypothalamic injection of neostigmine on the secretion of epinephrine and norepinephrine and on plasma glucose levels. *Endocrinol.*, **130**:2997-3002, 1992.
- Hoss W., Messer Jr W. S., Miller M. D., Ellerbrock B. R., Scrantan T., Ghodsi-Hovsepian S., Price M. A., Balan S., Mazloum Z., Bohnet M.: Biochemical and behavioral evidence for muscarinic autoreceptors in the CNS. *Brain Res.*, **517**:195-201, 1990.
- Hulme E. C., Birsdall N. J. M., Buckley N. J.: Muscarinic receptor subtypes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**:633-673, 1990.
- Iguchi A., Matsunaga H., Gotoh M., Nomura T., Yatomi A., Sakamoto A.: Central hyperglycaemic effect of adrenaline and carbachol. *Acta Endocrinol.*, **109**:440-445, 1985.
- Iguchi A., Gotoh M., Matsunaga H., Yatomi A., Honmura A., Yanase M., Sakamoto N.: Mechanism of central hyperglycemic effect of cholinergic agonists in fasted rats. *Am. J. Physiol.*, **251**:E431-437, 1986.
- Iguchi A., Gotoh M., Matsunaga H., Yatomi A., Honmura A., Yanase M., Sakamoto N.: Relative contributions of the nervous system and hormones to CNS-mediated hyperglycemia. *Am. J. Physiol.*, **255**:E920-927, 1988.
- Iguchi A., Yatomi A., Gotoh M., Matsunaga H., Uemura K., Miura H., Satake T., Tomagowa T., Sakamoto N.: Neostigmine-induced hyperglycemia is mediated by central muscarinic receptor in fed rats. *Brain Res.*, **507**:295-300, 1990.
- Jarhult J., Andersson P. O., Holst J., Moghimzadeh E., Nobin A.: On the sympathetic innervation to the cat's liver and its role for hepatic glucose release. *Acta Physiol. Scand.*, **110**:5-11, 1980.
- John G. W., Doxey J-C., Walter D. S., Reid J. L.: The role of α - and β -adrenoceptor subtypes in mediating the effects of catecholamines on fasting glucose and insulin concentrations in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **100**:699-704, 1990.

- John G. W., Doxey J-C., Walter D. S., Reid J. L.: Selective α_2 -adrenoceptor blockade does not enhance glucose-evoked insulin release. *Eur. J. Pharmacol.*, **187**:531-536, 1990.
- Kaneto A., Kajinuma H., Kosaka K., Nakao K.: Stimulation of insulin secretion by parasympathomimetic agents. *Endocrinol.*, **83**:651-658, 1968.
- Kilbinger H., Schneider R., Siefken H., Wolf D., D'agastino G.: Characterization of prejunctional muscarinic autoreceptors in the guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmacol.*, **103**:1757-1763, 1991.
- Korner M., Ramu A.: Evidence of central influences on blood glucose level: Malathion hyperglycemia. *Eur. J. Pharmacol.*, **32**:120-123, 1975.
- Korner M., Ramu A.: Central hyperglycemic effect of carbachol in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **35**:207-210, 1976.
- Kunos G.: The hepatic α_1 -adrenoceptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, **5**:380-383, 1984.
- Lacy P. E.; The pancreatic β cell. *N. Eng. J. Med.*, **276**:184-194, 1967.
- Lautt W. W.: Autonomic neural control of liver glycogen metabolism. *Med. Hypotheses*, **5**:1287-1299, 1979a.
- Leach R. P., Shears S. B., Kirk J. C., Titheradge M. A.: Changes in free cytosolic calcium and accumulation of inositol phosphates in isolated hepatocytes by [Leu]-enkephalin. *Biochem. J.*, **238**:537-547, 1986.
- Lee K. C., Miller R. E.: The hepatic vagus nerve and neural regulation of insulin secretion. *Endocrinol.*, **117**:307-314, 1985.
- Londong W.: Present status and future perspectives of muscarinic receptor antagonists. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, **125**:P55-60, 1986.
- Lunquist I.: Cholinergic muscarinic effects on insulin release in mice. *Pharmacol.*, **25**:338-347, 1982.
- Mathews K. C., von Holde K. E.: Biochemistry. *The Benjamin / Cummings Publishing Co., California*, 1990, s. 538-571.
- Melchiorre C., Cassinelli A., Quaglia W.: Differential blockade of muscarinic receptor subtypes by polymethylene tetraamines. Novel class of selective antagonists of cardiac M_2 muscarinic receptors. *J. Med. Chem.* **30**:P201-204, 1987.
- Miller R. E.: Pancreatic neuroendocrinology: Peripheral neural mechanisms in the regulation of islets of Langerhans. *Endocr. Rev.*, **2**:471-494, 1981.
- Migliorini R. H., Garofalo M. A. R., Roselino J. E. S., Kettelhut I. C.: Rapid activation of gluconeogenesis after intracerebroventricular carbachol. *Am. J. Physiol.*, **257**:E486-490, 1989.
- Newsholme E. A., Leach A. R.: Biochemistry for the Medical Sciences, *John Wiley and Sons, London*, 1991, s. 167-240.

- Niddam R., Angel I., Bidet S., Langer S.: Pharmacological characterization of alpha-2 adrenergic receptor subtype involved in the release of insulin from isolated rat pancreatic islets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **254**:883-887, 1990.
- Nijima A.: Glucose-sensitive afferent nerve fibres in the hepatic branch of the vagus nerve in the guinea-pig. *J. Physiol.*, **332**:315-323, 1983.
- Nijima A.: Nervous regulation of metabolism. *Prog. Neurobiol.*, **33**:135-147, 1989.
- Nijima A.: Nervous regulation of blood glucose level. *Jpn. J. Physiol.*, **36**:135-147, 1989.
- Oda S., Ohneda A., Tsuda T., Sasaki Y.: Glucagon and insulin responses to α -adrenergic subtype receptor blockade in sheep. *Comp. Biochem. Physiol.*, **96**:C405-409, 1990.
- Receptor Nomenclature Supplement 1993. *Trend. Pharmacol. Sci.* s. 24, 1993
- Rohner-Jeanrenaud F., Bobbioni E., Ionescu E., Sauter J-F., Jeunrenaud B.: Central nervous system regulation of insulin secretion. *Advances Metabolic Disorders*, Vol:10, s. 193-219, Academic Press, New York, 1983.
- Sacca L.: Role of counterregulatory hormones in the regulation of hepatic glucose metabolism. *Diabetes Metab. Rev.*, **3**:207-229, 1987.
- Sawchenko P. E., Friedman M. I.: Sensory functions of the liver. *Am. J. Physiol.*, **236**:R5-20, 1979.
- Sasaki H., Marubashi S., Yawata Y., Yamatani K., Tominaga M., Katagiri T.: Neuropeptides and glucose metabolism. *The Brain as an Endocrine Organ*, editörler: M. P. Cohen, P. P. Foa, vol. 3, s. 151-191, Springer-Verlag, New York, 1988.
- Schulte B., Volz-Zang C., Mutschler E., Horne C., Palm D., Welstein A., Pitschner H.: AF-DX 116, a cardioselective muscarinic antagonist in humans: pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. *Clin. Pharmacol. Therap.*, **50**:372-378, 1991.
- Schwartz R. D., Davis R. E., Jean J. C., Spencer C. J., Teclé H., Thomas A. J.: Characterization of muscarinic agonists in recombinant cell lines. *Life Sci.*, **52**:465-472, 1993.
- Smith H. P., Davis B. J.: Morphological and functional aspects of pancreatic islet innervation. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **9**:53-66, 1983.
- Sokolowsky M.: Muscarinic cholinergic receptors and their interactions with drugs. *Advances in Drug Research*, vol. 18, s. 432-509, Academic Press Limited, New York, 1989.
- Ungar A., Phillips J. H.: Regulation of adrenal medulla. *Physiol. Rev.*, **63**:787-843, 1983.
- Winkler H., Apps D. K., Fischer-Colbrie R.: The Molecular function of adrenal chromaffin granules: established facts and unresolved topics. *Neuroscience*, **85**:387-393, 1986.
- Woods C. S. Porte Jr. D.: Neural control of endocrine pancreas. *Physiol. Rev.*, **54**:596-619, 1974.

DOĞANMANTAYON MERKEZİ

Yamaguchi N.: Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose: mechanisms involved in the liver, pancreas, and the adrenal gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. *Can. J. Pharmacol.*, **70**:167-206, 1991.

