

T.C.
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Gastroenteroloji Bilim Dalı

**GLUKAGON BENZERİ PEPTİD-1 (GLP-1)'İN UYANIK
SIÇANDA MİDE FONKSİYONLARINA ETKİ
MEKANİZMALARI**

T 60259

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Yüksek İhtisas Tezi
Dr. Neşe İmeryüz
1997

Uzmanlık eğitimimi ve tez çalışmalarımı yönlendiren Nefise Ulusoy'a, bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli imkanları sağlayan ve Fizyoloji Anabilim Dalı ve M. Ü. Hayvan Laboratuvarı çalışanlarına, deneylerin yapılması ve sonuçların değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı Berrak Yeğen, Ayhan Bozkurt, Tamer Coşkun ve Asiye Örtter'e, eğitimim sırasında gösterdikleri dostluk ve yardımları için Gastroenteroloji Bilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	4
Gereçler ve Yöntem	40
Bulgular	48
Tartışma	67
Sonuç	74
Özet	75
Kaynaklar	77

GİRİŞ VE AMAÇ

Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) besin alımını takiben ince barsak endokrin hücrelerinden salgılanan ve sekretin, vazoaktif intestinal peptid (VIP), gastrik inhibitör polipeptid (GIP), growth hormon salgılatan faktör (GHRF) ailesine mensup 30 aminoasitten oluşan bir hormondur (1). İlk kez 1948'de barsak ekstralarında glukagona benzer bir madde saptanıp enteroglukagon olarak adlandırılmıştır. Sonraları enteroglukagonların glukagon dizisi ile benzerlik göstermekle birlikte glukagondan farklı yapılarda peptidler olduğu anlaşılmıştır. Enteroglukagonlarda biri olan GLP-1'in pankreatik glukagon molekülünü kodlayan proglukagon mRNA'sının barsakta ve beyinde translasyon sonrasında farklı bir şekilde işlenmesiyle ortaya çıktığı anlaşılmıştır (2).

GLP-1'in tanımlanan ilk biyolojik fonksiyonu inkretin etkisidir (3,4). Ağız yoluyla alınan glikoz intravenöz yolla verilen aynı miktardaki glikozdan daha fazla insülin salgılanmasına neden olur ve kan şekeri bazal değere göre daha az yükselir. Ağız yoluyla alınan besinlerin daha çok insülin salgılatmasına 'inkretin etki', bu etkiye aracılık eden barsak hormonlarına 'inkretin hormonlar' denir (1,5). 1983'de bilinen ilk inkretin hormonu GIP'in inkretin etkinin ancak yarısından sorumlu olduğu, başka hormonların da bu mekanizmada yer almasının gerektiği öne sürülmüş (1) ve ilk defa 1987'de GLP-1'in insanlarda inkretin etkisinin olduğu gösterilmiştir (4). GLP-1 endokrin pankreastan insülin ve somatostatin salgısını artırır, glukagon salgısını azaltır (6,7,8,9), insülin mRNA'sının ekspresyonunu ve translasyonel biyosentezini uyarır (10). Ayrıca GLP-1'in sağlıklı kişi ve insüline bağımlı olmayan

diabetiklere (NIDDM) eksojen olarak verildiğinde gerek besin gerekse parenteral glikoz ile uyarılan insülin salgısını artırdığı ve kan glikoz seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir (4,11,12,13). Bu nedenle GLP-1'in NIDDM'da farmakolojik kullanımı hakkında araştırmalar yapılmaktadır (14,15,16,17,189).

İnsan ve diğer memelilerde GLP-1'in eksojen olarak uygulanmasında dikkati çeken bir özelliği de mide boşalmasında gecikme ve asit salgısında inhibisyona sebep olmasıdır. Eksojen yolla verilen GLP-1'in sağlıklı insanlarda (19,20,21,22) ve köpeklerde (23) kalorik değeri olan ve olmayan (23) besinlerin mideden boşalmasını geciktirdiği, yemek yemekle uyarılmış antral kontraksiyonları azalttığı, pilor tonusunu artırdığı (21,22,23), insanlarda yemekle (24,25) ve pentagastrinle uyarılmış (19) asit salgısını azalttığı gösterilmiştir. GLP-1'in gastrointestinal etkilerinin mekanizması henüz araştırılmamıştır. Yalnızca yalandan yeme ile uyarılmış asit salgısının GLP-1 perfüzyonu ile inhibe olmasından (26) dolayı GLP-1'in asit salgısını inhibe etme mekanizmasında santral sinir sisteminin rol oynayabileceği öne sürülmüştür.

GLP-1'in yukarıda bahsedilen gastrointestinal etkileri 'ileal fren' mekanizmasında yer alan barsak hormonlarından biri olduğunu düşündürür. İleal fren, kısaca barsak lumenindeki besinlerin daha proksimalde yer alan gastrointestinal sistemin salgı fonksiyonunu ve hareketlerini inhibe etmesi olarak tarif edilir. İleumun karbonhidratlar ve yağlarla perfüzyonunun mide salgını ve ince barsak hareketlerini inhibe etmesi, bu sırada kanda enteroglukagon ve peptid YY (PYY) düzeylerinin yükselmesi GLP-1'in ileal fren mekanizmasında PYY ile birlikte rol oynadığı düşüncesini destekler (27,28,29). Ancak şimdiye kadar endojen GLP-1'in

gastrointestinal sistem üzerindeki etkilerini araştıran ve bu mekanizmadaki rolünü kanıtlayan bir çalışma yapılmamıştır.

Merkezi sinir sisteminde gastrointestinal fonksiyonları da düzenleyen merkezler olan hipotalamus (30,31,32,33,34,35) ve nükleus traktus solitarius (NTS) (34,35,36,37) ile beyin sapına ait diğer yapılar da GLP-1 ve reseptörlerinin (38,39,40) bulunduğu uzun süredir bilinmekteydi. Ancak GLP-1'in santral fonksiyonları fonksiyonları henüz aydınlatılmamıştı. İlk defa 1996'da GLP-1'in beslenme ve su içme davranışının merkezi regülasyonunda rol oynadığı gösterildi (41,42,43). Yine 1996'da kan-beyin bariyeri olmayan, dolayısıyla humoral değişiklikleri saptayabilen area postrema ve subfornical organdaki GLP-1 reseptörlerine ligandlarının sistemik dolaşım yoluyla ulaşabileceği gözlendi (44). Santral GLP-1 ve reseptörlerinin otonomik sinir sistemi ile merkezi sinir sistemi arasında ilişkiyi sağlayan hipotalamus, nukleus tractus solitariusun (45), humoral değişikliklerin de izlenebildiği bölgelerde bulunması (area postrema, subfornical organ) (46) ve eksojen GLP-1'in beslenme ve su içme davranışlarını değiştirmesi GLP-1'in otonom fonksiyonların düzenlenmesinde görev alan bir nörotransmitter olduğunu düşündürmektedir. GLP-1'in gastrointestinal etkilerinde merkezi yapıların rolünü araştıran bir çalışma yoktur.

Bu çalışmanın amacı; 1) endojen yolla salgılanan GLP-1'in mide fonksiyonları üzerindeki etkisini inceleyerek ileal fren mekanizmasındaki muhtemel yerini açıklığa kavuşturmak ve 2) mide boşalması ve asit salgısının merkezi kontrolünde GLP-1'in rolünü araştırmaktır. Bu amaçla periferik ya da santral yolla eksojen verilen ya da intragastrik glikoza cevaben endojen salgılanan GLP-1'in uyanık, kronik gastrik fistüllü sıçanlarda mide boşalma hızına ve asit salgısına etkisi incelenmiş, etki

mekanizmaları spesifik reseptör antagonisti ekzendin 9-39 amid, vagal afferent denervasyon, periferik kolinerjik ve adrenerjik blokaj yardımıyla araştırılmıştır.



GENEL BİLGİLER

GLUKAGON BENZERİ PEPTİD-1

GLP-1 ince barsağın endokrin hücrelerinden biri olan L hücrelerinden salgılanır, sekretin, vazoaaktif intestinal peptid (VIP), gastrik inhibitör polipeptid (GIP), growth hormon salgılatan faktör (GHRF) ailesine mensup bir enteroglukagondur (1). Barsak kaynaklı GLP-1'in başlıca yapım yeri ileum olmakla (1,47,48) birlikte jejunumda (49) ve kolonda da (50) sentezlendiği bilinmektedir.

GLP-1'in Tanımlanması

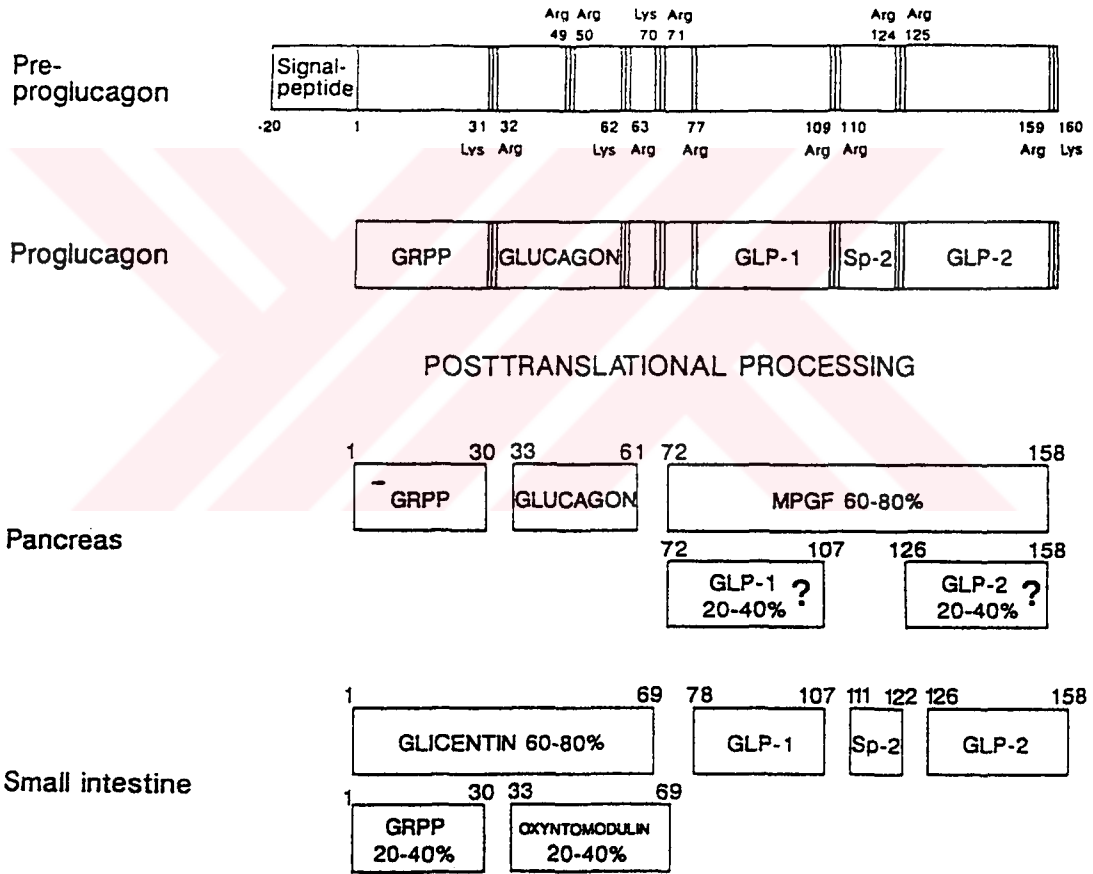
İlk kez 1948'de Sutherland ve arkadaşları köpek mide mukozasından hiperglisemik özelliklere sahip bir madde ekstrakte etmişlerdir. Daha sonra başka bir çalışma ile köpek mukozasında endokrin A-benzeri hücrelerin gerçekten de glukagon ürettiği ispatlanmıştır. Glukagonun pankreas dışında da üretildiği kavramı radioimmunoassay yönteminin gelişmesinden sonra barsak ekstrelerinde glukagon ile çapraz reaksiyon veren peptidlerin (glukagon benzeri immunoreaktivite (GLI)) bulunmasıyla desteklenmiştir. 1968'de glukagon benzeri immunoreaktivite veren peptidlerin birden çok olduğu, bunların birbirlerinden ve pankreatik glukagondan farklı olduğu gösterilmiştir. 1976'da barsakta GLI gösteren ve tam glukagon dizisi içeren iki ayrı peptidin, oksintomodulin ve glisentinin aminoasit dizisi aydınlatılmıştır. Daha sonra glisentinin dizisinin -N terminal uzantısının pankreasta da bulunduğu ve glukagonla paralel olarak salgılandığı gösterilip 'glisentine ilişkili pankreatik polipeptid' (GRPP) olarak adlandırılmıştır. Pankreas adacık hücrelerinde

glukagon biyosentezini araştıran çalışmalar 1981'de glukagonla birlikte salgılanıp glukagon dizisi içermeyen başka bir polipeptidin varlığını göstermiş, diziyeye 'major proglukagon fragmanı' (MPGF) adı verilmiştir (1,2,51). 1983'de insan (52) ve hamsterlerde (53) proglukagon mRNA'sının ve geninin yapısı aydınlatıldıktan sonra major proglukagon fragmanının glukagona benzeyen iki ayrı aminoasit dizisi içerdiği görülmüş, bu diziler glukagon benzeri peptid 1 ve 2 olarak adlandırılmıştır. Sonraları bu iki peptidin pankreasta tek bir molekül içinde MPGF birlikte buldukları, barsakta ise ayrı ayrı bulunup salgılandıkları gösterilmiştir (47,48). Dizi analizlerii yapılarak insan barsağında proglukagon molekülünün 78-107. aminoasitlerinin ayrılmasıyla GLP-1'in aktif şekli güdük (truncated) GLP-1'in meydana geldiği (3) ve molekülün -COOH ucunun amidlendiği (54) anlaşılmıştır.

GLP-1'in Yapısı

Proglukagon geni içeren bütün dokularda 6 ekson ve 5 introndan oluşan tek bir proglukagon geni vardır. Proglukagon geni insanda 2. kromozomun uzun bacağında bulunur. Eksonlar bir sinyal peptidini ve 5 ayrı gen ürününü kodlar (1,55). Pankreasta genin translasyondan sonra işlenmesiyle ortaya çıkan başlıca ürünler glukagon (PG 33-61) ve glisentine ilişkili pankreatik polipeptid (GRPP; PG 1-30), ara peptid I (PG 64-69)dur. -COOH ucunda yer alan bölüm majör pankreatik proglukagon fragmanı (MPGF; PG 72-158) glukagonla birlikte salgılanır, biyolojik ve fizyolojik işlevi bilinmemektedir (1,55) (şekil 1.). İnsan pankreas dokusunda az miktarda GLP-1₁₋₃₇ ve GLP-1₁₋₃₆ gösterilmiştir, bu ürünler pankreastaki toplam GLP-1 immunoreaktivitesinin %29'undan sorumludur (56). Pankreasta çok az miktarda GLP-2 de bulunur (6). İnce barsak L hücrelerinde ise başlıca gen ürünleri glisentini (PG 1-

69), glukagonun -COOH ucunda uzamış şekli oksintomodulin (PG 33-69), glukagon benzeripeptid-1 (GLP-1 1-37; PG 72-108), glukagon benzeri peptid - 2 (PG126-158) ve ara peptid ildir (PG 111-123) (1,55).



Şekil 1. İnce barsak ve pankreasta proglukagon geninin yapısı ve işlenmesi (55).

Bütün memelilerde proglukagon dizisinin GLP-1'e tekabül eden bölümü aynıdır(54). GLP-1 proglukagon molekülünün Arg⁷⁷ seviyesinde monobazik ve Arg¹⁰⁹-Arg¹¹⁰ seviyesinde dibazik kırılmasıyla ortaya çıktığı söylenebilir (55). GLP-1 (1-37) karboksipeptidaz enziminin yardımıyla biyolojik aktif biçimi olan GLP-1 (7-37) (PG 78-108) ye dönüşür. Bir bölüm GLP-1 (7-37) nin -COOH ucundaki son aminoasit glisin ayrılır, peptidilglisin α amid monooksijenaz enzimi yardımıyla glisinden bir önceki a karboksil grubu amidlenir (6), GLP-1 (7-36) amid (PG 78-107 amid) hormonun en sık rastlanan biyolojik aktif şeklidir (54), sıçanlarda dolaşımdaki GLP-1'in 2/3'si aç insanlarda ise yarısı amid şeklindedir (56). GLP-1 amid intestinal GLP-1, güdük GLP-1 olarak da adlandırılır.

GLP-1'in Metabolizması, Tayin Yöntemleri ve Plazma Konsantrasyonları

GLP-1'in böbrekler ve damar yatağındaki enzimlerle dolaşımdan uzaklaştırılır. İn vitro (57,58) ve in vivo (59) çalışmalarda insan serumundaki muhtemelen endotel kaynaklı dipeptidil dipeptidaz-IV enziminin NH₂ ucundaki dipeptidi (histidin ve alanin) uzaklaştırarak hormonu inaktif şekli GLP-1₉₋₃₇ amide dönüştürdüğü gösterilmiştir. Yıkım ürünleri, sağlam olan -COOH ucu nedeniyle peptidin reseptörlerine afinitesini sürdürüp parsiyel antagonist etki yapabileceğinden ve yalnızca -COOH ucunu ya da peptidin ortasındaki aminoasit dizisini araştıran tayin yöntemlerinin yanlış sonuç vermesine neden olabileceğinden önem taşır.(60)

Sıçanlara iv bolus şeklinde verilen GLP-1'in yarılanma ömrü 3- 8.2±0.4 dakikadır (51,61,62). İnsanlarda yarılanma ömrü 3-15 dakika arasında değişir. GLP-1'in metabolik klirens hızı ise yaklaşık 10 dakikadır.

GLP-1 miktarı genellikle radioimmunoassay (RIA) ve çeşitli kromatografik yöntemler birlikte kullanılarak tayin edilir. RIA yönteminde GLP-1 7-36 dizisini (56), amidlenmiş (56) ya da amidlenmemiş (64) -COOH ucunu ve NH₂ ucunu (59) tanıyan antiserumlar kullanılır. NH₂ ucunu tanıyan antiserumlarla elde edilen sonuçlar inaktif metabolitler ölçülmediğinden daha doğrudur. Son yıllarda özellikle eksojen yolla verilen hormonunu plazma konsantrasyonunun tayininde sandviç ELİSA yöntemi de kullanılmaktadır (65).

Sıçanlarda RIA ile -COOH ucunu tanıyan antiserum kullanılarak tayin edilen plazma konsantrasyonu açlıkta 1.5 ± 0.5 pmol/L, intraduodenal 5.6 mmol/kg glikoz perfüzyonundan 5 dakika sonra 5.7 ± 1.1 pmol/L, 10 dakika sonra 3.5 ± 0.7 pmol/L, 20 dakika sonra 3.6 ± 1.3 pmol/L, 30 dakika sonra 1.9 ± 0.4 pmol/L'dir (66). Bazal plazma GLP-1 seviyesi 0.3 ± 0.1 pmol/olan sıçanlara 1 mg/kg GLP-1 iv verildikten sonra antiserum B5 kullanılarak tayin edilen plazma konsantrasyonu 2. dakikada 7.0 ± 1.2 , 5. dakikada 1.2 ± 0.2 , 8. dakikada 0.6 ± 0.1 , 15. dakikada 0.3 ± 0.2 pmol/L'dir (61).

Sağlıklı kimselerde açlık plazmasında GLP-1 konsantrasyonu RIA ile antiserum 2135 kullanıldığında 20.5 ± 5 pmol/L ile 43.7 ± 8.7 pmol/L arasında değişir (17,19,67,68). -COOH ucunu gören antiserumlarla bulunan açlık konsantrasyonları ise 1-10 pmol/L dir (18,64,69).

Endojen GLP-1 Salgısının Fizyolojik Regülasyonu

GLP-1 salgısının fizyolojik uyararı ağızdan karışık besin alınmasıdır. Ağızdan karışık sıvı besin alındıktan 5 dakika sonra kan GLP-1 konsantrasyonu artmaya başlar, 15-20 dakikada en üst değere ulaşır, 30. dakikadan sonra azalır

(4,11,70,71,72). Günün ilk öğünüyle artan salgı gün boyu yüksek kalır, ana öğünlerden sonra daha da artar, gece açlık seviyelerine döner (70,72). Postprandiyal salgının miktarı alınan besinlerin türü ve miktarına göre değişir (72). GLP-1'in salgılanması için besinin barsak lumeninde bulunması gerekir, intravenöz yolla verilen besinlerin GLP-1 salgısı üzerinde etkisi yoktur (67).

İntestinal hücre kültürlerinde (73,74) ve izole barsak preparatlarında (29,71,75,76,77) yapılan çalışmalar GLP-1 salgısının besinlerin L hücrelerinin mikrovilluslarına temasıyla uyarıldığını düşündürür. Ancak besinlerin terminal ileuma ulaşmasına yetmeyecek kadar kısa bir sürede GLP-1 kan konsantrasyonunun artmaya başlaması (64,71), insanlarda yalnızca su içmekle kan GLP-1 seviyesinin artması (71), oral yolla alınan glikozun intraduodenal yolla verilen aynı miktardaki glikozdan daha fazla GLP-1 salgılatması (78) GLP-1 salgısında direkt mukozal temastan başka santral mekanizmaların, üst gastrointestinal sistemden başlayan reflekslerin ya da humoral faktörlerin de rol oynadığını gösterir.

Barsak lumeninde bulduklarında GLP-1 salgısını uyaran başlıca besinler yağlar (29,71,73,74,79,80) ve karbonhidratlardır (64,71,75,76,77,79,80,81). Proteinler sıçan (71) ve insan (28,80) ileumuna perfüzyonla verildiklerinde GLP-1 konsantrasyonunu değiştirmezler ancak köpekte ileumun proteinle perfüzyonu (29) GLP-1 salgısını uyarır. Safra asitleri ve pektinin kolon mukozasıyla teması da kan GLP-1 seviyesini artırır (82,83).

Barsakta metabolize olan ve olmayan (3-O-metil glikoz) şekerler GLP-1 salgısını uyarırlar ancak etkili olabilmeleri için barsak lumeninden emilmeleri (77) ve

Na/glikoz kotransportörüne bağlanmaları gerekir (75). Yalnız bazı özel moleküler yapısını taşıyan şekerlerin GLP-1 salgısı üzerinde etkili olduğu öne sürenler de vardır (76). İnsanlarda oral yolla alına glikoz solusyonu ancak duodenuma giren kalorik yük 1.4 kcal/dakikayı geçtiğinde GLP-1 salgısını uyarır (64).

Fötal sıçan intestinal hücre kültürlerinde protein kinaz A (PKA) yolunun reseptör ve reseptör dışı mekanizmalarla aktivasyonu uyarıdan 4-48 saat sonra proglukagon mRNA'sını (GLP-1 sentezinin) artırır (84). Aynı hücrelerde PKA aktivasyonu, protein kinaz C (PKC) aktivasyonu ve intrasellüler Ca^{+2} artması (84) ve kolinerjik agonistler (84,85) GLP-1 sekresyonuna yol açar. M_3 reseptör antagonistleri bu etkiyi ortadan kaldırır (85). Kalsitonin geniyle ilişkili peptid (CGRP) ve GIP reseptörlerine bağlanıp PKA'yı aktive ederek, bombesin/gastrin salgılatan peptid (GRP) PKC'yi aktive ederek GLP-1 salgısını artırır, somatostatinin (28 ve 14) etkisi salgı inhibisyonudur (84).

İzole sıçan ileumunda yapılan çalışmaların sonuçları da hücre kültürlerinden elde edilen sonuçlara benzer (86,87). Kolinerjik agonistler, CGRP, GIP, bombesin/GRP GLP-1 salgısını artırır. Buna karşılık in vivo çalışmalardaki bulgular farklıdır. Domuzlarda ileum eksterensek sinirlerinin uyarılması GLP-1 salgılanmasını sağlamaz (6). Sağlıklı kimselerde eksokrin pankreas salgısını inhibe eden dozlarda atropin infüzyonu 100 g glikoz içildikten sonra artan kan GLP-1 konsantrasyonunu değiştirmez (71), eksojen GIP infüzyonu plazma immunoreaktif GLP-1 düzeyini değiştirmez (88) buna karşılık GRP antagonisti infüzyonu postprandiyal GLP-1 salgısını azaltır (86).

GLP-1 Reseptörleri, İkincil Ulak Sistemleri

GLP-1 reseptörleri G proteinlere bağlanan, 7 transmembran parçası olan reseptör ailesindedir, 463 aminoasitten oluşur. Çeşitli türlerde yapısı korunur, insan ve sıçan reseptörünün aminoasit dizisi %90 aynıdır (89,90). İnsanda GLP-1 reseptör geni 6. kromozomun kısa bacağında p21.1 bandında yer alır, majör histokompatibilite genlerine komşudur (91). Çeşitli dokulardaki GLP-1 reseptörünün yapısı (aminoasit dizisi, mRNAsı, cDNAsı) pankreas B hücrelerindeki reseptörle aynıdır (92).

GLP-1 reseptörü yüksek afiniteyle GLP-1 7-36 amid, ekzendin 4 ve ekzendin 9-39 amid bağlar. GLP-1 ve ekzendin 4 agonist, ekzendin 9-39 ise antagonist etki gösterir (90) (bkz. reseptör antagonisti). Glukagon ve glukagon-sekretin ailesinin diğer üyeleri glukagon reseptörüne bağlanmaz.. GLP-1 1-36 amid ve oksyntomodulin pankreas β hücresi reseptörleri için zayıf ligandlardır (90,93).

GLP-1 reseptörlerinin başlıca ikincil ulak sistemi Gs subunitesi ile uyarılan siklik adenosin monofosfatdır (cAMP). GLP-1 7-36 amid, ve ekzendin 4 etkisiyle pankreas β (8,9,94,95,96,97), ve δ (8,9) hücrelerinde, insülinoma hücrelerinde (97,98), pankreas β hücre reseptörü ile transfekte over hücrelerinde (93), pankreas asinus hücrelerinde (99,100), mide parietal hücrelerinde (101), şef hücrelerinde (100,103), mide tümörü hücrelerinde (6), mide mukozasında (104), beyin hücrelerinde (30,35,105), yağ dokusu hücrelerinde (106,107), akciğer muköz salgı bezi hücreleri ve düz kas hücresi membranlarında (108) adenilat siklaz aktivasyonu ve cAMP artışı gösterilmiştir. GLP-1 reseptörleri bulunan karaciğer ve çizgili kas dokusunda ise intrasellüler cAMP artışı gösterilememiştir, peptidin etkisi ve ikincil ulak sistemleri

tartışmalıdır. Pankreas β hücrelerinde GLP-1 reseptörlerinin adenilat siklazı aktivasyonundan (96,97) başka fosfolipaz C'yi aktive ederek inozitol trifosfat yoluyla intrasellüler Ca^{+2} 'u artırdığı da öne sürülmektedir (95,109). Adenilat siklaz aktivasyonu ile artan cAMP protein kinaz A'yı (PKA) aktive eder (110). Ligand afinitesi ve PKA aktivasyonunun sonraki basamaklar reseptörün bulunduğu hücreye göre değişir.

GLP-1 Reseptör Antagonisti

İlk defa 1991'de Haloderma suspectum zehirinde bulunan ekzendin-4 isimli peptidin kobay asinus hücresinde cAMP yapımını uyarıcı etkisinin peptidin bir fragmanı olan ekzendin 9-39 ile inhibe olduğu görülmüş, ekzendin 9-39'un ekzendin reseptörleri için antagonist olduğu öne sürülmüştür (111). Sonraları GLP-1 7-36 amidin kobay asinus hücrelerindeki etkilerinin ekzendin-4 ile aynı olduğu (cAMP miktarı artar), ekzendin 9-39'un kompetitif olarak reseptöre bağlanıp GLP-1'in cAMP yapımını artırıcı etkisini ortadan kaldırdığı bulunmuştur (99). İlk kez bu çalışmayla ekzendin 9-39'un GLP-1 bağlayan reseptörler için etkili bir antagonist olduğu ve GLP-1'in fizyolojik etkilerini araştırmakta kullanılabileceği ortaya çıkmıştır.

Ekzendin 9-39 amid in vitro (93,98,100,103,108) sistemlerde ekzendin-4 ve GLP-1'in intrasellüler cAMP'yi artırıcı etkisi kompetitif olarak inhibe eder. İn vitro sistemlerde ekzendin 9-39 amid ve GLP-1 7-36 amidin etkili dozlarının oranı 10:1 ile 2:1 arasında değişir (93,98,100,112).

Ekzenden amid uyanık sıçanlarda GLP-1'in inkretin etkisini %65 oranında inhibe eder (66), postprandiyal insülin salgısını %48 azaltır (112). Sağlıklı uyanık babonlarda endojen GLP-1'in etkisini antagonize ederek postprandiyal insülin salgısını azaltır, plazma glukagon ve glikoz konsantrasyonunu artırır (113). Santral GLP-1 injeksiyonu ile azalan yemek yeme (41,42) ve su içme (42) davranışı önceden ekzenden verilirse normal kontrollardakine benzer. İn vitro sistemlerde ekzenden 9-39 amid ve GLP-1 7-36 amidin etkili dozlarının oranı 15:1 ile 10:1 arasında değişir (41,42,66).

Ekzenden-4 ve GLP-1 7-36 amid'in amino asit dizileri %53 oranında benzerdir. Ekzenden 9-39 39 aminoasitten müteşekkil ekzenden-4 dizisinden amino ucundaki 8 aminoasidin ayrılmasıyla ortaya çıkar (100). Ekzenden 4 ve GLP-1'in amino ucundaki 8 aminoasidin 7'si aynıdır, ekzenden 9-39'da bu dizi bulunmaz. Kalan 22 aminoasidin 9'u her üç peptidde de bulunur. Bu bulgularla -COOH ucundaki bazı dizilerin reseptöre bağlanmak için yeterli olduğu, fonksiyon için amino ucunun son 8 aminoasit dizisinin gerektiği düşünülebilir (57,90). Ekzenden amidin bilinen parsiyel agonist etkisi yoktur (93).

GLP-1'in Biyolojik Etkileri

1- Metabolik Etkileri

a- Pankreasın endokrin salgılarına etkisi

İlk kez 1987'de GLP-1'in perfüze izole perfüze domuz pankreas preparatlarında insülin salgısını artırdığı gösterilmiştir (3). İnsülin salgısını artırıcı etki köpek, sıçan ve koyun pankreas preparatlarında ve uyanık köpek ve koyunda da

gözlenmiştir (2). Aynı yıl sağlıklı insanlarda GLP-1 perfüzyonunun açlıkta ve iv glikoz infüzyonu sırasında kan insülin konsantrasyonunu artırdığı, glikoz ve glukagon konsantrasyonunu düşürdüğü bulunmuştur (4). İzleyen çalışmalarda GLP-1'in insülin salgısını artırması için ortamda glikozun bulunması gerektiği (13,94), etkisinin GIP ile sinerjistik olduğu (114), pankreas β hücrelerinde proinsülin mRNA ekspresyonunu ve translasyonel biyosentezini artırdığı gösterilmiştir (10). Insulin (BTC-1) hücre kültürlerinde radyoligand binding (8), sıçan β hücresi genetik materyalinde (9) Northern Blotting (NB) ve Western Blotting (WB) yöntemleriyle spesifik GLP-1 reseptörleri, reseptör mRNA ve DNAsı bulunduğu, bu hücrelerde GLP-1 etkisiyle intrasellüler cAMP ve hormon salgısı arttığı gözlenmiştir.

GLP-1'in pankreatik reseptörleri ve ikincil ulak sistemleri

GLP-1'in insülin salgısını pankreas adacık β hücrelerindeki reseptörleri aracılığıyla uyarır. GLP-1 reseptörlerinin başlıca ikincil mesaj sistemi cAMP'dir. Adenilat siklaz aktivasyonu hücrede cAMP yapımını artırır, protein kinaz A (PKA) aktive olarak birden çok fosfoproteini fosforilize/ defosforilize eder (110). PKA'nın etki ettiği proteinlerden birinin metabolik yolla regüle olan K^+ kanalları üzerindedir, ATP'ye duyarlı K^+ kanallarını inhibisyonu hücrenin depolarize olmasını sağlar (94). Glikozun insülin salgılatıcı etkisi de aynı kanallar üzerindedir, bu nedenle GLP-1 β hücrelerinin glikoz kompetansını sağlar (94,96). İnsülinoma hücrelerinin ancak %20'si glikozla uyarılırken ortama çok az miktarda GLP-1 eklenmesi glikozla uyarılan hücrelerin oranını %80'e çıkarır (96). Pankreas B hücre kültürlerinde ekstrasellüler K^+ 'un artması (96,109) ya da PKA'nın forskolinle aktive edilmesi (110)

de glikoz olmasa dahi insülin salgısını uyarır. GLP-1 mekanizması bilinmemekle birlikte aminoasitlerle uyarılmış insülin salgısını da artırır (115).

K^+ kanallarının kapanması membran depolarizasyonuna ve voltaja bağımlı L tipi Ca^{+2} kanallarının açılmasına yol açar, intrasellüler Ca^{+2} miktarını artır (94,96,109). GLP-1'in L tipi Ca^{+2} kanallarına doğrudan etkisi yoktur. İntrasellüler Ca^{+2} 'un artması inozitol trifosfatı (IP_3) artırır ancak ekstrasellüler Ca^{+2} ortamdan uzaklaştırılırsa bu etki görülmez. IP_3 aktivasyonunun PKA aktivasyonuna sekonder olduğu düşünülebilir (96,109). Başlangıçta az miktarda artan intrasellüler Ca^{+2} , PKA varlığında IP_3 reseptörünü fosforilize ederek intrasellüler Ca^{+2} miktarını daha da artırır ya da ryanodine reseptörünü (muhtemel) fosforilize eder (96) Bu mekanizmaların biriyle çoğalan intrasellüler Ca^{+2} , intrasellüler Ca^{+2} depolarını sitoplazmaya salınmasına neden olur (Ca^{+2} mediated Ca^{+2} release) (96). İntrasellüler Ca^{+2} miktarının artması insülin ekzositozunu başlatan en önemli uyarandır. GLP-1'in B hücrelerinde ATP'ye duyarlı K^+ kanallarının inhibisyonu ve Ca^{+2} homeostasisinden başka yüksek intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonlarında direkt etki ile insülin salgısını artırdığı sanılmaktadır (116).

GLP-1 reseptörü ligandının tekrar tekrar bağlanması (homolog) ya da protein kinaz C aktivasyonu (heterolog) ile fosforilize olarak desensitize olur (110). L tipi Ca^{+2} kanal blokeri nifedipin BTC3 fare insülinoma kültürlerinde GLP-1'in intrasellüler Ca^{+2} artırıcı etkisini önler. BTC3 fare insülinoma kültürlerinde homolog desensitizasyonun ortadan kalkması için gereken süre 60 dakikadır (109).

GLP-1'in glukagon ve somatostatin salgısı üzerine etkileri

GLP-1 pankreastan glukagon salgılanmasını azaltır. İzole domuz pankreasında, yüksek dozlardaki GLP-1'in glukagon salgısını inhibe ettiği gösterilmiştir (7). İzole sıçan pankreası ve adacık hücrelerinde ise glukagon salgısını değiştirmedeği ve azalttığına dair yayınlar vardır (6). Gece açlığından sonra normal kimselere fizyolojik dozlarda infüzyonla verilen GLP-1 glukagon salgısını %30-50 azaltır. (6), NIDDM'lu kimselerde de bu etki korunur (117). Glukagon salgısının GLP-1 etkisiyle artan insülin ve somatostatinin ya da B hücrelerine bağlanan GLP-1'in parakrin etkisiyle azaldığı sanılmaktadır (8,9). Glukagon (INR1G9) salgılayan hücrelerde radyoligand binding yöntemiyle spesifik GLP-1 bağlanması, intrasellüler cAMP seviyesi ve hormon salgısında artış gösterilememiştir (8).

GLP-1 somatostatin salgısını da etkiler, izole perfüze domuz (7) ve köpek (118) pankreasında somatostatin salgısını artırır. Somatostatin (RIN1027-B2) salgılayan hücre kültürlerinde radyoligand binding yöntemiyle spesifik GLP-1 reseptörleri gösterilmiştir. Bu hücrelerde GLP-1 etkisiyle intrasellüler cAMP ve hormon salgısı (insülin ve somatostatin) artar (8).

Sağlıklı insanlarda GLP-1 infüzyonundan sonra portal venöz plazmada insülin/glukagon oranı artar. İnsülin lehine artan oran karaciğerde glikoz yapılmasını inhibe eder, kan glikoz konsantrasyonu düşer. Kan glikoz seviyesi düştüğü halde kandan glikoz uzaklaştırılması sürdüğünden glikoz klirensi artar (119).

GLP-1'in diabet tedavisinde potansiyel kullanım olanakları

Eksojen GLP-1, hipoglisemi yapmadan kan şekerini düşürdüğünden (13), diğer inkretin hormon GIP'den farklı olarak diabetiklerde de kan şekeri üzerindeki etkisini koruduğundan (117,120) diabet tedavisinde deneysel olarak kullanılmaktadır. İlk kez 1992'de Gutniak ve arkadaşları GLP-1 perfüzyonunun NIDDM'li ve insüline bağımlı diabetiklerde (IDDM) eksojen insülin ihtiyacını azalttığını, IDDM'lu hastalarda normoglisemi sağlandığında glikoz utilizasyonunu %10-15 artırdığını gösterdiler (11). Sonraki çalışmalarda GLP-1'in NIDDM'lu hastalarda açlık şekerlerini de düşürdüğü (14), sc GLP-1 enjeksiyonlarının NIDDM'lu hastalarda postprandiyal hiperglisemiyi kontrol ettiği (15), sağlıklı kimselerde ağız mukozasından emilen tabletlerin etkili olduğu (16), NIDDM'da iv GLP-1 perfüzyonunun oral sulfonilüre grubu antidiabetiklerin etkilerini potansiyelize ettiği (17) gösterildi. Son olarak da GLP-1'in IDDM'lu hastalarda insülin sekresyonunu çok değiştirmemekle birlikte muhtemelen glukagon salgısını baskılamak yoluyla postprandiyal hiperglisemiyi önlediği ancak açlık hiperglisemisini düzeltmediği gösterildi (18).

Normal ve NIDDM'lu kimselerde intravenöz glikoz tolerans testi sırasında GLP-1 infüzyonu yapılırsa, tuzlu su infüzyonuna göre insülin salgısı anlamlı olarak artmadığı ve insülin sensitivitesi değişmediği halde kandan glikoz daha çabuk kaybolur (12). GLP-1'in daha fizyolojik dozları ve 50 g yağ yemekle uyarılan endojen GLP-1 salgısı da aynı etkiyi gösterir, insülin salgısı ve insülin salgısındaki artıştan bağımsız glikoz kullanımı artar (69). Kan glikozunun insülin etkisinden bağımsız olarak azalmasının nedeni karaciğerden glikoz salınımının azalması ya da periferik

dokularda glikoz kullanımının artmasıdır. GLP-1'in kas ve karaciğer dokusunda glikojen sentezini artırdığı (121,122) yağ dokusunda insüline benzer şekilde yeni lipid yapımını uyardığı gösterilmiştir (70). Buna karşılık karaciğer, yağ dokusu ve çizgili kasta GLP-1 reseptörlerinin varlığı halen tartışmalıdır.

b- Çizgili kas üzerindeki etkileri

Şimdiye kadar tek bir çalışmada sıçan çizgili kas dokusunda northern blotting (NB) yöntemiyle uzun süreli inkübasyon sonucunda az miktarda GLP-1 reseptör mRNAsı gösterilmiştir (95). Sıçanlarda NB (89) ve radyoligand binding assay (Kanase), insanlarda RNase protection assay ile çizgili kas dokusunda pankreatik GLP-1 reseptör mRNAsına eş bir dizi gösterilememiştir.

Çizgili kastaki GLP-1 reseptörlerinin fonksiyonel anlamı konusu da tartışmalıdır. Bir grup araştırmacı radyoligand binding assay yöntemiyle GLP-1 7-36 amidin yüksek, GLP-1 1-36 amidin düşük afiniteyle sıçan düz kas plazma membranına spesifik olarak bağlandığını ancak yüksek dozlarda dahi intrasellüler cAMP'yi artırmadığını bulmuştur (123). Bulgular, kastaki reseptörlerin pankreastaki reseptörlere göre yapısal yada ikincil ulak sistemleri bakımından farklı olduğunu düşündürür. Aynı çalışma grubu izole sıçan soleus kası üzerinde GLP-1 7-36 amidin glikolitik ve glikojenik etkileri olduğunu bulmuşken (121) bir başka araştırmacı grubu aynı tür, çalışma düzeneği, peptid ve dozlarını kullanarak böyle bir etki gösterememişlerdir (124). GLP-1'in çizgili kastaki glikojenik etkisini glikojen sentetaz enziminin aktivitesini artırarak gösterdiği, adenilat siklazı aktive etmediği öne sürülmektedir.

c- Karaciğer üzerine etkileri

Karaciğerde GLP-1 immunoreaktivitesi ya da mRNA'sını gösteren bir çalışma yoktur. Sıçanda aynı yöntemle (NB) GLP-1 reseptör mRNA'sı olduğu (95) ve olmadığı (89) bildirilmiştir, iki çalışma arasındaki tek fark pozitif sonuçlu çalışmada inkübasyon süresinin daha uzun olmasıdır. Fare karaciğerinde reverse transkriptaz PCR ile GLP-1 reseptör mRNA'sı gösterilmiş (125), insanda RNA ase protection assay ile pankreastaki reseptör mRNA'sına eş bir dizi bulunamamıştır (92).

İspanya'dan bir çalışma grubu cross linking ve radyoligand binding yöntemiyle yöntemiyle GLP-1 7-36 ve GLP-1 1-36 amidin sıçan izole hepatosit plazma membranına spesifik olarak bağlandığını, ancak bazal yada glukagonla uyarılmış adenilat siklazı değiştirmediğini göstermiştir (126). Aynı grup izole sıçan hepatositlerinde GLP-1 7-36 ve 1-36 amidin glikojen sentetaz α enzimini aktive ederek glikojen sentezini artırdığını, bazal ve glukagonla uyarılmış cAMP miktarını ortamda fosfodiesteraz inhibitörleri yokken inhibe ettiklerini bulmuşlardır. Buna karşılık başka çalışmacılar işaretli GLP-1 1-37'nin sıçan hepatosit membranına bağlanmadığını ve GLP-1 1-37, 1-36 amid ve 7-37'nin hepatositte cAMP seviyesini değiştirmediğini bildirmişlerdir (127,128).

Bu çalışmaların sonuçlarına göre karaciğerde GLP-1 reseptörleri varsa dahi fonksiyonel yapısı ya da kullandığı ikincil mesaj sistemleri pankreas β hücresindeki reseptörlerden farklıdır. Reseptörün bazı plazma membranı dışındaki hücre fraksiyonlarında bulunması da mümkündür.

d- Yağ dokusu üzerindeki etkileri

Sıçan yağ dokusu homojenatlarında radyoligand binding yöntemiyle (38), total sıçan yağ dokusu RNAsında NB ile GLP-1 reseptörleri gösterilmiştir (95). İnsanda RNAase protection assay ile yağ dokusundaki pankreastaki GLP-1 mRNA'sına eş bir nükleotid dizisi gösterilememiştir (92).

Sıçan yağ dokusu çözünebilir membranlarında radyoligand binding yöntemiyle GLP-1 7-36 amid için düşük ve yüksek afiniteli iki ayrı spesifik bağlanma yeri gösterilmiştir (107). Aynı grup tarafından karaciğer ve çizgili kas plazma membranlarında bulunan reseptörlerden farklı olarak yağ dokusu reseptörleri GLP-1 1-36 amidi bağlamaz, intrasellüler cAMP'de artışa neden olur, gliserol salınımını artırır. İnsan yağ dokusu çözünebilir membranlarında da aynı yöntemle benzer özellikler taşıyan GLP-1 reseptörleri gösterilmiştir (106). Yağ dokusunda insüline benzer şekilde yeni lipid yapımını uyardığı gösterilmiştir (70).

2- GLP-1'in Gastrointestinal Etkileri

a- GLP-1'in mide boşalması üzerindeki etkileri

Eksojen yolla verilen GLP-1'in sağlıklı (19,20,21,22) ve tip 2 diabetli (129) insan ve köpeklerde (23) kalorik değeri olan (19,20,21,22,129) ve olmayan (23) sıvı besinlerin mideden boşalma hızını yavaşlattığı gösterilmiştir. NIDDM 'lu kimselere GLP-1 infüzyonu sırasında verilen standart test yemeği (17) ve sıvı besinin (129) mideden boşalma hızı kontrol değerlerine göre en az %50 azalır.

GLP-1 infüzyonunun izole pilorik basınç dalgalarını ve bazal pilor tonusunu artırıp antropilorik basınç dalgalarını azaltarak transpilorik akım ve mide boşalmasını yavaşlattığı gösterilmiştir (22,23). Bu değişikliklerin hangi mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştiği ise bilinmemektedir. Mide düz kasında, periferik sinirlerde GLP-1 ve reseptörleri araştırılmamıştır. Midede GLP-1 mRNAsının gösterildiği tek çalışmada (92) bulgunun hangi doku fragmanına ait olduğu kestirilemez. Gastrointestinal sistem fonksiyonlarını düzenleyen merkezi sinir sistemi yapılarında GLP-1 ve reseptörlerinin bulunması, santral verilen GLP-1'in gıda alımını değiştirmesi etkinin santral olabileceğini düşündürmektedir.

Endojen GLP-1'in mide boşalma hızı üzerindeki etkilerini araştıran dolaysız bir çalışma yoktur. Ancak insanda intraduodenal glikoz verildikten sonra mide boşalma hızının ve kan GLP-1 düzeyinin tayin edildiği bir çalışmadan yola çıkarak (64) mide boşalma hızının kan GLP-1 konsantrasyonu ile ilişkili olduğu söylenebilir.

b- GLP-1'in mide asit salgısı üzerindeki etkileri

Eksojen GLP-1'in asit sekresyonuna etkisi de mide boşalmasındaki gibi inhibisyon yönündedir. İnsanlarda GLP-1 amid infüzyonu pentagastrinle (24,25) ve besinle uyarılmış asit salgısını azaltır (19). Yalnızca bir çalışmada sağlıklı insanlarda postprandial glisemi düzeyleri iv glikoz infüzyonuyla sağlandığında GLP-1'in pentagastrinle uyarılmış asit salgısını değiştirmedeği bildirilmiştir (68). İnsanda iv GLP-1 yalandan yemeye bağlı asit salgısını inhibe etmesi (26) GLP-1'in asit salgısına etkisinin santral olduğunu ve vagal yolları kullandığını düşündürür.

Endojen GLP-1 ile asit salgısı arasında sebep-sonuç ilişkisi gösteren bir çalışma yoktur. İnsanlarda ileumun karbonhidrat ve yağ ile perfüzyonu sırasında kan GLP-1 konsantrasyonunun arttığı ve bu sırada mide asit salgısının azaldığı görülmüştür (80,130). Bu bulgu asit salgısının GLP-1 aracılığıyla değişmiş olabileceğini akla getirir.

İnsan çalışmalarının aksine pentotal anestezisi altındaki sıçanlarda GLP-1 infüzyonu bazal ve pentagastrinle uyarılmış asit salgısını değiştirmez (101). İnsanlardaki bulgular in vitro çalışmaların sonuçlarından da farklıdır. GLP-1 mide parietal hücresi kültürlerindedeki Gs subünitesi yardımıyla adenilat siklaz katalitik ünitesini aktive eder schimidtler (102), H⁺ sekresyonunu artırır (101,102). Parietal hücrelerdeki GLP-1 reseptörlerinin ikincil ulakları arasında inozitol trifosfat yoktur (101). Parietal hücre üzerindeki bu etki somatostatin ve gastrin sekresyonları üzerindeki GLP-1 etkisinden bağımsızdır.

GLP-1'in asit salgısını etkileyebilecek mide endokrin yapılarını etkilediği bilinmektedir. IDDM olan kimselerde düşük dozdaki GLP-1 perfüzyonu karışık besinlerden oluşan bir yemekten sonra tuzlu su perfüzyonuna göre gastrin salgısını anlamsız da olsa azaltır (131). İzole perfüze sıçan midesinde GLP-1 1-36 ve 7-36 amid perfüzyonu somatostatin salgısını artırır, gastrin salgısını azaltır, bu etki tetradotoksin (TTX) uygulamasıyla değişmez, nöral yol aracı değildir (132,133). Gastrin salgısındaki azalmanın somatostatin salgısındaki değişikliklere bağlı olma ihtimali vardır. Buna karşın Domuz izole mide preparatlarında ise GLP-1 1-37 ve 7-37 mide endokrin salgısını değiştirmez (7).

Pankreas adacık hücrelerinde olduğu gibi GLP-1'in mide salgısına etkisi de spesifik reseptörleri aracılığıyla. Köpek midesinde RIA ile GLP-1 ya da MPPGF'e ait olabilecek immunoreaktivite (134), sıçan midesinde NB ile GLP-1 reseptör mRNA'sı (89) gösterilmiştir.

Tavşan (135) ve sıçan (136) parietal hücreden zengin hücre kültürlerinde radyoligand binding assay ve NB ile yapılan çalışmalar bu reseptörlerin parietal hücrelerde olduğunu göstermiştir. Sıçanda yapılan çalışmada henüz identifikasyonu yapılamayan, parietal hücre ve şef hücresi olmayan bir başka hücre üzerinde de GLP-1 reseptörleri gösterilmiştir (136). Kobay midesi şef hücrelerinde de radyoligand binding yöntemiyle GLP-1 reseptörlerinin olduğu ve GLP-1'in intrasellüler cAMP yapımını artırarak pepsinojen salgılanmasına yol açtığı bulunmuştur (103). İnsan midesindeki GLP-1 reseptörleri pankreatik GLP-1 reseptörleri ile aynıdır (92).

c- GLP-1'in diğer gastrointestinal etkileri

GLP-1 perfüzyonu insanlarda sıvı besinle uyarılan pankreas eksokrin salgısını da inhibe eder ancak bu etki muhtemelen mide boşalmasındaki gecikmenin bir sonucudur. GLP-1, mide boşalması ile pankreas salgısı arasındaki lineer ilişkiyi değiştirmez. (19). GLP-1 pankreas asinus hücre kültürlerinde kolesistokinin (CCK) ve karbakol ile uyarılmış amilaz sekresyonunu potansiyalize eder (99). Pankreas eksokrin salgısı üzerine dolaysız etkisi yoktur (6).

GLP-1'in barsaklar üzerindeki etkileri iyi bilinmemektedir. İnce barsak rezeksiyonlarından sonra ileal proglukagon salgısının artması enteroglukagonun barsak büyümesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (137). Sıçanda ince

barsak ve kolonda GLP-1 reseptörleri bulunamamış (89), farede ise her iki organda da GLP-1 reseptörlerinin bulunduğu gösterilmiştir (125). Bu organlardaki GLP-1 reseptörlerinin işlevleri henüz bilinmemektedir.

3- GLP-1 ve Merkezi Sinir Sistemi

Merkezi sinir sisteminde GLP-1 ve GLP-1 reseptörlerinin bulunduğu ve bu reseptörlerin fonksiyonel (30,105) olduğu uzun süredir bilinmekle birlikte fizyolojik işlevleri konusundaki bilgiler yenidir.

Merkezi sinir sisteminde GLP-1 immunoreaktivitesi

İnsan (37) ve sıçan (30,31,32,33,36,37,138,139) beyinde RIA (30,31,32,138,139) ve immunohistokimyasal yöntemlerle (33,37) hipotalamusta (30,31,32,139), supraoptik nükleus, paraventriküler nükleus, median eminentia nöronal liflerinde (33), hipotalamus, talamus ve septal bölgelerdeki sinir lifleri ve uzantılarında (36) medulla oblongatada (30,31,37,139), dorsal motor komplekste (DMC; nükleus traktus solitarius (NTS) ve vagus dorsal motor çekirdeği (DMN)) (37), nükleus traktus solitariusun kaudal, retiküler nükleusun ventral ve dorsal bölgelerinde bulbus olfactoriusta (31,139), orta beyin ve ponsta (30,31), hipofizde (31) GLP-1 dizisiyle uygunluk gösteren immunoreaktivite bulunmuştur. Hipotalamustaki immunoreaktivitenin sinaptozom kaynaklı olması (31), hipotalamik sinir liflerinin uzantılarında da GLP-1 bulunması GLP-1'in bir nörotransmitter olabileceğini akla getirmiştir.

Merkezi sinir sisteminde GLP-1 mRNA'sı

Sıçanda GLP-1 mRNA'sının immunohistokimya, NB (32,34) ve SB (35) ile araştırıldığı çalışmalarda yukarıda bildirilen dağılımı destekler. Çeşitli çalışmalarda erişkin NTS'unda GLP-1 mRNA'sı ve gen ürünleri (34,35) erişkin hipotalamusunda daha az miktarda GLP-1 mRNA'sı (35) ve gen ürünleri (32,34,35); fetal hipotalamus hücre kültürlerinde ise pankreas ve ince barsaktakine eş proglukagon mRNA nükleotid dizisi bulunmuştur. Aynı yöntemlerle neonatal insan beyin sapında proglukagon mRNA'sı, paraventriküler nükleusta GLP-1 immunoreaktivitesi ve vagal dorsal motor nükleusta (DMNV) GLP-1 ve glukagon immunoreaktivitesi gösterilmiştir (35).

Bu çalışmalarda proteini kodlayan genin daha çok beyin sapında, gen ürünlerinin ise hipotalamusta bulunması hipotalamik GLP-1 immunoreaktivitesinin daha çok nöronal aksonlarda olduğuna ait bilgiyle (31,33,36) birlikte hipotalamustaki peptidin başka bir yerde sentezlenip taşındığını düşündürmektedir. Bulgular GLP-1'in bir nörotransmitter olma ihtimalini destekler.

Merkezi sinir sisteminde GLP-1 reseptörleri

Sıçanda GLP-1 reseptörleri radyoligand binding assay yöntemi kullanılarak yapılan ilk çalışmalarda talamusta (30), hipotalamusta, medulla oblongatada (30,38), orta beyinde ve ponsta gösterilmiştir. Sonraları reseptör otoradyografisi ile (39) mamiller nükleus, arkuat nükleus, NTS ve pretektal alanda çok, lateral septal nükleus, bulbus olfactorius, dorsal tekmental nükleus ve interpedinkuler nükleusta orta derecede bağlanma saptanmıştır. Yakın yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda reseptör

otoradyografisi ile medulla oblongatadaki radyoligand bağlanmasının NTS'da olduğu (40), lateral septum, subfornical organ, talamus anterodorsal talamik nükleus, hipotalamus, paraventriküler nükleus santral amigdala nükleusu (40,41), interpedinküler nükleus, posterodorsal tegmental nukleus, area postrema, inferior olive ve NTS'de yüksek yoğunlukta GLP-1 7-36 amid bağlandığı gösterilmiştir (40). Cross linking yöntemiyle hipotalamik membranlardaki reseptörün GLP-1 ve ekzendin 4 bağlayan yüksek afiniteli tek bir bağlanma yeri olduğu ve periferdeki reseptörlere benzediği bulunmuştur (40).

Merkezi sinir sisteminde GLP-1 reseptör mRNAsı

İnsan beyni total sellüler RNAsı RNAase protection assay ve reverse transkriptaz PCR ile incelenerek pankreatik GLP-1 reseptörünüküne eş GLP-1 mRNA ve DNAsı gösterilmiştir (9). Bu reseptörlerin lokalizasyonları henüz bilinmemektedir.

Son olarak sıçan hipotalamusunda in situ hibridizasyon histokimyası ile hipotalamusta supraoptik, paraventriküler ve arkuat nükleusta GLP-1 reseptör mRNAsı gösterilmiştir (140). Resptör otoradyografisi ile saptanan resptör dağılımı ile GLP-1 reseptör mRNAsının dağılımları arasındaki farklılıklar reseptörün sentezlendikten sonra sinir uçlarına taşındığını ima etmektedir.

Merkezi sinir sisteminde GLP-1 ve reseptörlerinin fonksiyonları

Beyinde GLP ve GLP-1 reseptörleri yukarıda bahsedildiği gibi otonom sinir sisteminin merkezi yapılarında ve homeostasisin düzenlenmesiyle ilgili yapılarda bulunur. Lateral ventriküle GLP-1 verilmesi ön beyinde paraventriküler nükleus,

santral amygdala (41,43), arkuat nükleus (43), arka beyinde ise area postrema, parabrakial nükleus ve nükleus traktus solitariusta nöronal aktivasyon belirteci olan c-fos immunoreaktivitesini kontrol hayvanlara göre artırır. GLP-1'in nükleus traktus solitariustan gelen visceral bilgiyi asandan liflerle orta beyin yapılarına iletmesi mümkündür.

Üçüncü ventriküle verilen GLP-1 açlıkla (41,43) ve besin kısıtlamasıyla (42) uyarılan ve uyarılmayan gıda alımını azaltır. Etki GLP-1 için spesifiktir, GLP-1 1-36 amidle görülmez, spesifik reseptör antagonisti ekzenden amidle geri döner. Periferik (intraperitoneal) yolla verilen GLP-1 ise gıda alımını değiştirmez (41,42). GLP-1 reseptör geni haraplanan farelerde lateral ventriküle GLP-1injeksiyonu gıda alımını üzerinde etkisi yoktur (140). GLP-1'in gıda alımının santral regülasyonundaki rolü, mide fonksiyonlarının santral regülasyonunda da etkili olabileceğini akla getirir.

Üçüncü ventriküle GLP-1 injeksiyonu icv angiotensin II verilerek (periventriküler yapıları uyarır) ve su kısıtlamasıyla uyarılmış (CVO yapılarını uyarır) su alımını azaltır. Spesifik reseptör antagonisti ekzenden amid bu etkiyi de ortadan kaldırır. Santral yolla verilen GLP-1 idrar miktarını ve idrarla atılan tuz miktarını AVP'den bağımsız bir yolla artırır. Periferik yolla verilen peptid idrar miktarı ve tuz atılımı üzerinde etkisizken içilen su miktarını azaltır. Periferik ve santral yolla verilen peptidin beslenme, susama, diürez ve natriürez üzerindeki etkilerinin farklı olması peptidin etki mekanizmalarının birden çok olduğunu göstermesi bakımından ilginçtir (42). Bu sonuçlara göre beyinde en az iki ayrı bölgede (farmakolojik özellikleri benzeyebilir) GLP-1 reseptörü vardır. Bunlardan yalnız birine periferik yolla verilen peptid dolaylı ya da dolaysız yolla etki eder.

Merkezi sinir sisteminde GLP-1 yapımını uyaran mekanizmalar ve GLP-1 reseptörlerinin ligandlarının kaynağı (santral-periferik) iyi bilinmemektedir. Sıçanlara intrakardiyak yolla verilen işaretli peptidin immunoreaktivitesinin beyin kesitlerinin otoradyografik tetkikiyle subfornical organ ve area postrema da gösterilmesi santral reseptörlerin ligandının sistemik dolaşım yoluyla gelebileceğini göstermesi bakımından son derece ilginçtir (44). Subfornical organ ve area postrema kan-beyin bariyeri olmayan, bu nedenle kan, serebrospinal sıvı ve beyin dokusu arasındaki nöral/hormonal/humoral bilgi alışverişini sağlayan yapılardır (46). Pek çok humoral mediatör ve hormondan başka diğer beyin yapılarından (paraventriküler nükleus, median preoptik nükleus, raphe, lokus coeruleus, NTS, lateral parabrakiyal nükleus, perifornikal alan, VII., IX. ve X. kranyal sinirler) gelen uyarıları önemli homeostatik görevleri olan beyin yapılarına (preoptik nükleus, supraoptik nükleus, paraventriküler nükleus, arkuat nükleus, perifornikal alan, amigdala santral nükleusu, stria terminalis, lokus coeruleus, raphe nükleusu ve NTS) iletirler. GLP-1 reseptörlerinin bu kritik bölgelerde yoğun olarak bulunması homeostasis mekanizmalarında yer aldığına dair inancı pekiştirir.

GLP-1 ve reseptörlerinin yoğun olarak bulunduğu yapıların bazıları aynı zamanda gastrointestinal sistem fonksiyonlarını düzenleyen merkezlerdir (45). Aşağıda adı geçen yapıların fonksiyonlarının hatırlanması amacıyla gastrointestinal sistem fonksiyonlarının santral regülasyonundan kısaca bahsedilmiştir.

4- GLP-1'in Diğer Biyolojik Etkileri

Fizyolojik işlevi ve önemi bilinmemekle birlikte sıçan ve insanda akciğer (38,108,141) böbrek, dalak ve kalpte de (92) GLP-1 reseptörleri gösterilmiştir. Akciğerlerdeki GLP-1 reseptörleri fonksiyoneldir; GLP-1 7-37 amidi bağladığı (38), trakea müköz bezlerinde sekresyona neden olduğu (141) bilinmektedir. Diğer dokulardaki reseptörlerin fonksiyonlarına ilişkin çalışmalar yoktur. Santral ve periferik uygulanan GLP-1'in su içme davranışını, santral uygulanan GLP-1'in su ve sodyum ekskresyonunu değiştirmesi (42) böbrek, kalp ve beyindeki reseptörlerin su ve tuz homeostasisinin sağlanmasında, dolaşımın santral regülasyonunda rol oynayabileceğini akla getirmektedir.

MİDE BOŞALMASINI DÜZENLEYEN MEKANİZMALAR

Mide boşalmasını gastrointestinal sistemin interensek ve eksterensek sinirleri, merkezi sinir sistemi ve humoral mediatörler kontrol eder.

Midenin Eksterensek İnnervasyonu

Midenin ekstrensek efferent parasempatik innervasyonunu n. vagus sağlar. Vagal preganglionik nöronların gövdeleri medulla spinaliste n. vagus dorsal motor çekirdeğinde bulunur. Bu nöronların preganglionik lifleri midenin interensek pleksuslarıyla sinaps yapar. İnterensek pleksustan çıkan postganglionik lifler ise düz kas hücreleri ve sekretuar hücrelerde sonlanır (142).

Midenin eksterensek efferent sempatik lifleri medulla spinalisten T₆-T₉ seviyesinden çıkar. Preganglionik nöron gövdesi medulla spinalistedir. Postganglionik nöron gövdesi ise başlıca çölyak pleksusta bulunur. Çölyak gangliondan çıkan postganglionik lifler çölyak arter dalları boyunca mide ve duodenuma girip intramural ganglionlar, kan damarları ve muskularis mukoza düz kasında sonlanırlar (142).

Midenin afferentleri n. vagus ve T₇-T₁₁ seviyesindeki spinal sinirlerdir. Mide lumenindeki çeşitli maddeler mukozada bulunan vagal kemoreseptörleri (aynı zamanda hızlı adapte olan gerim reseptörüdürler), mide duvarının kasılması ve midenin pasif distansiyonu sirküler düz kas tabakasında bulunan vagal gerim reseptörlerini uyarır. Splanknik afferentlerin tersine midenin vagal afferent sinir uçlarında peptiderjik nörotransmisyon (substans P ve CGRP) azdır. Buna karşılık vagal ganglionlarda peptiderjik nörotransmisyon ön plandadır.. Periferik vagal afferentler üzerinde CCK, serotonin ve opioid reseptörleri bulunur. Uyarı n. vagus, nodoz ganglion, juguler ganglion, medullar traktus solitarius yoluyla nukleus traktus solitariusta sonlanır (143).

Mide duvarındaki (mukoza ve seroza) splanknik gerim reseptörleri midenin spontan ya da vagal uyarıyla kasılması, distansiyonu ve kompresyonu ile uyarılır. Spinal afferentlerin sinir uçlarındaki nörotransmitterlerin çoğu substans P ve CGRPdir. Splanknik afferentler arka kök ganglionlarından geçip medulla spinalise girerler, aynı ipsilateral lamina II, I, IV, ve V ile sinaps yaptıktan sonra medulla spinaliste arka kordon ve lateral spinotalamik ve spinoretiküler yollarla retiküler formasyon ve talamusa ulaşırlar (143).

Midenin gerek sempatik gerekse parasempatik eksterensek sinirlerinin uyarılması mide fonksiyonlarının hem eksitasyon hem de inhibisyonuna neden olabilir .

Midenin tonusunu ve antral kontraksiyonların başlamasını *vagal eksitatör efferentler* sağlar. Vagal eksitatör efferentlerde nörotransmisyon kolinerjiktir, atropin ve hyosinle bloke olur. Vagal preganglionik lifler miyenterik ganglionlardaki düz kasi aktive eden kolinerjik nöronlarla sinaps yaptıklarından vagal eksitatör nörotransmisyon heksamethoniumun ile önlenabilir. Vagal efferentlerin bir bölümü miyenterik ganglionlarla sinaps yapmayıp substans P salgılayan intramural kolleteraller aracılığıyla postganglioner kolinerjik nöronları uyarır. Pilor civarında bulunan bir başka grup ise enkefalinerjik miyenterik ganglionlarla sinaps yapar (142).

Inhibitör vagal efferentler özellikle proksimalde mide duvarının gevşemesini sağlarlar. İnhibitör vagal efferentlerin preganglionik kolinerjik (nikotinik) lifleri nonadrenerjik nonkolinerjik (NANC) inhibitör intramural nöronlarla sinaps yaparlar (142).

Sempatik efferentlerin etkisiyle proksimal midenin tonusu azalır antral peristaltizm zayıflar. Spinal afferent sinirlerin uçlarında iletiyi noradrenalin, nöropeptid Y ve somatostatin sağlar. Sempatik efferent sinir uçlarındaki nörotransmisyon guanethidin ve bretilyum gibi antiadrenerjiklerle ve çölyak ganglion yoluyla iletiğinden heksamethonium ve atropinle önlenir. Adrenerjik efferent lifler miyenterik nöronlarda ya da doğrudan düz kasta sonlanırlar. Substans P salgılayan intramural kollaterallerle sinaps yapan bir grup sempatik efferent de vardır. Bu liflerin uyarılması midenin motor aktivitesini artırır (142).

Midenin İnterensek İnnervasyonu

Alınan besinin hacmi ve fiziksel özellikleri interensek mekanosensitif vagal ve spinal afferentleri, kimyasal yapısı ise duodenum ve ince barsaktaki mukozal afferentlerle endokrin hücreleri uyarır. Lumendeki kimyasal maddeler ve mekanik değişikliklerin etkisiyle barsak endokrin hücrelerinden salgılanan barsak peptidleri (CCK, serotonin, nörotensin) ya parakrin yolla yapıldıkları bölgedeki afferent sinir uçlarını ya da endokrin yolla reseptörlerini taşıyan uzak yapıları uyararak mukozal sensasyonu sağlarlar.

Mukozal reseptörler çeşitli internöronlar aracılığıyla efektör interensek sinirlerle sinaps yaparak algıladıkları uyaranlara göre mide hareketlerinin değişmesini sağlarlar. Mide motilitesini düzenlenmesinde rolü olan interensek innervasyonda pek çok aminoasit, amin ve nöropeptid transmitter bulunur. Pilonun motor aktivitesini eksitator kolinerjik motor nöronlar (Ach ile), inhibitör adrenerjik (VIP ile) ve nonadrenerjik-nonkolinerjik (NANC) (nitrik oksit, NO ile) motor nöronlar sağlar. Bu efektör nöronların en iyi bilinen eksitator ve inhibitör nörotransmitterleri Ach ve noradrenalindir. Ancak substans P, nörokinin A ve serotoninin eksitator, opioid peptidler, VIP, ATP ve NO'din inhibitör nörotransmisyonunda yer aldığı bilinmektedir (144).

Mide Boşalmasını Kontrol Eden Refleksler

Sıvıların mideden boşalma hızları mide gövdesiyle duodenum arasındaki basınç farkına ve pilonun akıma direncine göre değişir. Pilonun sıvı akışına direnç göstermesi (izole pilorik basınç dalgalarının artması), mide tonusunun azalması

(reseptif relaksasyon, gastrik akomodasyon), duodenum kontraktil aktivitesinin ya da basıncının artması midenin boşalma hızını yavaşlatır.

İntragastrik basıncı vago-vagal refleksler düzenler. Mide fundusundaki tonus superior mezenterik gangliyonundan çıkıp miyenterik ganglion nöronlarında sonlanan postganglionik sempatik lifler ve n. vagus dorsal motor nükleusundan çıkıp enterik sinir sisteminin eksitatör ve inhibitör nöronlarında sonlanabilen preganglionik vagal liflerle kontrol edilir. Vagal eksitatör efferent uyarının kesilmesi, vagal inhibitör efferentler vasıtasıyla enterik sinir sisteminin inhibitör liflerinin uyarılması ya da postganglionik sempatik liflerin uyarılması fundusun tonusunu azaltıp fazık gastrik kontraksiyonları inhibe eder (*refleks relaksasyon*). Refleks relaksasyon NANC ve nonadrenerjik miyenterik efferent sinirlerin aracılığıyla gerçekleşir. Fundus tonusunun azalması fundo-antral basınç farkını azaltıp midenin boşalmasını yavaşlatır.

Vago-vagal refleksler santral mekanizmalar, humoral/hormonal değişiklikler, boğaz, özofagus, mide, antrum ve duodenum, ince barsaktaki reseptörlerden kalkan uyarılarla başlayabilir ya da değişebilir (144) (bkz. merkezi regülasyon).

Mide Boşalmasının Kontrolunda Pilorun Rolü

Pilorun motor aktivitesi duodenum lumenindeki kimyasal ve mekanik değişikliklere göre mide boşalmasının hızının ayarlanmasını sağlayan önemli kontrol mekanizmalarından biridir. Midenin pulzatil bir şekilde boşalmasını koordine antropilorik kontraksiyonlar sağlar. Proksimal mide gevşek ve antrum hareketsizken ortaya çıkan pilor kasılmaları (*izole pilorik basınç dalgaları*) ise pulzatil mide boşalmasını önler. Vago-vagal refleksler, spinal refleksler, intramural duodenopilorik

yollar izole pilorik basınç dalgalarının ortaya çıkmasından sorumlu olabilir. İntraduodenal verilen düşük konsantrasyonda glikoz solusyonlarının etkisiyle ortaya çıkan izole pilorik basınç dalgalarının duodenopilorik yolların kesilmesiyle ortadan kalkması, daha yüksek konsantrasyonlardaki glikoz solusyonlarına bağlı IPPW'lerin ise ancak duodenopilorik yollar kesilip atropin verildikten sonra kaybolması intramural duodenopilorik yolların ve eksterensek kolinerjik iletinin bu dalgaların ortaya çıkmasından sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (144,145,146).

Mide Boşalmasının Kontrolunda İnce Barsakların Rolü

Duodenal kemo/mekanoseptörlerin uyarılması vago-vagal, spino-vagalrefleksleri başlatarak ya da intraduodenal basıncı değiştirerek mide boşalmasının düzenlenmesine katkıda bulunur (144).

Duodenumun mekanoreseptörlerinin uyarılması vagal NANC yolla mide fundusunun azaltarak mide boşalmasını geciktirir. Afferent yol düşük hacimli distansiyonda spinal ve vagal afferentler, yüksek hacimli distansiyonda spinal afferentlerdir (147). Besin değeri olmayan sıvıların mideden boşalma hızları duodenal mekanoseptörler aracılığıyla ayarlanır.

Besin değeri olan sıvıların mideden boşalma hızlarının ayarlanmasına duodenal kemoreseptörler ve osmoreseptörler aracılık eder. Duodenum lumenindeki besinler (protein, yağ), düşük pH'lı solusyonlar, hiperosmolar solusyonlar mide boşalmasını farklı mekanizmalar aracılığıyla geciktirir (148).

Proteinden zengin besinler barsak endokrin hücrelerinden CCK salgılanmasına neden olarak CCK aracılığıyla inhibitör vago-vagal refleksleri uyarırlar. CCK ile uyarılan bu refleksin efferent yolunda nörotransmitter VIP ve NO'dir (149,150).

Hiperosmolar solusyonlar çölyak gangliondan geçen splanknik ya da vagal afferentlerle vago-vagal ya da splanknik-vagal bir refleks uyararak mide boşalmasını geciktirirler. VIP ve pilor kası hiperosmolar solusyonların tetiklediği inhibitör mekanizmada aracı değildir (149).

Asit solusyonlar mide boşalmasını vago-vagal bir refleks aracılığıyla geciktirirler. Bu refleksin etki yeri pilordur. Asit solusyonların mide boşalmasını yavaşlatmasını sağlayan mekanizmada gastrin salgılatan peptid (GRP) içeren nöronların da yer aldığı gösterilmiştir (145,149,151).

Yağ içeren besinlerin mide boşalmasını yavaşlatıcı etkilerinden kısmen CCK ve vagal afferentler sorumludur (152). Bu mekanizmadan sorumlu diğer mekanizmalar henüz araştırılmamıştır.

Glikoz ve diğer monosakkaridlerin intestinal perfüzyonunun vagal afferentler yoluyla mide boşalmasını geciktirdiği bilinmektedir (153,154,155). Barsak lumendeki glikoz vagal glukoseptörlerle tanınır (156). Barsak lumenindeki glikoz solusyonunun mide boşalmasını geciktirebilmesi için Na/glikoz kotransportörüne bağlanması ya da barsak epitelinde birikmesi gerekir (157). Glikoz solusyonlarının mide boşalmasını geciktirme mekanizması sorumlu olabilecek peptiderjik mediatörler hakkında dolaylı bilgi veren tek çalışma dışında (158) araştırılmamıştır. Glikoz solusyonunun mide boşalmasını geciktirmesi için gereken koşulların (157) GLP salgısı için de gerekmesi

(77) GLP-1 salgısı ve mide boşalmasının aynı mekanizmalarla değiştiğini ya da birinin diğerinin sonucu olduğunu akla getirir.

İnsanlarda duodenuma giren kalorik yük 1.4 kcal/dakikayı geçtiğinde glikoz içeren sıvıların mideden boşalma hızı yavaşlamaktadır (64). Hipergliseminin insanlarda interdigestif antral motiliteyi azalttığı, mide boşalmasını geciktirdiği bilinmektedir (159,160). Barsak lumeninde bulunan glikoz solusyonlarının etkisiyle mide boşalmasının gecikmesinin nedeni bu sırada kan şekerinin yükselmesi ve hiperglisemi sebebiyle efferent gastrik vagal aktivitenin baskılanması (161) olabilir. Diğer bir ihtimal de ileal fren mekanizmasında yer alan ve duodenuma geçen glikoz solusyonunun uyarısıyla salgılanan GLP-1 'in mide boşalmasını geciktirmesidir.

Mide Boşalmasının Santral Regülasyonu:

Mide antrumu ve duodenum mukozasındaki taktil reseptörler, sirküler düz kas tabakasındaki gerilim reseptörlerinden kalkan uyarılar polimodal vagal afferent sinirler ve traktus solitarius yoluyla nukleus traktus solitariusun internöronlarının gövdelerinde ve bazı dentritlerinde sonlanır (162). Mide ile ilgili afferent verilerin sonlandığı medial NTS internöronları sirkumventriküler bölgede yer alır. Bundan başka bazı NTS internöronlarından çıkan dentritler diğer bir sirkumventriküler organ olan area postrema nöronlarıyla sinaps yaparlar.

Sirkumventriküler organlar kan-beyin bariyeri olmayan ve böylelikle kan-beyin parankimi-serebrospinal sıvı arasında haberleşmeyi sağlayan merkezi sinir sistemi bölgeleridir. Kendisi de bir sirkumventriküler yapı olan ve diğer sirkumventriküler yapılarla karşılıklı projeksiyonları bulunan NTS, bu kritik yerleşimiyle üstlendiği

otonom sinir sisteminin düzenlenmesi görevini gerçekleştirmek için gerekli bilgileri dolaşımdaki hormonlar, toksin ve sitokinler aracılığıyla sürekli izleyebilir (46). Bundan başka NTS internöronları bütün NTS'u enine kateden geniş dentritleri vasıtasıyla aynı zamanda bütün gastrointestinal sistemden gelen afferentlerle sinaps yaparak gastrointestinal sistemin bütününden gelen bilginin tek merkezde toplanmasını sağlarlar (45).

Humoral mediatörlerden ve gastrointestinal sistemin tamamından gelen informasyonu birleştiren NTS internöronları vagus dorsal motor çekirdeğindeki efferent vagal preganglionik nöronlarla sinaps yapar. DMN nöronlarının organotropik organizasyonu (bir organla ilgili bütün nöronların sagittal yerleşimli kolonlar halinde bulunması) tek bir NTS nöronunun bir kaç akson vasıtasıyla bir organla ilgili bütün DMN nöronlarıyla, bazen birden çok organla ilgili nöronlarla sinaps yapmasına imkan tanır. Bu özel organizasyon sayesinde gastrointestinal sistemin bütün organlarında sistemik dolaşımdan ve gastrointestinal sistemden alınan bilgilere uygun değişikliklerin kısa bir sürede gerçekleştirilmesi mümkün olur. DMN nöronları doğrudan DMN'da sonlanan vagal afferentler ve area postrema nöronlarıyla sinaps yapan dentritleri vasıtasıyla NTS aracılığı olmadan da benzer bilgilere ulaşabilirler.

NTS internöronlarının DMN'deki visseral efferent nöron gövdeleriyle yaptıkları sinapslarda nörotransmitterler inhibitördür (GABA, enkefalinler, katekolaminler). DMN'dan çıkan efferent preganglionik nöronlar organ duvarındaki enterensek ganglionlarda sonlanır. Tarif edilen gastrointestinal sistem organı - NTS - DMN - gastrointestinal sistem organı ilişkisi besinin mideden duodenuma geçişini de

düzenleyen pek çok inhibitör, eksitatör ve multimodal vago-vagal refleksi düzenler (45).

NTS, orofasial kranyal motor nöronları kontrol eden parvosellüler retiküler formasyo ile davranışları ve otonom fonksiyonları düzenleyen parabrakial nükleus, paraventriküler nukleus ve limbik yapılara gönderdiği projeksiyonlarla topladığı ve değerlendirdiği visseral afferent ve humoral bilgiyi ön beyin ve beyin sapındaki otonom fonksiyonlarla davranışları ilişkilendiren merkezlere ulaştırır (45,46). Böylelikle davranışların organizmanın durumuna ve ihtiyaçlarına uygun olması sağlanabilir.

Benzer şekilde DVC (dorsal vagal kompleks, NTS ve DMNV) fonksiyonları da daha yukarıdaki merkezi sinir sistemi yapılarından gelen projeksiyonlarla module edilir. Orbital korteks, parabrakial nukleus, paraventriküler nukleus, amigdala ve stria terminalisin bed nukleusundan gelen bu projeksiyonlar sayesinde otonom fonksiyonlar ortamda ve davranışlarda beklenen ya da gerçekleşen değişikliklere göre düzenlenebilir (45). Pek çok hormon homeostasisi sağlayan bu mekanizmada nörotransmitter olarak görev yapar (45,163).

Özetlenirse, santral GLP-1 reseptörlerinin yoğun olarak bulunduğu nukleus traktus solitarius, area postrema, dorsal motor komplekste gastrointestinal fonksiyonların en önemli düzenleyicisi olan vago-vagal reflekslerin primer nöronları bulunur. Bu bölgeler aynı zamanda üst merkezlerin ve humoral mediatörlerin gastrointestinal sistem fonksiyonlarına müdahale ettikleri yapılardır. Bu nedenle GLP-1'in beyin-barsak ekseninde görev yapan bir peptid hormon olma ihtimali kuvvetlidir.

GEREÇLER VE YÖNTEM

DENEY HAYVANLARI

Kronik gastrik kanüllü, uyanık, erişkin, dişi 170-250 g ağırlığında Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Denekler $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklığında, %65-70 nem içeren, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık dönemleri sağlanan bir ortamda muhafaza edildi, standart laboratuvar yemi ile beslendi. Cerrahi işlemler ve deneylerden bir gecelik açlıktan sonra gerçekleştirildi, deney ya da cerrahi anına kadar su alımı kısıtlanmadı. Sıçanlar "Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanım İlkeleri"ne uygun koşullarda muhafaza edildi.

CERRAHİ YÖNTEM

1- Mide kanülü yerleştirilmesi: Sıçanların midelerinin korpus bölümüne aseptik koşullarda eter anestezisi altında Gregory kanülü adı verilen paslanmaz çelikten, ucu kapaklı kanüller yerleştirildi. (164) Operasyondan sonra üç hafta yara iyileşmesi için beklendi, postoperatif ilk 2 günde sc ampicillin+klavulanik asit 100 mg/kg sc verildi.

2- Serebroventriküler (sv) kanül yerleştirilmesi: Gastrik kanül yerleştirildikten 3 hafta sonra sıçanlara anestezi uygulanıp (100 mg/kg ketamin, 0.75 mg/kg klopromazin ;ip.) stereotaksik alet (Stoelting Lab Standart Stereotaxic Instruments) yardımıyla paslanmaz çelik serebroventriküler klavuz kanül (22-gauge; Plastic Products, Roanoke, VA) sağ lateral serebral ventriküle (Paxinose&Watson (1986) atlasına göre bregmadan 1.1 mm arkaya ve 1.5 mm yana, kafatası yüzeyinden 3.2 mm aşağıya) yerleştirildi. Kanüller kafatasına yerleştirilmiş 3 adet paslanmaz çelik vidaya dental

akrilikle tutturuldu. Boşalma deneylerine başlamak için işlemden sonra en az 3 gün beklendi. Deneyler bitince dekapitasyondan önce icv metilen mavisi injekte edilerek kanüllerin yerleri kontrol edildi. Kanülleri üçüncü ventrikülde olmayan sıçanlara ait veriler değerlendirilmedi.

3- Vagal afferent denervasyon/yalancı denervasyon: Anestezi uygulanan (100 mg/kg ketamin, 0.75 mg/kg klopromazin ;ip.) sıçanlara kapsaisinin akut etkilerini önlemek amacıyla 2 mg/kg atropin sulfat ip. verildi. Servikal vagus çevre dokulardan serbestleştirildi, çevre dokular parafilmle örtülerek korundu. Taze hazırlanan %1 kapsaisin solusyonu (Sigma)/taşıyıcı (%10 Tween 80 (Sigma) %10 etanol ve %80 SF) ile ıslatılan bir pamuk parçası 30 saniye süreyle sinirin üzerinde tutuldu. Toplam doz sıçan başına 1 mg'ı geçmeyecek şekilde pamuğa her 5 dakikada bir solusyondan damlatıldı. Otuz dakikanın sonunda çevre dokular tuzlu suyla yıkandı, insizyon kapatıldı. Mide boşalması deneylerine işlemden 3 hafta sonra başlandı. Deneylerden önce ve sonra sıçanların gözlerine %1'lik NH₄OH damlatılarak göz oğuşturma şeklindeki refleks cevaplara bakılarak işlemin etkinliği kontrol edildi (165).

MİDE BOŞALMA HIZININ TAYİNİ

1- Kronik gastrik fistüllü sıçanlarda mide boşalma hızının tayini

Sıvıların mideden boşalma hızı Green ve arkadaşlarının tarif ettikleri yöntemle göre ölçüldü (166). Operasyonu izleyen 4. hafta boyunca sıçanlar deney yapılmadan Bollmann kafeslerinde oturtuldu, deney ortamına alışmaları sağlandı.

Gece boyunca aç bırakılan sıçanlar Bollmann kafeslerine oturtuldu. Mide kanüllerinin kapakları açıldı, mide 37°C sıcaklığındaki serum fizyolojikle boşalan sıvı

berraklaşana kadar yıkandı. Deneye başlamadan önce yıkama sıvısının boşalması için en az yarım saat beklendi. Boşalma hızı tayin edilecek solusyonlara indikatör olarak mideden emilmeyen fenol kırmızısı (FK) (Sigma, P2417, St Louis, MO, USA) son konsantrasyonu 60mg/ml olacak şekilde eklendi. Sıcaklığı 37°C'da tutulan deney solusyonundan 3 ml kanülden mideye verildi, burada 5 dakika bekletildikten sonra sıvının midede kalan kısmı bir dakika süreyle Petri kutularına toplandı. Toplanan sıvı tüplere alınıp santrifüj edildi. Süpernatant önceden tartılan tüplere alındı, yeniden tartıldı, iki tartım arasındaki farktan toplanan sıvının miktarı belirlendi. 250 µl supernatant 1 ml 0.1M NaOH ile karıştırıldı, karışımın absorbansı spektrofotometrede 550 nm (tungsten) dalga boyunda okundu. Beş dakikada mideden boşalan sıvı hacmi şu formüle göre hesaplandı (166).

$$Q = (V_1 \times A_1) - (V_2 \times A_2) / 1/2 (A_1 + A_2)$$

Q = Mide boşalma hızı, ml/5 dakika

V₁ = Deney sıvısının hacmi (3 ml)

A₁ = Deney sıvısının absorbansı

V₂ = Mideden toplanan sıvının ağırlığı

A₂ = Mideden toplanan sıvının absorbansı

Deneyler sırasında deney solusyonları rastgele bir sırada kullanıldı, taşıyıcı injeksiyonu yapılan deneyler arasında en az bir saat, peptid injeksiyonu yapılan deneyler arasında en az 4 saat beklendi. Sıçanlar en çok haftada 3 kez kullanıldı.

Deney solusyonları:

- Fizyolojik tuzlu su (SF), %0.9 NaCl solusyonu (pH 7, 300 mOsm/l)
- Glikoz solusyonu, % 5.41 g glikoz (pH 7, 300 mOsm/l, 0.21 kkal/ml)
- Ön yüklemeli glikoz solusyonu, 3 ml glikoz solusyonu verildikten ve 5 dakika midede bekletilip toplandıktan sonra ikinci kez 3 ml glikoz solusyonu verilip 10. dakikada midede kalan sıvı toplandı.

2- Metil sellüloz yöntemi ile mide boşalmasının tayini

Yarı sıvıların mideden boşalma hızı metil sellüloz kullanılarak Scarpignato'nun tarif ettiği yöntemle daha önce anlatıldığı gibi belirlendi (167).

1.5 g metil sellüloz (Sigma, St.Louis, MO, USA) sürekli karıştırılarak 100 ml serum fizyolojikte çözüldü (%1.5) ve 50 mg/100 ml konsantrasyonunda fenol kırmızısı eklendi. 1.5 ml metil sellüloz polietilen bir tüp kullanılarak gavajla mideye verildi, 30 dakika sonra sıçanlar dekapite edildi. Karın açılarak mide serbestleştirildi, pilor ve kardial klampe edilerek çıkarıldı. Her deney sırasında 2-3 hayvan deney solusyonu gavajla verildikten hemen sonra dekapite edildi, bu sıçanların sonuçları standart kabul edildi. Serum fizyolojikle çalkalanan mide 100 ml 0.1 M NaOH solusyonunda homojenize edildi. Suspansiyon 60 dakika oda ısısında bekletilip çöktürüldü. 5 ml süpernatana 0.5 ml triklorasetik asit (%20 ağırlık/hacim) eklendi, karışım 2800 rpm hızda 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatana 4 ml 0.5 M NaOH eklendi, karışımın absorbansı spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda okundu.

Mide boşalma hızı şu formülle hesaplandı:

%Mide boşalması = $1 - (\text{deney yapılan mideden elde edilen sıvının absorbanı standart midelerden elde edilen sıvıların absorbanlarının ortalaması}) \times 100$.

MİDE ASİT SALGISI VE HACMİNİN TAYİNİ

Hafif eter anestezisi altında sıçanların pilorları bağlandı, anesteziden uyandıktan sonra asit salgısının birikmesi için iki saat beklendi. İkinci saatte sıçanlar dekapite edilip kardias da bağlandıktan sonra mideleri çıkarıldı. Mide büyük kurvatur boyunca açıldı, mide içeriği bir kaba toplanıp hacmi ölçüldü. Mide salgısının asiditesi örnek 0.01 N NaOH ile titre edilerek saptandı, sonuç $\mu\text{mol}/2$ saat olarak ifade edildi (168).

BESLENME DENEYLERİ

24 saat aç bırakılan sıçanlara sabah 8^{30} - 10^{00} 'da sc ya da icv GLP-1/taşıyıcı injekte edilip hemen daha önceden tartılan 70 g standart laboratuvar yemi verildi. Bir saat ve 24 saat sonra kalan yem miktarı etrafa saçılanlar da toplanarak tartıldı. Deneyin başı ve sonundaki yem miktarları arasındaki farktan tüketilen yem miktarı hesaplandı.

PEPTİDLER

GLP-1 (7-36) amid (mw 3297.67, Peninsula Lab. Europe Limited, Merseyside, St Helens, UK) %1 sığır serum albumini içeren serum fizyolojikte çözüldü. Sistemik etki araştırılırken deneyden 30 dakika önce 1.5-3-6-15-30-60-120-

200-300-500 pmol/kg GLP-1 cilt altına (sc) verildi. Santral etkiyi araştırmak için 75-150 fmol/sıçan GLP-1 deneyden 10 dakika önce GLP-1 sağ lateral serebral ventrikülüne (icv) ya da 3-10-30 pmol/sıçan GLP-1 deneyden hemen önce sisterna magna içine (ic) Hamilton şıngası ile 5µl hacimde verildi. İntrasisternal (ic) enjeksiyonlar için hafif eter anestezisi verildikten sonra baş stereotaksik alete yerleştirildi, boyna fleksiyon yaptırılarak oksipital bölge açığa çıkarıldı. Hamilton iğnesi ile cilt, ciltaltı ve oksipital membran geçildi, şıngaya serebrospinal sıvının olduğu yerin sisterna magna olduğu kabul edilerek ilaç enjekte edildi. icv enjeksiyonlar uyanık sıçanlara yapıldı.

Asit salgısının araştırıldığı deneylerde taşıyıcı ya da GLP-1 deneyin başlamasından hemen önce ciltaltına ya da sisterna magnaya verildi.

Ekzendin 9-39 amid (mw 3367.67, Peninsula Lab. Europe Limited, Merseyside UK) %0.1 sığır serum albumin içeren serum fizyolojikte çözüldü. Deney solusyonu serum fizyolojik olan deneylerde GLP-1'den 15 dakika önce 3-6 pmol/kg sc ya da 10 dakika önce 75-750-1000 pmol/sıçan icv verildi. Glikoz ve ön yüklemeli glikoz solusyonu kullanıldığında ise deneylerden 30 dakika önce 3-6-60-120 pmol/kg sc, 10 dakika önce 35-75-150-300-1000 fmol/sıçan icv verildi.

KİMYASALLAR

Periferik etkili nonselektif muskarinik reseptör antagonisti *atropin metil nitrat* (Sigma) metil sellüloz yöntemiyle geçekleştirilen boşalma deneylerinden 5 dakika önce 1 mg/kg intraperitoneal (ip) verildi.

Postganglionik adrenerjik bloker *bretilyum tosilat* (American Reagent Laboratories Inc., NY, USA) metil sellüloz yöntemiyle gerçekleştirilen boşalma deneylerinden 5 dakika önce 15 mg/kg intraperitoneal (ip) verildi.

GLİKOZ VE GLP-1 TAYİNİ

Glikoz kuyruk ucu kanatılarak alınan kapiller kanda glucofilm (Bayer , Diagnostics GmbH, Munchen, Germany) kullanılarak Glucometer*3 (Ames 5499, Bayer Diagnostics GmbH, Cedex, France) ile ölçüldü. Ölçümler normal, vagal afferent denerve ve yalancı denerve sıçanlarda bazal şartlarda, GLP-1 injeksiyonundan sonra (6 pmol/kg sc ve 75 fmol/sıçan icv) ve intragastrik glikoz verildikten sonra yapıldı.

GLP-1 tayini için taşıyıcı/6 pmol/kg sc, 75 fmol/sıçan icv GLP-1 injeksiyonundan 30 ve 10 dakika, intragastrik glikoz uygulamasından 5 dakika sonra dekapitasyon yapıldı. Elde edilen trunkal kan önceden 100 µl 1 mmol/ml EDTA (fw 292.2, Sigma, St. Louis, MO, USA) ve 100 µl 5000Ü/ml aprotonin (Trasylol, Bayer, Leverkusen, Germany) koyulan ependorflara alındı, santrifüj edilerek plazma ayrıldı. Plazma GLP-1 tayini yapılana kadar -70°C'da saklandı.

GLP-1 immunoreaktivitesi Fundacion Jimenez Diaz, Madrid, Spain'da ML Villaneuva-Penacarrillo tarafından ölçüldü. Plazmadaki GLP-1 %70 etanol kullanılarak ekstrakte edildikten sonra GLP-1 miktarı GLP-1 (1-36) ve (7-36) amidle eşit olarak reaksiyon veren anti-GLP-1 2135 (JJ Holst, Denmark) kullanılarak RIA ile tayin edildi (67). Tayin yönteminin saptayabileceği en düşük miktar 0.0075 pmol/ml idi.

İSTATİSTİK

Sonuçlar ortalama \pm ortalamanın standart hatası ($M \pm SEM$) olarak bildirildi. Dağılımı normal olan farklı grupların sonuçları student's t testi, dağılımı normal olmayan farklı grupların sonuçları Mann-Whitney-U testi ile karşılaştırıldı. 0.05'den küçük p değerleri istatistiki bakımdan anlamlı kabul edildi.



BULGULAR

Periferik GLP-1 injeksiyonunun tuzlu suyun mideden boşalma hızına etkisi

Üç (500-750 fmol/sıçan) - 6 (1000 -1200 fmol/sıçan) - 10 - 15 - 30 - 60 - 120 - 300 pmol/kg sc GLP-1 injeksiyonu kalorik değeri olmayan fizyolojik tuzlu suyun mideden boşalma hızını sc taşıyıcıya göre (2.75 ± 0.04 ml/5 dakika) anlamlı olarak yavaşlattı (Sırayla 2.57 ± 0.005 , 2.35 ± 0.06 , 2.42 ± 0.009 , 2.6 ± 0.07 , 2.45 ± 0.06 , 2.5 ± 0.1 , 2.43 ± 0.12 , 2.43 ± 0.81 ml/5 dakika) (Şekil 2.a.).

Birbuçuk pmol/kg (255-375 fmol/sıçan) GLP-1 mide boşalmasını anlamlı derecede değiştirmede (2.6 ± 0.08 ml/5 dakika). Yüksek dozlarda (500 pmol/kg, 85-125 pmol/sıçan) GLP-1 fizyolojik tuzlu suyun mide boşalma hızı üzerindeki etkisi kayboldu (2.97 ± 0.11 ml/5 dakika). Sistemik GLP-1 enjeksiyonunun etkisi 15. dakikada başladı, 1 saat devam etti, enjeksiyonun 2. saatinde mide boşalma hızında değişiklik gözlenmedi (veriler gösterilmedi)

Spesifik reseptör antagonisti ekzendin amid (3-6 pmol/kg, sc; 500-750 ve 1000-1200 fmol/sıçan) fizyolojik tuzlu suyun mideden boşalma hızını değiştirmede (sırayla 2.74 ± 0.11 , 2.69 ± 0.06 ml/5 dakika). Aynı dozlardaki ekzendin 6 pmol/kg GLP-1'den önce verildiğinde ise mide boşalma hızındaki yavaşlamayı geri çevirdi (2.63 ± 0.1 , 2.98 ± 0.007 ml/5 dakika). (Şekil 2.b.) 60 pmol/kg ekzendin amid GLP-1'in etkisini antagonize etmedi (2.11 ± 0.21 ml/5 dakika).

Santral GLP-1 injeksiyonunun tuzlu suyun mideden boşalma hızına etkisi

Yetmişbeş ve 150 fmol/sıçan (0.3-0.41 ve 0.6-0.82 pmol/kg) GLP-1 lateral serebral ventriküle santral yolla verildiğinde de fizyolojik tuzlu suyun mideden

boşalma hızını icv taşıyıcıya göre anlamlı olarak yavaşlattı (sırayla 2.3 ± 0.09 , 2.32 ± 0.09 ml/5 dakikaya karşı 2.78 ± 0.06 ml/5 dakika, $p < 0.01$) (Şekil 3.a). Santral GLP-1 enjeksiyonunun etkisi iki saat devam etti (veriler gösterilmedi).

Altı pmol/kg (1000 -1200 fmol/sıçan) sistemik ekzendin enjeksiyonu tek başına tuzlu suyun mideden boşalma hızı üzerinde etkisizken santral 75 ve 150 fmol/sıçan GLP-1 enjeksiyonundan 15 dakika önce verildiğinde GLP'in mide boşalma hızı üzerindeki yavaşlatıcı etkisini ortadan kaldırdı (sırayla 2.7 ± 0.07 'ye karşı 2.3 ± 0.09 ml/5 dakika, $p < 0.01$ ve 2.74 ± 0.14 'ye karşı 2.32 ± 0.09 ml/5 dakika, $p < 0.05$). Üç pmol/kg (500-750 fmol/sıçan) ekzendin ise 75 fmol/sıçan GLP-1'in inhibitör etkisini değiştirmede (2.53 ± 0.12 ml/5 dakika) (Şekil 3.a.)

Ekzendin amid santral yolla verildiğinde (1000 fmol/sıçan, yaklaşık 4-6 pmol/kg) fizyolojik tuzlu suyun mideden boşalma hızını değiştirmede (2.66 ± 0.08 ml/5 dakika). Buna karşılık 75 fmol/sıçan GLP-1'den 10 dakika önce icv enjekte edildiğinde GLP'nin mide boşalması üzerindeki inhibitör etkisinin antagonize etti (2.6 ± 0.1 'ya karşı 2.3 ± 0.9 ml/5 dakika, $p < 0.05$). Ekzendinin daha düşük dozlarının (75 fmol/sıçan, 750 fmol/sıçan - 3-4.7 pmol/kg-) anlamlı derecede antagonist etkisi yoktu (sırayla 2.34 ± 0.1 , 2.49 ± 0.07 ml/5 dakika) (Şekil 3.b.).

Üç, 10 ve 30 pmol/sıçan GLP-1'in sisterna magnaya enjeksiyonu metil sellülozun (yarı-sıvı) mideden boşalmasını ic taşıyıcıya göre anlamlı derecede yavaşlattı (sırayla $\%56.47 \pm 5.47$, $\%22.92 \pm 5.08$, $\%7.85 \pm 1.41$ 'ya karşı ic taşıyıcı ile $\%80.61 \pm 5.12$, $p < 0.01$, $p < 0.0001$, $p < 0.05$). Üç ve 10 pmol/kg GLP-1'in sc

injeksiyonu metil sellülozun mide boşalma hızını değiştirmedi (sırayla %86.04 ± 5.12, %81.54 ± 5.12) (Tablo.1.)

Endojen GLP-1'in mide boşalma hızına etkisi

Glikoz ve ön yüklemeli glikoz solusyonlarının mideden boşalma hızları fizyolojik tuzlu suyunkinden daha yavaştı (2.34 ± 0.06, 1.98 ± 0.06 ml/5 dakikaya karşı 2.85 ± 0.02 ml/5 dakika, p<0.0001). Ön yüklemeli glikoz solusyonu glikoz solusyonundan daha yavaş boşaldı (p<0.001) (Şekil 4.a.ve b.).

Altı pmol/kg sc eksedin injeksiyonu tuzlu suyun mideden boşalma hızını değiştirmeyenken glikoz ve ön yüklemeli glikoz solusyonlarının mideden boşalma hızlarını taşıyıcıya göre anlamlı olarak artırdı (sırayla 2.64 ± 0.12 vs 2.32 ± 0.08 ml/5 dakika, p<0.05, 2.26 ± 0.12'ya karşı 1.87 ± 0.1 ml/5 dakika, p<0.05). Ekzendenin injeksiyonu sonra glikoz solusyonu nedeniyle yavaşlayan mide boşalma hızını artırarak tuzlu suyla elde edilen kontrol değerlerine ulaştırdı (2.64 ± 0.12'ya karşı 2.75 ± 0.05 ml/5 dakika, p=0.48). Ön yüklemeli glikoz solusyonunun mideden boşalma hızı da ekzendenin injeksiyonundan sonra arttı ancak tuzlu suyun kontrol değerlerine erişmedi (2.26 ± 0.12'ya karşı 2.75 ± 0.05 ml/5 dakika, p<0.0001) (Şekil.4.a.). Altmış ve 120 pmol/kg sc ekzendenin injeksiyonu glikoz solusyonlarının mideden boşalma hızını değiştirmede (sırayla 2.34 ± 0.05, 1.96 ± 0.08 ml/5 dakika ve 2.36 ± 0.14, 1.9 ± 0.15 ml/5 dakika.

Ekzendenin icv injeksiyonları kullanılan dozlarda (35, 75, 150, 300, 1000 fmol/sıçan) glikoz ve ön yüklemeli glikoz solusyonlarının mideden boşalma hızlarını etkilemedi (Şekil 4.b.).

Vagal afferent denervasyonun santral ve periferik GLP-1 injeksiyonu ve intragastrik glikoz solusyonlarının etkisiyle geciken mide boşalma hızına etkisi

Vagal afferent denervasyon yapılan sıçanlarda sc ve icv taşıyıcı injeksiyonundan sonra fizyolojik tuzlu suyun mideden boşalma hızı (sırayla 2.87 ± 0.08 ve 2.72 ± 0.07 ml/5 dakika) yalancı denerve sıçanlar (sc taşıyıcı ile 2.88 ± 0.06 ml/5 dakika) ve normal sıçanlardakinden (sırayla 2.75 ± 0.04 ve 2.78 ± 0.06 ml/5 dakika) farksızdı.

Altı pmol/kg sc GLP-1 injeksiyonu vagal afferent denerve sıçanlarda tuzlu suyun mideden boşalma hızını taşıyıcı injeksiyonuna göre değıştirmede (2.87 ± 0.08 'ya karşı 2.98 ± 0.12 ml/5 dakika) Buna karşılık yalancı denerve sıçanlarda sc GLP-1 injeksiyonu mide boşalma hızını yavaşlattı (2.88 ± 0.06 'ya karşı 2.61 ± 0.09 ml/5 dakika, $p < 0.05$) (Şekil 5.a.).

Yetmişbeş fmol/kg icv GLP-1 injeksiyonu vagal afferent denerve sıçanlarda tuzlu suyun mideden boşalma hızını değıştirmede (GLP-1 ile 2.72 ± 0.07 , taşıyıcı ile 2.93 ± 0.08 ml/5 dakika). Yalancı denerve sıçanlarda icv GLP-1 uygulamasının etkisi normal sıçanlardaki gibiydi (yalancı denerve grupta 2.33 ± 0.16 ve normallerde 2.3 ± 0.09 'a karşı taşıyıcı ile 2.78 ± 0.08 ml/5 dakika, sırayla $p < 0.01$ ve 0.001) (Şekil 5.b.)

Vagal afferent denervasyon glikoz solusyonunun mide boşalmasını yavaşlatıcı etkisini tümüyle ortadan kaldırdı, tuzlu suyun mide boşalma hızına yaklaştırdı (Glikoz 2.86 ± 0.07 , SF 2.91 ± 0.05). Ön yüklemeli glikoz solusyonunun mideden boşalma hızı vagal afferent denervasyondan etkilenmedi (2.05 ± 0.11 ml/5 dakika). Yalancı afferent

denervasyon glikoz ve ön yüklemeli glikoz solusyonlarının mideden boşalma hızlarını değiştirmede (sırayla 2.3 ± 0.04 , 1.96 ± 0.03 ml/5 dakika) (Şekil 6.).

Periferik muskarinik ve adrenerjik reseptör blokajının ic GLP-1 injeksiyonu nedeniyle geciken mide boşalma hızına etkisi

Periferik etkili nonselektif muskarinik reseptör antagonisti atropin metil nitrat ip yolla verildiğinde metil sellülozun mide boşalmasını geciktirdi ($\%41.91 \pm 10.01$ 'ya karşı $\%80.61 \pm 5.12$, $p<0.001$). ic 10 pmol/sıçan GLP-1 enjeksiyonundan önce verildiğinde ise tek başına atropin ya da GLP-1'e ait inhibisyonda anlamlı bir değişiklik olmadı ($\%18.47 \pm 11.51$) (Tablo.1.).

Nonselektif adrenerjik bloker bretilyum tosilat ip verildiğinde metil sellülozun mide boşalmasını geciktirdi ($\%65.75 \pm 6.81$ 'ya karşı $\%80.61 \pm 5.12$, $p<0.001$). ic 10 pmol/sıçan GLP-1'den önce verildiğinde mide boşalması daha da gecikti ($\%26.65 \pm 8.9$) ancak bu inhibisyon tek başına GLP-1'in yol açtığından farklı değildi (Tablo.1.)

Santral ve periferik GLP-1 injeksiyonunun mide asit salgısına etkisi

Santral GLP-1 injeksiyonu (10 pmol/sıçan; ic) mide salgı volumunu ve (1.24 ± 0.35 ml/2 saat) ve asit salgısını (167.82 ± 62.99 $\mu\text{mol}/2$ saat) taşıyıcı injeksiyonuna göre anlamlı derecede azalttı (4.67 ± 0.19 ml/2 saat ve 800.69 ± 65.6 $\mu\text{mol}/2$ saat; $p<0.001$). Aynı dozdaki GLP-1 (10 pmol/sıçan; sc) sistemik yolla verildiğinde mide salgı volumunu ve asit salgısını değiştirmede (Şekil 7.a. ve b.)

Santral ve periferik GLP-1 injeksiyonunun beslenme davranışına etkisi

Santral 75 fmol/sıçan ve sistemik 6-120 pmol/kg GLP-1 injeksiyonu 24 saat aç bırakılan sıçanlarda izleyen 24 saat boyunca yem tüketimini değiştirmede (Tablo.2.).

Santral ve periferik GLP injeksiyonu, intragastrik glikoz ve vagal afferent denervasyonun kan şekerine etkisi

Altı ve 500 pmol/kg sc GLP-1 injeksiyonu normal ve vagal afferent denerve sıçanlarda kan şekerini taşıyıcı injeksiyonuna göre anlamlı olarak değiştirmede. Yetmişbeş fmol/sıçan GLP-1'in icv injeksiyonu normal sıçanlarda kan şekerinde başlangıç değerlerine göre anlamlı bir değişik yapmadı (Tablo.3).

Yalancı denerve sıçanlarda intragastrik glikoz verildikten 5 dakika sonra kan şekeri bazal değerden farksızdı, 30. ve 60. dakikalarda ise anlamlı derecede yükseldi. Vagal afferent denerve sıçanlarda intragastrik glikoz uygulamasından sonra kan şekeri 5. dakikada yükselmeye başladı, 60. dakikada bazal değerlere döndü. Yalancı denerve ve vagal afferent denerve sıçanlarda intragastrik glikozdan sonra kan şekeri kurbu zaman bakımından farklıydı (vagal denerve sıçanlarda daha erken yükselip normale döndü) ancak maksimal glisemi değerleri arasında anlamlı fark yoktu (Tablo.3.).

Santral ve periferik GLP injeksiyonu, periferik ekzenden injeksiyonu ve intragastrik glikozun kan GLP-1 konsantrasyonuna etkisi

GLP-1 injeksiyonu (6 pmol/kg, sc, 10 pmol/kg sc, 75 fmol/sıçan icv) sc taşıyıcı injeksiyonuna göre kan GLP-1 konsantrasyonunu değiştirmede (Tablo.4).

İntragastrik glikoz solusyonu (30 dakika öncesinde taşıyıcı ya da ve 6 pmol/kg ekzenden verildikten sonra) uygulamadan sonraki 5. dakika kan GLP-1 konsantrasyonunu etkilemedi (Tablo.4).

Tablo 1. GLP-1'in metil sellüloz yöntemiyle değerlendirilen mide boşalma hızına etkisi.

Deney Grupları	Mide Boşalması (%)
Kontrol (taşıyıcı, sc)	80.61 ± 5.12
GLP-1 (3 pmol/kg, sc)	86.04 ± 3.30
GLP-1 (10 pmol/rat, sc)	81.54 ± 5.12
Kontrol (taşıyıcı, ic)	82.92 ± 4.76
GLP-1 (3 pmol/rat, ic)	56.47 ± 5.47**
GLP-1 (10 pmol/rat, ic)	22.92 ± 5.08***
GLP-1 (30 pmol/rat, ic)	7.85 ± 1.41*
Atropin (1 mg/kg, ip)	41.91 ± 10.08**
Atropin + GLP-1 (10 pmol/rat, ic)	18.47 ± 11.51**
Bretilyum tosylate (15 mg/kg, ip)	65.75 ± 6.81
Bretilyum tosylate + GLP-1 (10 pmol/rat, ic)	26.65 ± 8.93***

Deneylelerden hemen önce taşıyıcı (sığır serum albumini) ya da GLP-1 ciltaltına (sc) ya da sisterns magnaya (ic) enjekte edildi. Her grup 4-6 sıçandan oluşturuldu. Sonuçlar M ± SEM olarak ifade edildi. * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001 taşıyıcıya göre, " p<0.001 yalnız bretilyuma göre.

Tablo 2. Taşıyıcı ya da GLP-1 verilen sıçanlarda 1 ve 24 saatlik zaman dilimlerinde gıda tüketimi.

Gıda Tüketimi	g/1 saat	g/24 saat
Taşıyıcı (sc)	2.44 ± 0.46	24.64 ± 1.08
GLP-1 (20 pmol/kg, sc)	Yapılmadı	22.75 ± 1.31
GLP-1 (120 pmol/kg, sc)	2.06 ± 0.32	26.22 ± 1.53
Taşıyıcı (icv)	Yapılmadı	34.95 ± 1.38
GLP-1 (75 fmol/rat icv)	Yapılmadı	34.94 ± 0.55

Her grup 6-8 sıçandan oluşturuldu. Sonuçlar M ± SEM olarak ifade edildi.

Tablo 3. GLP-1 injeksiyonu ve intragastrik glikoz uygulamasının kan şekere etkisi.

Kan glikozu (mg/100 ml)	Yalancı denerve	Vagal afferent denerve
Bazal	55.4 ± 4.37	59.83 ± 7.38
Taşıyıcı		
10 dak.	59.75 ± 3.69	56.2 ± 10.93
30 dak.	63.75 ± 4.51	63.66 ± 9.18
60 dak.	57.5 ± 2.521	42.6 ± 6.18
GLP-1 (sc)		
10 dak.	54.25 ± 5.76	62 ± 11.63
30 dak.	59.62 ± 4.93	67.83 ± 9.05
60 dak.	55 ± 2.80	54.33 ± 6.10
İntragastrik glikoz		
5 dak.	76.33 ± 7.45	91.2 ± 12.32 ⁺
30 dak.	83.8 ± 6.40	134.33 ± 15.95*
60 dak.	145.8 ± 44.75	76.33 ± 7.45
GLP-1 (icv)		
10 dak.	86.33 ± 5.09	Yapılmadı
30 dak.	87.16 ± 3.11	Yapılmadı
60 dak.	78.5 ± 4.225	Yapılmadı

Her grup 5-8 sıçandan oluşturuldu. Sonuçlar M ± SEM olarak ifade edildi.

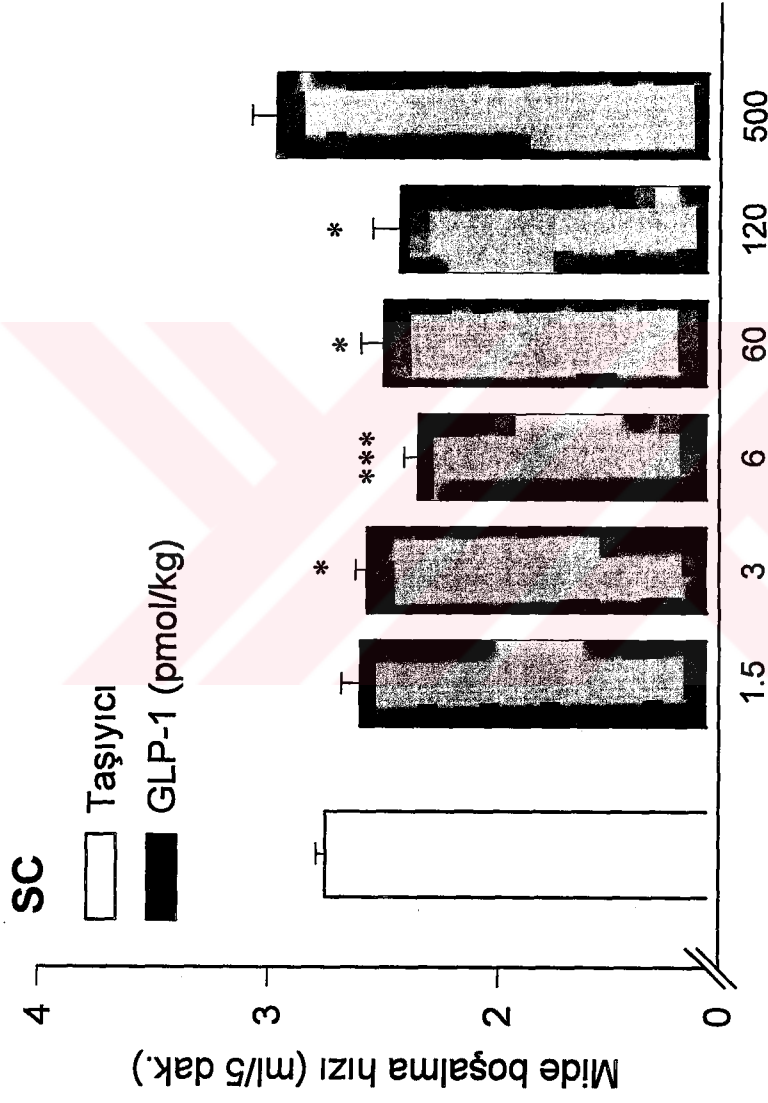
GLP-1 6 pmol/kg sc ya da 75 fmol/sıçan icv verildi.

⁺p=0.0502 ve *p=0.0087 yalancı denerve sıçanlara göre.

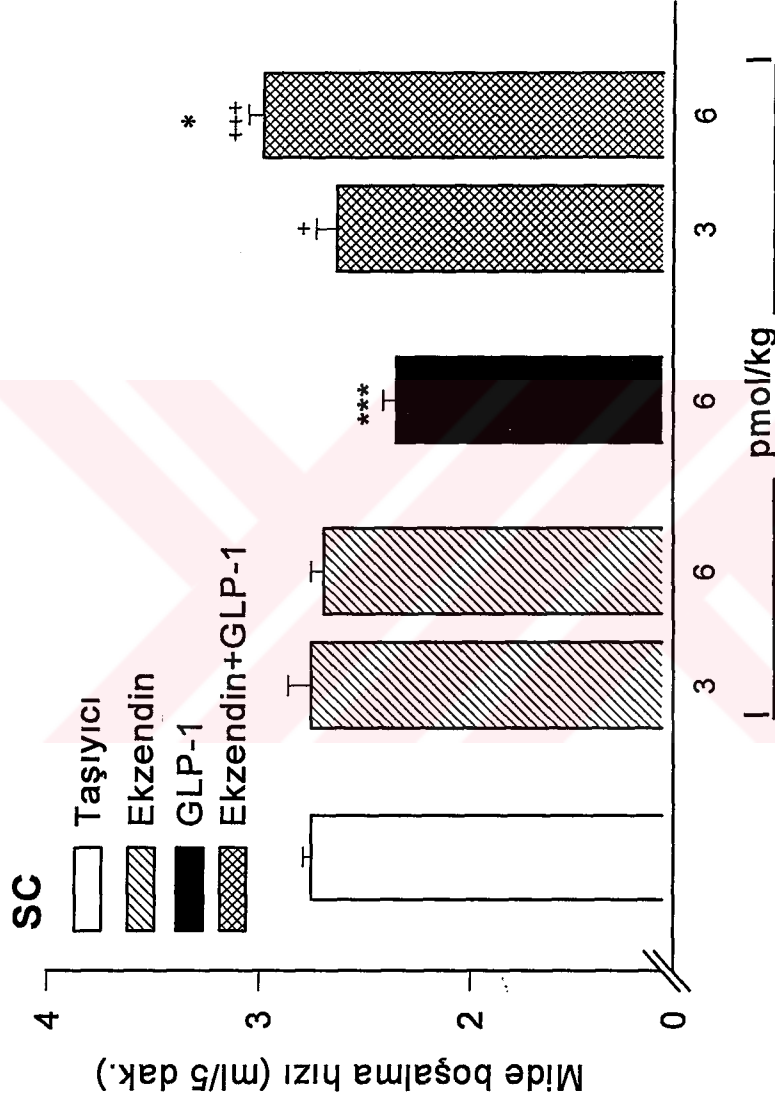
Tablo 4. GLP-1 injeksiyonu ve intragastrik glikoz uygulamasının plazma GLP-1 konsantrasyonuna etkisi.

Deney Grupları	GLP-1 (pmol/L)
Taşıyıcı (sc)	71.53 ± 32.45
GLP-1	
6 pmol/kg (sc)	97.94 ± 14.25
10 pmol/kg (sc)	94.52 ± 14.25
75 fmol/rat (icv)	91.52 ± 16.55
İntragastrik glikoz	
Taşıyıcı (sc)	86.57 ± 31.08
Ekzendin (6 pmol/kg, sc)	97.85 ± 25.82

Gruplar 3-6 sıçandan oluşturuldu. Sonuçlar M ± SEM olarak ifade edildi.



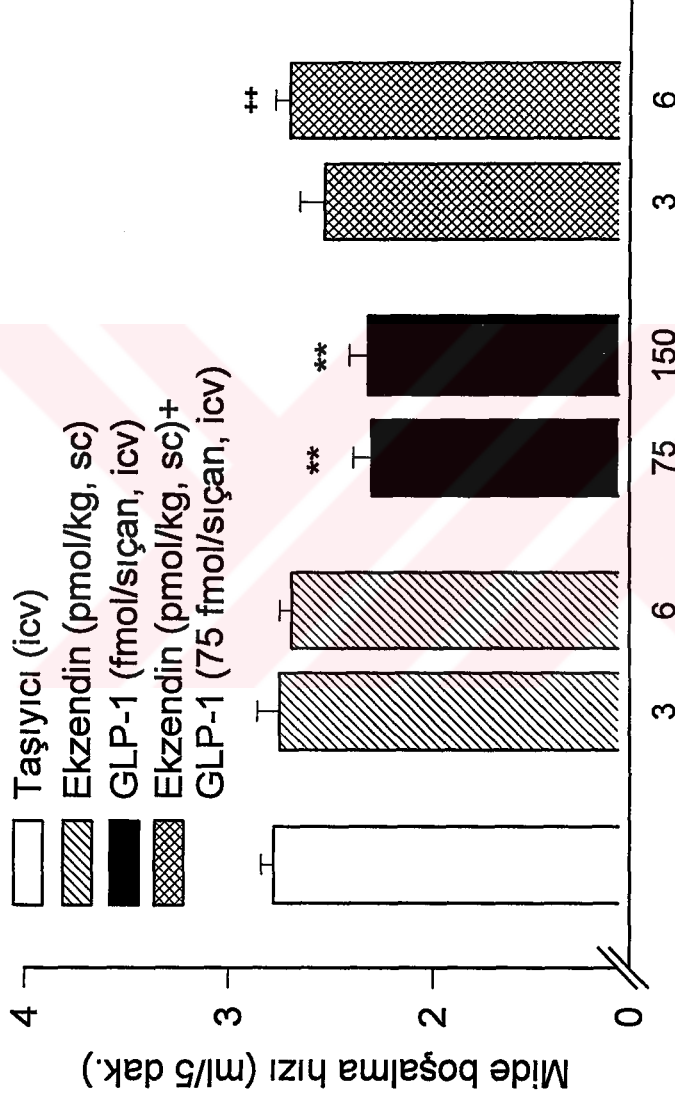
Şekil 2.a. Sistemik GLP-1 injeksiyonunun (1.5-500 pmol/kg, sc; n=7-9) tuzlu suyun mide boşalma hızına etkisi. GLP-1 tuzlu suyun mideden boşalma hızını anlamlı derecede yavaşlatı * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, taşıyıcıya göre;



Şekil 2.b. Sistemik ekzendin injeksiyonuyla (3 and 6 pmol/kg, sc; n=5) mide boşalmasındaki GLP-1'e bağlı inhibisyonun antagonize olması. Tek başına ekzendin (n=5-8) ya da taşıyıcı injeksiyonu (n=14) mide boşalma hızını değiştirmedir.

*p<0.05, ***p<0.001, taşıyıcıya göre

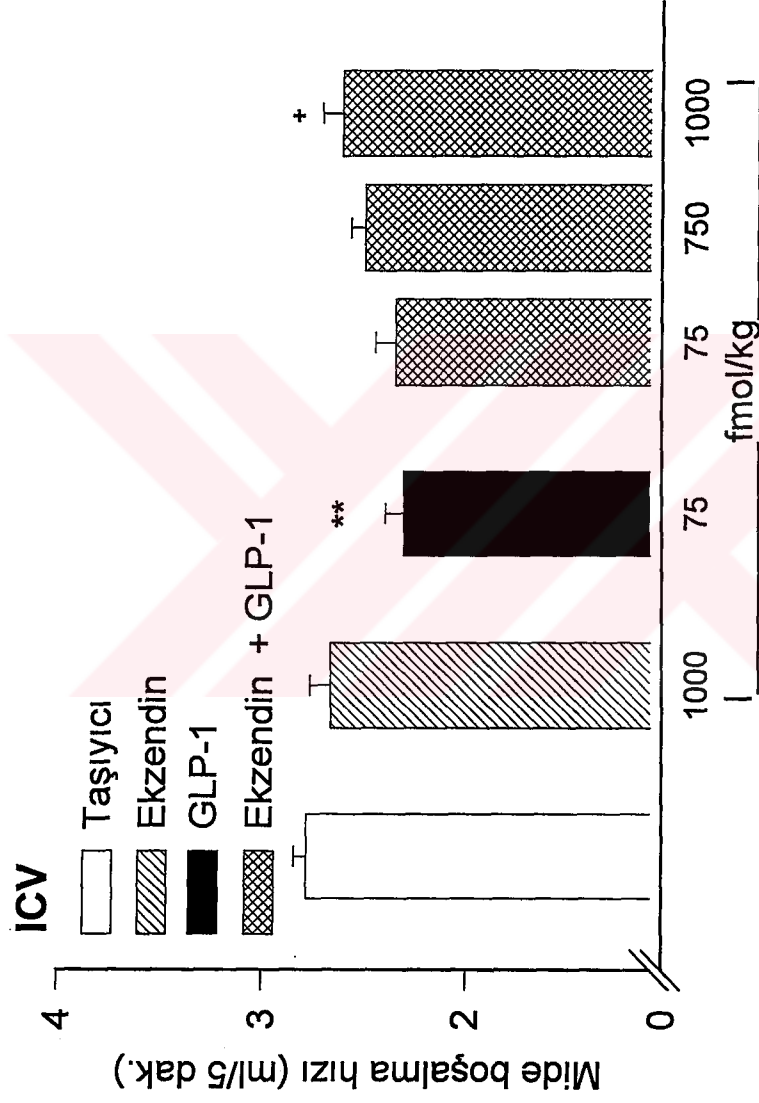
†p<0.05, †††p<0.001, yalnız 6 pmol/kg GLP-1 injeksiyonuna göre.



Şekil 3.a. İntraserebroventriküler (icv) GLP-1 (75 and 150 fmol/sıçan, n=7-12) injeksiyonunun tuzlu suyun mide boşalma hızına etkisi ve bu etkinin periferik ekzendin ötedavisıyla antagonize olması. 3 pmol/kg (n=10) sistemik ekzendin injeksiyonu etkisizken 6 pmol/kg (n=9) ekzendin santral GLP-1'in mide boşalması üzerindeki geciktirici etkisini ortadan kaldırdı.

**p<0.01, taşıyıcıya göre;

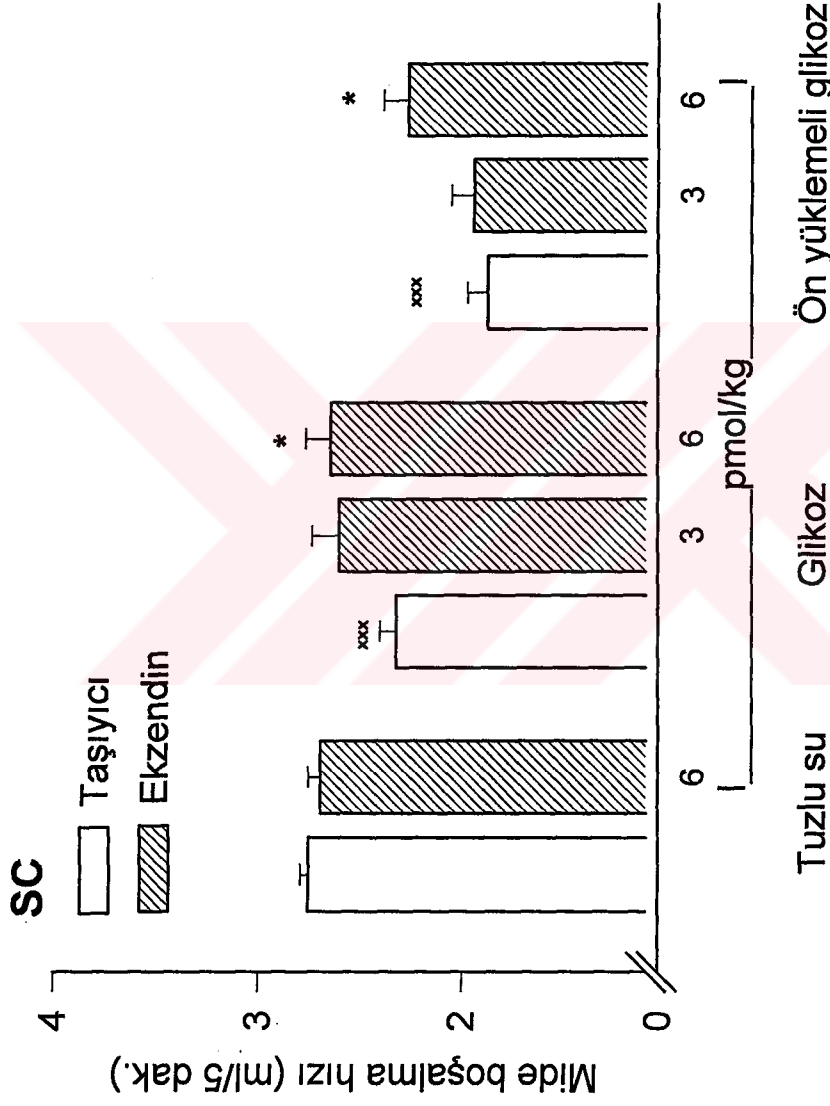
††p<0.01, tek başına 75 fmol/sıçan GLP-1 injeksiyonuna göre.



Şekil 3.b. Santral ekzendin ön tedavisinin santral GLP-1 injeksiyonu ile geciken mide boşalmasına etkisi. Intraserobroventriküler (icv) 750 fmol/sıçan (n=7) ve 75 fmol/sıçan (n=6) ekzendin etkisizken icv 1000 fmol/sıçan (n=11) ekzendin GLP-1'e bağlı inhibisyonu ortadan kaldırdı.

**p<0.01, taşıyıcıya göre;

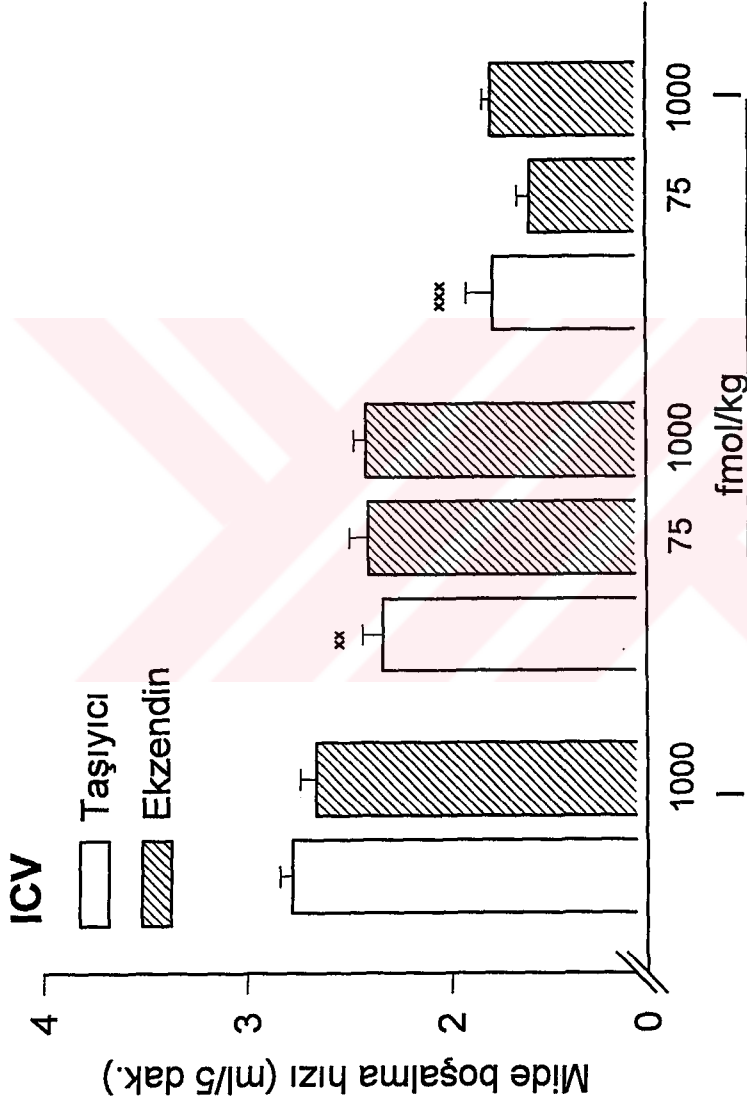
††p<0.01, tek başına 75 fmol/sıçan GLP-1 injeksiyonuna göre.



Şekil 4.a. Sistemik ekzendin uygulamasının glikoz etkisiyle geciken mide boşalmasına etkisi. 6 pmol/kg sc ekzendin (n=9) mide boşalma hızındaki glikoza bağlı gecikmeyi önlerken düşük doz ekzendinin (3 pmol/kg, sc; n=11) glikoz solusyonlarının mide boşalma hızları üzerinde anlamlı bir etkisi olmadı.

*p<0.05, taşıyıcıya göre;

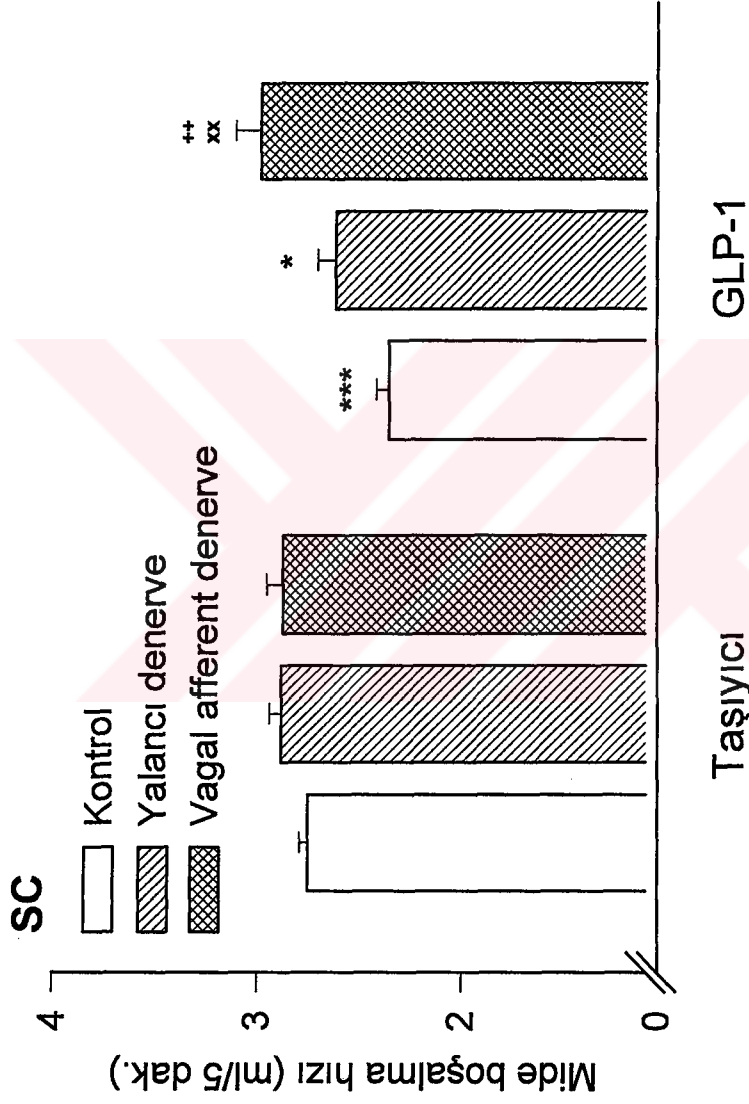
xxxp<0.01, and xxxp<0.0001, tuzlu suya göre.



Şekil 4.b. Santral ekzendin injeksiyonun intragastrik glikoz etkisiyle geciken mide boşalmasına etkisi. Santral yolla verilen ekzendin (75, 1000 pmol/sıçan, icv; n=6-9) glikoz solusyonlarının mide boşalma hızını değiştirmede.

* $p < 0.05$, taşıyıcıya göre;

** $p < 0.01$, and *** $p < 0.0001$, tuzlu suya göre.

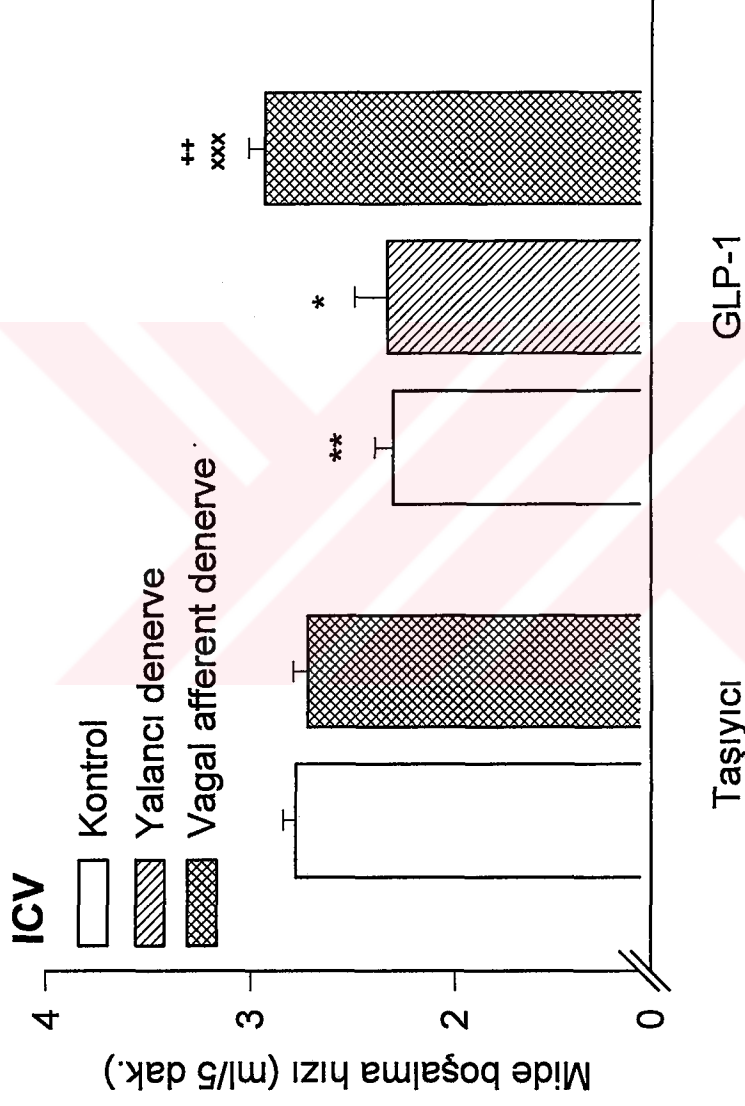


Şekil 5.a. Perivagal kapsaisin uygulamasının sistemik GLP-1 injeksiyonu (6 pmol/kg, sc; n=5-9) ile geciken mide boşalmasına etkisi. Vagal afferent denervasyon GLP-1'in mide boşalması üzerindeki geciktirici etkisini ortadan kaldırdı.

*p<0.05, and **p<0.0001, taşıyıcıya göre.

++p<0.01, yalancı denerve sıçanlara göre.

xxxp<0.001, normal kontrollere göre.

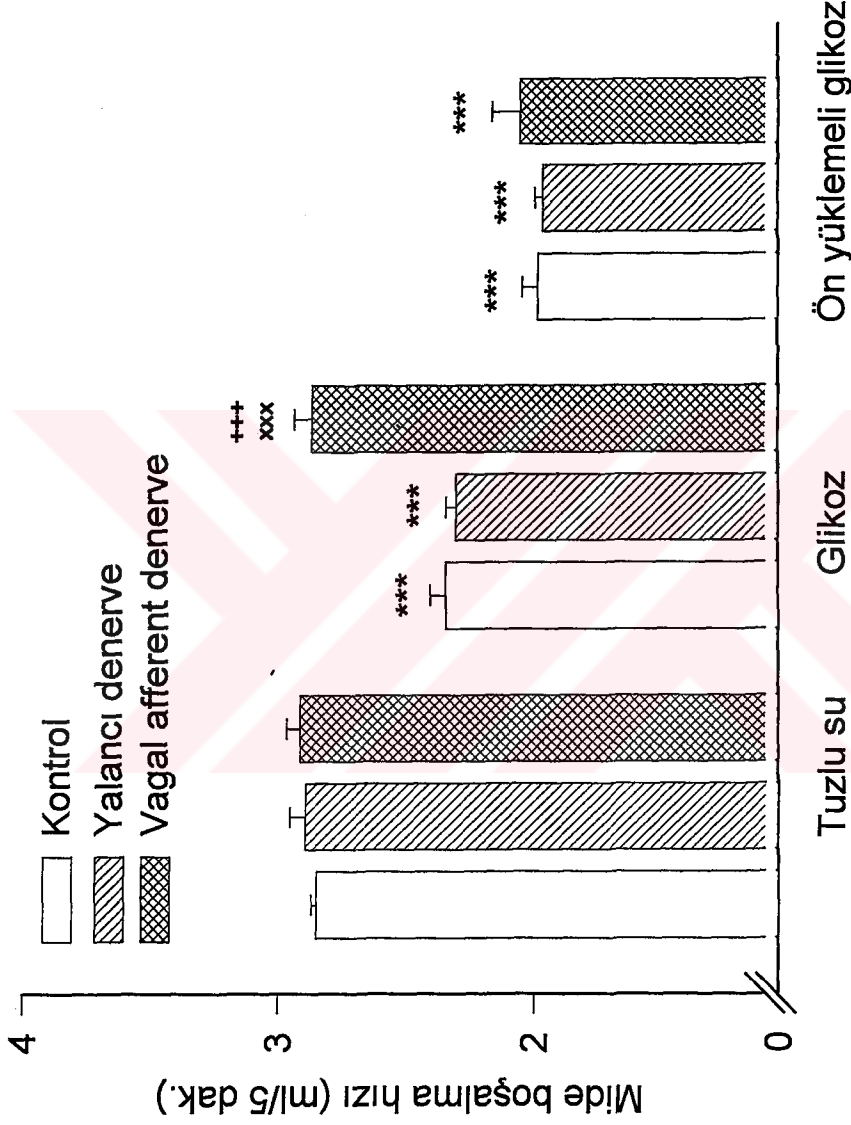


Şekil 5.b. Perivagal kapsaisin uygulamasının santral GLP-1 injeksiyonu ile (75 fmol/rat, icv; n=5-12) gecikmiş tuzlu su boşalmasına etkisi. Vagal afferent denervasyon mide boşalmasında GLP-1 etkisiyle görülen gecikmeyi ortadan kaldırdı.

* $p < 0.05$, and *** $p < 0.0001$, taşıyıcıya göre.

** $p < 0.01$, yalancı denerve sıçanlara göre.

xxx $p < 0.001$, normal kontrollere göre.

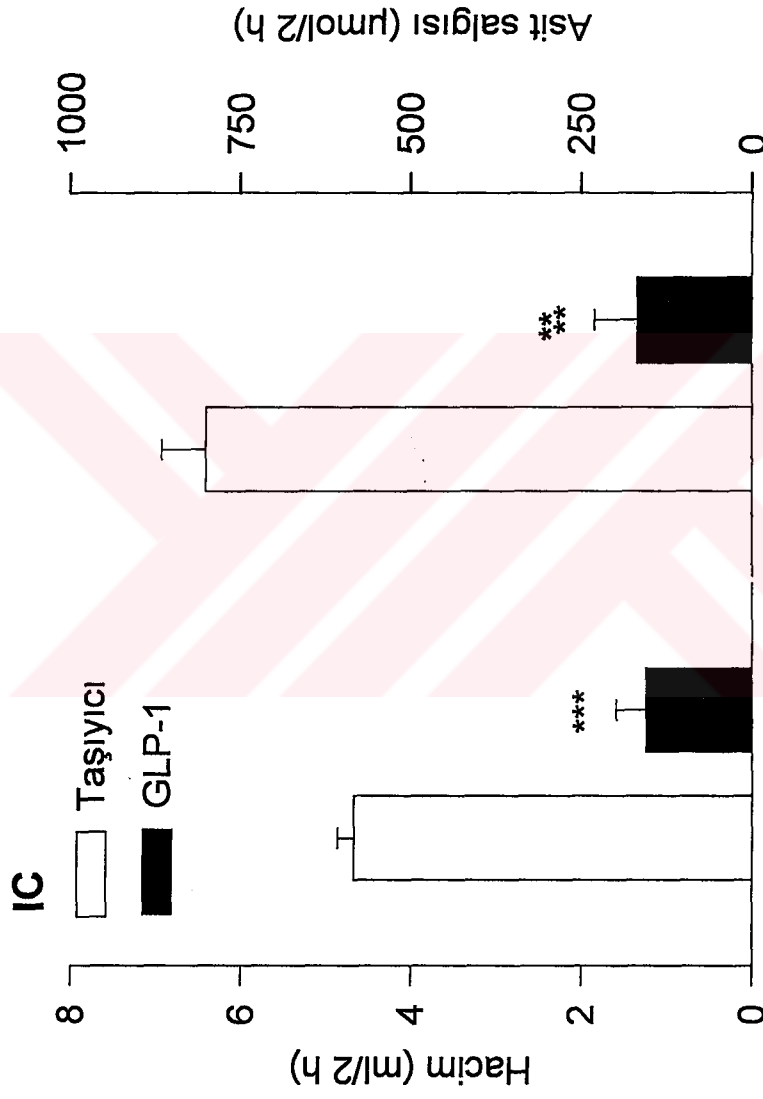


Şekil 6. Perivagal kapsaisin uygulamasının intragastrik glikoz uygulamasıyla gecikmiş mide boşalma hızına etkisi (n=614). Vagal afferent denervasyon glikozun mide boşalması üzerindeki geciktirici etkisini ortadan kaldırdı.

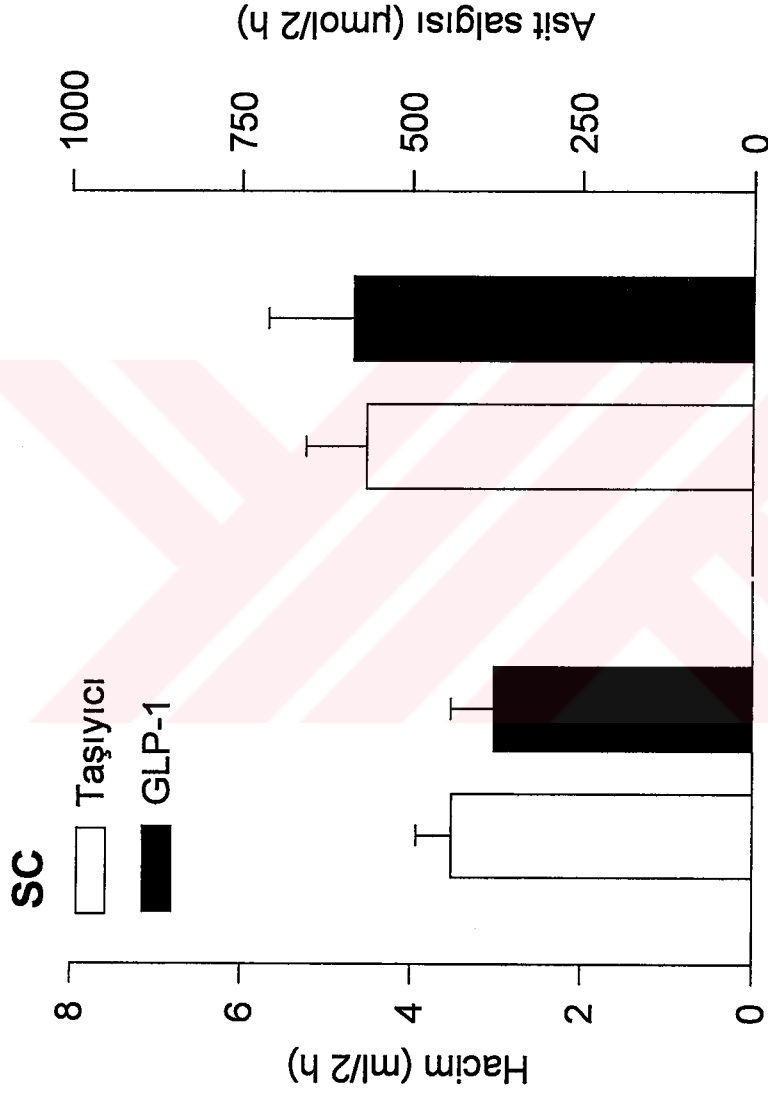
**p<0.0001, tuzlu suya göre.

+++p<0.0001, yalancı denerve sıçanlara göre.

xxxp<0.001, normal kontrollere göre.



Şekil 7.a. Santral GLP-1 uygulamasının (10 pmol/sıçan, ic; n=4-6) mide asit salgısı üzerindeki inhibitör etkisi. GLP-1 etkisiyle asit salgısı ve salgı hacmi azaldı. **p<0.001 and, ***p<0.0001, taşıyıcıya göre.



Şekil 7.b. Periferik GLP-1 uygulamasının (10 pmol/rat, sc; n=5-6) mide asit salgısına etkisi. Mide asit salgısı sistemik GLP-1 uygulamasıyla değişmedi.

TARTIŞMA

Glikoz solusyonunun vagal afferentlerin aracılık ettiği bir yolla mide boşalmasını geciktirdiği (153,154,155) ve barsak lumenindeki glikoz solusyonlarının GLP-1 salgısını uyardığı (64,77) bilinmektedir Şimdiye kadar endojen yolla salgılanan GLP-1'in mide boşalmasının düzenlenmesindeki rolünü araştıran bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada glikoz solusyonunun etkisiyle mide boşalmasında gözlenen gecikme periferik ekzenden amid injeksiyonuyla ve vagal afferent denervasyonla tamamen kayboldu. Ekzendenin ön yüklemeli glikoz solusyonuna bağlı gecikmiş mide boşalmasını hızlandırdığı ancak fizyolojik tuzlu su ile elde edilen kontrol değerlerine ulaştırmadığı gözlemlendi. Vagal afferent denervasyon ön yüklemeli glikoz solusyonunun mideden boşalma hızını değiştirmedir.

Sonuçlarımıza göre glikoz solusyonu vagal afferent sinirlerin ve GLP-1 reseptörlerinin aracılık ettiği bir mekanizmayla mide boşalmasını geciktirir. Bulgularımıza dayanılarak ön yüklemeli glikoz solusyonlarının neden olduğu inhibisyona vagal afferentlerin aracılık etmediği, kısmen GLP-1 ve reseptörlerinin katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır. Mide boşalmasının ön yüklemeli glikoz solusyonlarının etkisiyle gecikmesine vagal afferentler dışındaki mekanizmaların aracılık etmesi muhtemeldir.

Çalışmamızda glikoz solusyonlarının verilmesiyle geciken mide boşalması santral GLP-1 injeksiyonunun inhibitör etkisini antagonize eden santral ekzenden injeksiyonundan etkilenmedi. Bir ihtimal glikoz uyarısıyla ortaya çıkan endojen GLP-1'in etkisinin yalnız periferik reseptörleri aracılığıyla gerçekleşmesidir. Diğer bir

ihimal ise kullandığımız ekzenden dozunun endojen salgıyı antagonize edemeyecek kadar düşük olmasıdır. Glikoz solusyonlarının GLP-1'den başka nöral/humoral mekanizmaları harekete geçirerek mide boşlaması üzerinde etkili olması da mümkündür.

Bu çalışmada uyanık kronik gastrik fistüllü sıçanlarda ciltaltına verilen GLP-1'in kalorik değeri olmayan sıvı deney solusyonunun mideden boşalma hızını yavaşlattığı gözlemlendi. Yüksek (>300 pmol/kg) GLP-1 dozları mide boşalma hızını etkilemedi. Spesifik reseptör antagonisti ekzenden amid, tek başına mide boşalma hızını etkilemezken GLP-1'den önce verildiğinde GLP-1'in mide boşalma hızı üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırdı. Benzer şekilde vagal afferent denervasyon yapılan sıçanlarda GLP-1 injeksiyonu mide boşalma hızını değiştirmede.

Bulgularımız GLP-1'in mide boşalmasını vagal afferentler ve spesifik reseptörleri aracılığıyla etkilediğini göstermektedir. Yüksek dozdaki GLP-1 ile etkinin kaybolması bu dozdaki peptidin mide boşalmasını değiştiren başka mekanizmaları tetiklemesi ile açıklanabilir.

Besin değeri olmayan sıvıların mideden boşalma mekanizmasında vagal mekanoseptörler ve duysal afferentler yer alır (147). Mide boşalma hızını etkileyebilecek GLP-1 reseptörleri periferik sinirler, merkezi sinirler, mide düz kası, ve mide-barsak sisteminin hareketlerini düzenlenmesiyle ilgili hormonları üreten endokrin hücreler üzerinde olabilir. GLP-1'in reseptörleri nöral doku ve sindirim sistemi düz kaslarında araştırılmamıştır. Periferik nöral dokunun GLP-1 sentezlediği

de bilinmemektedir. Yalnız bir çalışmada diabetik bir hastanın rektal myenterik pleksusunda immunohistokimyasal tetkikle GLP-1 dizisi bulunmuştur (37).

Düz kas ve periferik sinirlerde pankreatik GLP-1 reseptörlerine eş yapıda GLP-1 reseptörlerinin şimdiye kadar gösterilememesi bu reseptörlerin var olmadıkları anlamına gelmez. GLP-1 reseptörleriyle ilgili çalışmalar tarandığında aynı tür memeli ve dokuda aynı yöntemle (karaciğer, çizgili kas, NB) yapılan incelemelerin inübasyon süreleri değiştiğinde farklı sonuçlar verdiği görülür (89,95). Aynı yöntem ve doku ile yapılan GLP-1 reseptör çalışmalarında kullanılan memelinin cinsi sonuçların değişkenliğine sebep olabilir.

Çalışmamızda sistemik yolla verilen GLP-1'in mide boşalmasını geciktirici etkisi kan glikoz seviyesinde meydana gelen değişikliklere bağlı değildi. Kullanılan en yüksek ve en düşük GLP-1 dozları kan şekerini değıştirmedi. GLP-1 etkisiyle değıştiği bilinen plazma insülin ve glukagon ve somatostatinin mide hareket ve salgı fonksiyonları üzerindeki etkisi bu çalışmanın konusunun kapsamı dışında kaldığından konsantrasyonları ölçülmedi, antikor/antagonistleri kullanılmadı.

Çalışmamızda GLP-1 injeksiyonuyla ve intragastrik glikoz verilmesiyle biyolojik etki görüldüğü ve bu etki spesifik reseptör antagonistiyle antagonize edildiği halde RIA ile tayin edilen plazma GLP-1 seviyesi değışmedi. Gözlenen biyolojik etki ile bu sırada ölçülen GLP-1 plazma konsantrasyonu arasındaki farklılık kan örneğinin alındığı zamanla plazma konsantrasyonunun en üst seviyeye ulaştığı zamanın örtüşmemesi ile ilgili olabilir. Sıçanlarda gerçekleştirilen çeşitli çalışmalarda GLP-1'in yarılanma ömrü 3-8 dakika arasında değışir (51,61,62). Bu süre çalışmamızda

GLP-1 injeksiyonu ile kan örneğinin alınması arasında geçen sürenin yaklaşık 3.5-10 katıdır. GLP-1'in başka biyolojik etkilerinin de plazma seviyesi bazal seviyelere düştükten sonra korunduğu bildirilmiştir (15,24).

Çalışmamızda periferik yolla verildiğinde etkili olamayacak kadar düşük dozlardaki GLP-1 üçüncü ventriküle verildiğinde kalorik değeri olmayan deney yemeğinin mideden boşalma hızını yavaşlattı. GLP-1 reseptörlerinin yoğun olduğu beyin sapı yapılarına daha yakın olan sisterna magnaya verilen GLP-1 de benzer etki gösterdi. Çalışmamızın sonuçları GLP-1'in mide boşalmasını santral yolla yavaşlattığını göstermiştir. Bu bulgu GLP-1'in günümüze kadar tarif edilen santral biyolojik etkilerinin ikincisidir. GLP-1 injeksiyonuna bağlı inhibisyon GLP-1'den önce gerek santral gerekse periferik yoldan verilen aynı miktardaki ekzendin amidle ve vagal afferent denervasyonla ortadan kalktı. Periferik kolinerjik ve adrenerjik blokaj ic GLP-1' injeksiyonunun mide boşalmasını yavaşlatıcı etkisini değiştirmede.

Gastrointestinal sistemin motor fonksiyonlarını düzenleyen başlıca santral yapılar medulla oblongatada yer alan ve area postrema ile fiziki ve fonksiyonel yakınlığı olan nukleus traktus solitarius ve n. vagus dorsal motor çekirdeği ile bu merkezleri ön beyindeki limbik ve kortikal merkezlere bağlayan yollardır (45). GLP-1 dizisi (30,31,32,33,36,37) ve GLP-1 mRNAsı (32,34,35) merkezi sinir sisteminde nukleus traktus solitarius, hipotalamus ve otonomik, homeostatik fonksiyonların düzenlenmesinde görev alan diğer yapılarda gösterilmiştir. Bu bölgelerde aynı zamanda GLP-1 bağlanma yerlerinin de bulunması (39,40) GLP-1'in mide fonksiyonlarını düzenleyen santral merkezler üzerinde etkili olduğunu düşündürür. Yakın tarihli çalışmalarda santral GLP-1 uygulamasının nukleus traktus solitarius,

area postrema, lateral parabrakial nukleus, amigdala santral çekirdeğinde nöronal aktivasyon belirteci olan c-fos immunoreaktivitesinin artırmış bulunması (41,43) bu çıkarımı destekler. Santral GLP-1 injeksiyonunun besin alımı ve su içme davranışını değiştirdiğinin gösterilmesi (41,42,43) santral GLP-1 ve reseptörlerinin merkezi sinir sisteminin otonom ve limbik merkezlerdeki özel yerleşimleri nedeniyle varsayılan santral homeostatik mekanizmalardaki rollerinin kanıtlanması bakımından dikkat çekicidir.

Çalışmamızda vagal afferent denervasyonun santral GLP-1'in inhibitör etkisini ortadan kaldırması GLP-1'in inhibitör etkisini gerçekleştiren santral yapıların fonksiyonlarının vagal afferent uyarının varlığına bağlı olduğunu gösterir. Sonuçlarımıza göre GLP-1'in etkisinde periferik kolinerjik ve adrenerjik yolların aracılığı yoktur. Çalışmamızda santral GLP-1 uygulamasıyla yavaşlayan mide boşalmasının önceden verilen spesifik reseptör antagonisti ekzendenle antagonize olması santral GLP-1'in mide boşalması üzerindeki etkisine spesifik reseptörlerinin aracılık ettiğini gösterir. İlginç olan santral GLP-1 etkisinin hem periferik ve hem de santral yoldan verilen antagonistle önlenmesidir. İhtimallerden biri santral yolla verilen GLP-1'in santral, periferik yolla verilen GLP-1'in ise hem santral, hem de periferik yolla ulaşılabilen iki ayrı bölgedeki reseptörleri uyarmış olmasıdır. Çok zayıf olan diğer ihtimal santral yolla verilen peptidin etkisini periferik GLP-1 reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirmiş olmasıdır. GLP-1 reseptörleri hakkındaki bilgilere en uygun ihtimal ise periferik yolla verilen reseptör antagonistinin de santral yapıları etkilemiş olmasıdır.

1996 yılında yapılan başka bir çalışmada intrakardiak yolla verilen radyoaktif maddeyle işaretlenmiş GLP-1'in reseptör otoradyografisi ile beyin kesitlerinde sirkumventriküler bölgede (subfornical organ ve area postrema) gösterilmesi (44) santral GLP-1 reseptörlerinin ligandlarının sistemik dolaşımdan gelebileceğinin gösterilmesi bakımından son derece ilginçtir. Sirkumventriküler organlar kan-beyin bariyeri olmayan, bu özelliği nedeniyle kan, serebrospinal sıvı ve beyin parankimi arasında nöral/humoral/hormonal bilgi alışverişini sağlayan merkezi sinir sistemi yapılarıdır (46). Pek çok hormon ve humoral mediatörden ve diğer beyin yapılarından aldıkları bilgileri içlerinde nukleus traktus solitariusun da bulunduğu önemli homeostatik ve otonom fonksiyonları olan merkezlere iletirler. Nukleus traktus solitarius ve hipotalamusa getiren ve götüren yollarla bağlı olan ve vagal afferentler yoluyla gastrointestinal sistemden, humoral mediatörler yardımıyla sistemik dolaşımdan bilgi alan area potremada GLP-1 reseptörlerinin bulunması GLP-1'in gastrointestinal fonksiyonların düzenlenmesindeki santral rolünü vurgular. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda periferik ve santral yolla verilen GLP-1'in mide boşalmasını geciktirmesi ve periferik yolla verilen ekzendinin santral GLP etkisiyle mide boşalmasında gözlenen gecikmeyi ortadan kaldırması hem santral ve hem de periferik yolla verilen GLP-1 ve ekzendinin etkilerini santral GLP-1 reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirmiş olabileceğini düşündürür.

Çalışmamızda santral verildiğinde mide boşalmasını geciktiren GLP-1 dozları 24 saatlik açlıktan sonra besin tüketimini değiştirmedir. Bulgumuz besin tüketimini azaltan santral etkinin mekanizmasının mide boşalmasını geciktiren santral etki mekanizmasından bağımsız olduğunu gösterir.

Asit içeren solusyonların mide boşalmasını yavaşlattığı bilinmektedir (90,148). Sıçan parietal hücrelerinde GLP-1'in cAMP yapımını ve asit salgısını artırdığı bilinmektedir (101). GLP-1'in mide boşalması üzerindeki inhibitör etkisi artmış asit sekresyonuna bağlı olabileceğinden çalışmamızda GLP-1'in mide boşalmasını inhibe eden dozlarını kullanarak uyanık sıçanlarda mide asit salgısını ve salgı hacmini ölçtük. GLP-1'in intrasisternal injeksiyonu mideden asit salgılanmasını ve salgı volumunu inhibe ederken aynı dozlar periferik yolla verildiğinde midenin asit salgısını değiştirmedir. GLP-1'in yalnızca santral yolla verildiğinde etkili olması peptidin gastrointestinal sistem fonksiyonlarının santral düzenlenmesinde yer aldığı hakkındaki görüşümüzü destekledi. Daha önce yapılan bir çalışmada da anestezi almış sıçanlarda periferik GLP-1 injeksiyonunun asit salgısını değiştirmedığı gösterilmiştir (101). Bir başka çalışmada insanda GLP-1 perfüzyonunun yalandan yemeye bağlı asit salgısını baskılaması (26) GLP-1'in mide asit salgısı üzerindeki etkisinin nöral aracılı olduğunu gösterir. Bulgularımız ve diğer çalışmaların sonuçları GLP-1'in mide salgısını etkisinin başlıca santral mekanizmalar aracılığıyla baskıladığını düşündürür.

SONUÇ

Bu çalışmada intragastrik glikozlu besin ile oluşan mide boşalmasındaki gecikmede endojen GLP-1'in rolü olduğu saptanmıştır. Ayrıca periferik ve santral yolla dışarıdan verilen GLP-1'in mide boşalma hızını spesifik reseptörleri ve vagal afferent yollar aracılığıyla geciktirdiği ve midenin asit salgılama fonksiyonunu santral bir mekanizmayla inhibe ettiği gösterilmiştir. GLP-1'in mide boşalması üzerindeki santral inhibitör etkisinde periferik kolinerjik ve adrenerjik yolların rol oynamadığı belirlenmiştir.

Sonuçlarımız GLP-1'in mide fonksiyonlarının santral ve periferik düzenlenmesinde rol oynayan bir beyin-barsak peptidi olduğunu gösterir. GLP-1 ve reseptörlerinin gastrointestinal sistem afferentlerinden ve area postrema aracılığıyla sistemik dolaşımdan bilgi alan, homeostasisi sağlayan limbik yapılar ve beyin sapındaki diğer otonom merkezlerle karşılıklı projeksiyonları olan dorsal motor komplekste bulunması GLP-1'in daha önce bildirilen beslenme davranışının santral düzenlenmesindeki yeri ve çalışmamızın sonuçlarıyla birlikte 'beyin-barsak eksenini' peptidlerinin yeni bir üyesi olduğunu düşündürür.

Bu çalışma Devlet Planlama Teşkilatı (96K 123310), Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (SBAG 1636), Marmara Üniversitesi Araştırma Fonu, Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT, Pm 95/0048) tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

İnce barsak endokrin hücrelerinden salgılanan insülinotropik hormon GLP-1 eksojen yolla verildiğinde insanlarda mide boşalmasını ve asit sekresyonunu inhibe eder. GLP-1 ve reseptörlerinin merkezi sinir sisteminde gastrointestinal sistemin merkezi fonksiyonlarını düzenleyen merkezlerde bulunduğu bilinmektedir. Ancak sözkonusu gastrointestinal etkilerin fizyolojik şartlardaki varlığı ve mekanizmaları bilinmemektedir.

Kronik gastrik kanüllü sıçanlarda periferik ve serebroventriküler yolla verilen GLP-1 fizyolojik tuzlu suyun mide boşalma hızını yavaşlattı. Aynı yollarla verilen spesifik reseptör antagonisti ekzenden amid mide boşalmasında GLP-1 etkisiyle görülen yavaşlamayı ortadan kaldırdı, periferik yolla verilen ekzenden santral GLP-1 injeksiyonuna bağlı inhibisyonu da antagonize etti. Perinöral kapsaisin uygulanarak vagal afferent denervasyon yapılmış sıçanlarda periferik ve santral yolla verilen GLP-1 tuzlu suyun mideden boşalma hızını değiştirmede. GLP-1'in sisterna magnaya injeksiyonu metil sellülozun mideden boşalmasını geciktirdi, uyanık sıçanlarda pilor ligasyonu yöntemiyle tayin edilen asit salgısını inhibe etti. Atropin metil nitrat ve bretilyum tosilat kullanılarak yapılan periferik kolinerjik ve adrenerjik blokaj metil sellülozun intrasisternal GLP-1 etkisiyle geciken mide boşalma hızını değiştirmede. Periferik ekzenden injeksiyonu mide boşalma hızında intragastrik glikoz uygulamasıyla ortaya çıkan gecikmeyi ortadan kaldırırken santral ekzenden injeksiyonu etkili olmadı. Santral yolla verilen GLP-1 mide boşalmasını yavaşlattığı dozlarda 24 saatlik açlıktan sonra gıda tüketimini değiştirmede.

Bu çalışma ile midenin hareket ve salgı fonksiyonlarının periferik ve santral regülasyonunda rol oynadığını gösterilen GLP-1, barsakta üretilip gastrointestinal sistemi düzenleyen santral yapılarda etkili olarak beyin-barsak iletişimini sağlayan ‘beyin-barsak eksenini’ peptidlerinin yeni bir üyesi olarak kabul edilebilir.



KAYNAKLAR

1. Fehmann HC, Habener JF. Insulinotropic glucagon like peptide-1(7-37)/(7-36) amide. A new incretin hormon. Trends Endocrinol Metab 1992;3:158-163.
2. Holst JJ, Orskov C. Glucagon and other glucagon derived peptides. Gut Peptides: Biochemistry and Physiology. Walsh JH, Dockray GJ, eds. New York, Raven Press 1994, sayfa 305-340.
3. Holst JJ, Orskov C, Nielsen OV, Schwartz TW. Truncated glucagon-like peptide-1, an insulin releasing hormone from the distal gut. FEBS Lett. 1987;211:169-173.
4. Kreymann B, Williams G, Ghatei M A, Bloom SR. Glucagon like peptide -1 7-36: A physiological incretin in man. Lancet 1987; ii:1300-1304.
5. Brown, J. C. Enteroinsular axis. Gut Peptides: Biochemistry and Physiology. J. H. Walsh & G. J. Dockray eds., New York, Raven Press, Ltd. 1994, sayfa 765-784.
6. Holst JJ. Glucagon like peptide 1: A newly discovered gastrointestinal hormone. Gastroenterology 1994;107:1848-1855.
7. Orskov C, Holst JJ, Nielsen OV. Effect of truncated gkucagon-like peptide-1 (proglucagon-(78-107) amide) on endocrine secretion from pig pancreas, antrum and nonantral stomach. Endocrinology 1988;123:2009-2013.

8. Fehmann HC, Habener JF. Functional receptors for the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37) on a somatostatin secreting cell line. *FEBS Lett.* 1991;279:335-340.
9. Moens K, Heimberg H, Flamez D, Huypens P, Quartier E, Ling Z, Pipeleers S, Gremlich S, Thorens B, Schuit F. Expression and functional activity of glucagon, glucagon-like peptide-1, and glucose-dependent insulinotropic peptide receptors in rat pancreatic islet cells. *Diabetes* 1996;45:257-261.
10. Fehmann HC, Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon like peptide -1 (7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma BTC1 cells. *Endocrinology* 1992;130:159-160.
11. Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahren B, Efendic S. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.* 1992;326:1316-1322.
12. D'Alessio DA, Kahn SE, Leusner CR, Ensinck JW. Glucagon like peptide -1 enhances glucose tolerance both by stimulation of insulin release and by increasing insulin independent glucose disposal. *J Clin. Invest.* 1994;93:2263-2266
13. Qualmann C, Nauck MA, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W. Insulinotropic actions of intravenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (7-36 amide) in the fasting state in healthy subjects. *Acta. Diabetol.* 1995;32:13-16.

14. Nauck MA, Kleine N, Orskov C, Holst JJ, Willms B, Creutzfeldt W. Normalization of fasting hyperglycemia by exogenous GLP-1 (7-36 amide) in type 2-diabetes patients. *Diabetologia* 1993;36:741-744.
15. Gutniak MK, Linde B, Holst JJ, Efendic S. Subcutaneous injection of the incretin hormone glucagon-like peptide-1 abolishes postprandial glycaemia in NIDDM. *Diabetes Care* 1994;17:1039-1044.
16. Gutniak MK, Larsson H, Heiber SJ, Juneskans OT, Holst JJ, Ahren B. Potential therapeutic levels of glucagon-like peptide 1 achieved in humans by a buccal tablet. *Diabetes Care* 1996;19:843-848.
17. Gutniak MK, Juntti-Berggren L, Hellström PM, Guenifi A, Holst JJ, Efendic S. Glucagon-like peptide-1 enhances the insulinotropic effect of glibenclamide in NIDDM patients and in the perfused rat pancreas. *Diabetes Care* 1996;19:857-863.
18. Creutzfeldt WOC, Kleine N, Willms B, Orskov C, Holst JJ, Nauck MA. Glucanostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care* 1996;19:580-586.
19. Wettergren A, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ. Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107 amide) inhibits gastric and pancreatic function in man. *Dig. Dis. Sci.* 1993;38:665-673.

20. Schirra J, Katschinski M, Kuwert P, Wank U, Arnold R, Göke B. Differential effects of subcutaneous GLP-1 on gastric emptying, insulin release and exocrine pancreas secretion in man. *Gastroenterology* 1995;108:A166.
21. Nauck MA, Niedereichholz U, Ettler R, Orskov C, Holst JJ. Evidence against a physiological role of GLP-1 as an insulinotropic incretin hormone in healthy volunteers. *Gastroenterology* 1996;110:A233.
22. Schirra, J., U. Wank, P. Houck, B. Göke, M. Katschinski. Effects of GLP-1 on human antro-pyloro-duodenal motility. *Gastroenterology* 110: A920, 1996.
23. Anvari M, Paterson CA, Daniel EE, McDonald TJ. Effect of GLP-1 on antropyloric motility, transpyloric flow and gastric emptying of non-nutrient liquids in conscious dogs. *Gastroenterology* 1995;108:A501.
24. Schjoldager B, Mortensen PE; Christiansen J, Orskov C, Holst JJ. GLP-1 (glucagon-like peptide-1) and truncated GLP-1 fragments of human proglucagon inhibit gastric acid secretion in man. *Dig. Dis. Sci.* 1989;38:703-708.
25. O'Halloran, Nikou GC, Kreyman B, Ghatei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 (7-36)-NH₂: a physiological inhibitor of gastric acid secretion in man. *J. Endocrinology* 1990;126:169-173.
26. Wettergren A, Petersen H, Orskov C, Christiansen J, Sheikh SP, Holst JJ. Glucagon like peptide -1 (GLP-1) 7-36 amide and peptide YY from the L cell in the ileal mucosa are potent inhibitors of vagally induced gastric acid in man. *Scand. J. Gastroenterol.* 1994;29:501-505.

27. Spiller, RC, Trotman IF, Higgins BE, Ghatei MA, Grimble GK, Lee YC, Bloom SR, Misiewicz JJ, Silk DBA. The ileal brake-inhibition of jejunal motility after ileal fat perfusion in man. *Gut* 1984;25:365-374.
28. Read NW, McFarlane A, Kinsman RI, Bates TE, Blackhall NW, Farrar GBJ, Hall JC, Moss G, Morris AP, O'Neill B, Welch I, Lee Y, Bloom SR. Effect of infusion of nutrient solutions into the ileum on gastrointestinal transit and plasma levels of neurotensin and enteroglucagon. *Gastroenterology* 1984;86:274-280.
29. Wen J, Phillips SF, Sarr GM, Kost LJ, Holst JJ. PYY and GLP-1 contribute to feedback inhibition from the canine ileum and colon. *Am. J. Physiol.* 1995;269 (Gastrointest. Liver Physiol.32):G945-G952.
30. Schimuzi I, Hirota M, Ohboshi C, Shima K. Identification and localization of glucagon-like peptide-1 and its receptors in the rat brain. *Endocrinology* 1987;121:1076-1082.
31. Kreyman B, Ghatei MA, Burnet P, Williams G, Kanse S, Diani AR, Bloom SR. Characterization of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide in the rat hypothalamus. *Brain Res* 1989;502:325-331.
32. Lui EY, Asa SL, Drucker DJ, Lee YC, Braubacker PL. Glucagon and related peptides in fetal rat hypothalamus in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1990;126:110-117.
33. Salazar I, Vaillant C. Glucagon-like immunoreactivity in hypothalamic neurons of the rat. *Cell Tissue Res.* 1990;261:355-358.

34. Han VKM, Hynes MA, Towle AJ, Lauder JM, Lund PK. Cellular localization of proglucagon/glucagon-like peptide 1 messenger RNAs in the rat brain. *J. Neuroscience Research* 1986;16:97-107.
35. Drucker DJ, Asa S. Glucagon gene expression in vertebrate brain. *J. Biol. Chem.* 1988;263:13475-13478.
36. Jin SLC, Han VKM, Simmons JG, Towle AC, Lauder JM, Lund PK. Distribution of glucagon like peptide-1 (GLP-1), glucagon and glicentin in the rat brain: An immunocytochemical study. *J.Comp. Neurol.* 1988;271:519-532.
37. Kauth T, Metz J. Immunohistochemical localization of glucagon-like peptide 1. Use of poly- and monoclonal antibodies. *Histochemistry* 1987;86:509-515.
38. Kanse SM., Kreymann B, Ghatei MA, Bloom SR. Identification and characterization of glucagon-like peptide-1 binding sites in the rat brain and lung. *FEBS Lett.* 1988;241: 209-212.
39. Uttenthal LO, Toledano A, Blazquez E. Autoradiographic localization of receptors for glucagon like peptide 1 (7-36) amide in rat brain. *Neuropeptides* 1992;21:143-146.
40. Göke B, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Sheikh SP. Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. *Eur. J. Neurosci.* 1995;7:2294-2300.
41. Turton MD, O'shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CMB, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JPH, Smith DM, Ghatei MA,

- Herbert J, Bloom SR. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 1996;379:69-72
42. Tang-Christensen M, Larsen PJ, Göke R, Fink-Jensen A, Jessop DS, Moller M, Sheikh SP. Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am. J. Physiol.* 1996;271(Regulatory Integrative Comp. Physiol. 40):R848-R856.
43. Van Dijk G, Larsen PJ, Göke R, Fink-Jensen A, Jessop DS, Moller M, Sheikh SP. Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am. J. Physiol.* 1996;271 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 40): R848-R856.
44. Orskov C, Poulsen SS, Moller M, Holst JJ. Glucagon-like peptide-1 receptors in the subfornical organ and the area postrema are accessible to circulating glucagon-like peptide 1. *Diabetes* 1996;45:832-835.
45. Rogers, RC., McTigue DM, and Hermann GE. Vagal control of digestion: modulation by central neural and peripheral endocrine factors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1996;20: 57-66.
46. Johnson AK, Gross PM. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J.* 1993;7:678-686.
47. Mojsos S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J. Biol. Chem.* 1986;261:11880-11889.

48. Orskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FGA, Poulsen SS, Nielsen OV. Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from the pig small intestine, but not pancreas. *Endocrinology* 1986;119:14467-1475.
49. Hoyt HC, Lund PK, Winesett DE, Fuller CR, Ghatei MA, Bloom SR, Ulshen MH. Effects of fasting, refeeding and intraluminal triglyceride on proglucagon expression in jejunum and ileum. *Diabetes* 1996;45:434-439.
50. Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ. Human colon produces fully processed glucagon like peptide -1 (7-36) amide. *FEBS Lett.* 1995;372:269-72.
51. Orskov C. Glucagon like peptide 1, a new hormone of the enteroinsular axis. *Diabetologia* 1992;35:701-711.
52. Bell, GI, Sanchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC. Exon duplication and divergence in the human proglucagon gene. *Nature* 1983;304:368-371.
53. Bell GI, Santerre RF, Mullenbach GT. Hamster proglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* 1983;302:716-718.
54. Orskov C, Bersani M, Johnsen AH, Hojrup P, Holst JJ. Complete sequences of glucagon-like peptide-1 from human and pig small intestine. *J. Biol. Chem.* 1989;264:12821-12829.
55. Fehmann HC. Enteroglucagons. *Physiology of The Gastrointestinal Tract*. 3rd edition, edited by Leonard R Johnson. New York, Raven Press. 1994, sayfa 95-102.

56. Orskov C, Rabenhoj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide-1 in humans. *Diabetes* 1994;43:535-539.
57. Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1 (7-36) amide, peptide histidine methionin and is responsible for their digestion in human serum. *Eur. J. Biochem.* 1993;214:829-235.
58. Orskov C, Andreasen J, Holst JJ. All products of proglucagon are elevated in plasma from uremic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:379-384.
59. Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide That is a major endogenous metabolite in vivo. *J. Clin. Endocrinol .Metab.* 1995;80:952-957.
60. Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide-1 are rapidly degraded from the NH₂ terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 1995;44:1126-1131.
61. Hendrick GK, Gjinovci A, Baxter LA, Mojsov S, Wollheim CB, Habener JF, Weir GC. Glucagon-like peptide-1-(7-37) suppresses hyperglycemia in rats. *Metabolism* 1993;42:1-6.

62. Ruiz Grande C, Pintada J, Alarcon C, Castilla C, Valverde I. Renal catabolism of human glucagon-like peptides 1 and 2. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1990;68:1568-1573.
63. Orskov C, Wettergren A, Holst JJ. Biological effects and metabolic rates of glucagon-like peptide-1 7-36 amide and glucagon-like peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes* 1993;42:658-661.
64. Schirra J, Katschinski M, Weidmann C, Schafer T, Wank U, Arnold R, Göke B. Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. *J. Clin. Invest.* 1996;97:92-103.
65. Pridal L, Ingwersen SH, Larsen FS, Holst JJ, Adelhorst K, Kirk O. Comparison of sandwich enzyme-linked immunoabsorbant assay for determination of exogenous glucagon-like-peptide-1 (7-36) amide in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1995;13:841-50.
66. Kolligs F, Fehmman HC, Göke R, Göke B. Reduction of the incretin effect in rats by the glucagon-like peptide-1 receptor antagonist exendin 9-39 amide. *Diabetes* 1995;44:16-19.
67. Orskov C, Jeppesen J, Madsbad S, Holst JJ. Proglucagon products in plasma of noninsulin-dependent diabetics and nondiabetic controls in the fasting state and after oral glucose and intravenous arginine. *J. Clin. Invest.* 1991;87:415-423.
68. Nauck MA, Bartels E, Orskov C, Ebert R, Creutzfeldt W. Lack of effect of gastric inhibitory polypeptide and glucagon like peptide-1(7-36 amide) infused at

near physiological concentrations on pentagastrin stimulated gastric acid secretion in normal human subjects *Digestion* 1992;52:214-221.

69. D'Alessio DA, Prigeon RL, Ensinnck JW. Enteral enhancement of glucose disposition by both insulin-dependent and insulin independent processes. A physiological role of glucagon like peptide -1. *Diabetes* 1995;44:1433-1437.
70. Elliot RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V. Glucagon like peptide -1 (7-36) amide and glucose dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute postprandial and 24 h secretion patterns. *J. Endocrinology* 1993;138:159-166.
71. Herrman C, Göke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Göke B. Glucagon like peptide -1 and glucose dependent insulin releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 1995;56:117-126.
72. Orskov C, Rabenhoj L, Kofod H, Wettergren A, Holst JJ. Production and secretion of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide-1 in man. *Diabetes* 1994;43:535-539.
73. Rocca AS, Braubaker PL. Stereospecific effects of fatty acids on proglucagon derived peptide secretion in fetal rat intestinal cultures. *Endocrinology* 1995;136:5593-5599.
74. Roberge JN, Braubaker PL. Secretion of proglucagon derived peptides in response to intestinal luminal nutrients. *Endocrinology* 1991;128:3169-3174.

75. Ritzel U, Leonhardt A, Fromme F, Stöckmann F, Ramadori G. Stimulation of glucagon-like peptide-1 release in the perfused rat ileum. *Gastroenterology* 1995;108:A812.
76. Shima K, Suda T, Nishimoto K, Yoshimoto S. Relationship between molecular structures of sugars and their ability to stimulate the release of glucagon like peptide-1 from canine ileal loops. *Acta Endocrinologica* 1990;123:464-470.
77. Sugiyama K, Manaka H, Yamatani K, Tominaga M, Sasaki H. Stimulation of truncated glucagon like peptide -1 release from the isolated perfused canine ileum by glucose absorption. *Digestion* 1994;55:24-28.
78. Katschinski M, Schirra J, Weidmann C, Schafer T, Arnold R, Göke B. Incretin release to oral and duodenal glucose loads in man. *Gastroenterology* 1995;108:A .
79. Knapper JM, Heath A, Fletcher JM, Morgan LM, Marks V. GIP and GLP-1 (7-36) amide secretion in response to intraduodenale infusion of nutrients in pigs. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 1995;111:445-450.
80. Layer P, Holst JJ, Grandt D, Goebell H. Ileal release of glucagon like peptide -1 (GLP-1) Association with inhibition of gastric acid secretion in humans. *Dig. Dis. Sciences* 1995;40:1074-1082.
81. Qualmann C, Nauck MA, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W. Glucagon like peptide -1 (7-36) amide secretion in response to luminal sucrose from the upper and lower gut. A study using alpha-glucosidase inhibition (acarbose). *Scand. J. Gastroenterol.* 1995;30:892-6.

82. Plaisancié P, Dumoulin V, Chayvialle JA, Cuber JC. Luminal glucagon like peptide 1 (7-36) amide releasing factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *J. Endocrinology* 1995;145:521-526.
83. Adrian TE, Ballantyne GH, Longo WE, Bilchik AJ, Graham S, Basson MD, Tierney RP, Modlin IM. Deoxcholate is an important releaser of peptide YY and enteroglucagon from the human colon. *Gut* 1993;34:1219-1224.
84. Braubaker PL. Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by intestinal regulatory peptides. *Endocrinology* 1991;128:3175-3182.
85. Abello J, Ye F, Bosshard A, Bernard C, Cuber JC, Chayvialle JA. Stimulation of glucagon like peptide -1 secretion by muscarinic agonist in a murine intestinal endocrine cell line. *Endocrinology* 1994;134:2011-2017.
86. Herrman-Rinke C, Vöge A, Hess M, Göke B. Regulation of glucagon like peptide -1 secretion from rat ileum by neurotransmitters and peptides. *J. Endocrinology* 1995;147:25-31.
87. Dumoulin V, Dakka T, Plaisancié P, Chayvialle JA, Cuber JC. Regulation of glucagon like peptide -1 (7-36) amide, peptide YY and neurotensin secretion by neurotransmitters and gut hormones in the isolated vascularly perfused rat ileum. *Endocrinology* 1995;136:5182-5188.
88. Nauck MA, Bartels E, Orskov C, Ebert R, Creutzfeldt W. Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological

- insulinotropic hormone and glucose concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993;76:912-917.
89. Thorens B. Expression cloning of the pancreatic B cell receptor for the glucagon-like peptide-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992;89:8641-8645.
90. Thorens B, Porret A, Bühler R, Deng S-P, Morel P, Widmann C. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes* 1993;42:1678-1682.
91. Stoffel M, Espinoza III R, Le Beau M.M., Bell GI. Human glucagon-like-peptide-1 receptor gene. Localization to chromosome band 6p21 by fluorescence in situ hybridization and linkage of a highly polymorphic simple tandem repeat DNA polymorphism to other markers on chromosome 6. *Diabetes* 1993;42:1215-1218.
92. Wei Y, Mojsov S. Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-1: Brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett.* 1995;358:219-224.
93. Fehmman HC, Jiang J, Schweinfurth J, Wheeler MB, Boyd AE, Göke B. Stable expression of the rat GLP-1 receptor in CHO cells: activation and binding characteristics utilizing GLP-1(7-36)-amide, oxyntomodulin, exendin-4 and exendin(9-39). *Peptides* 1994;15:453-456.

94. Holz GG, Kühtreiber WM, Habener JF. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like-peptide-1(7-37). *Nature* 1993;361:362-365.
95. Wheeler MB, Lu M, Dillon JS, Lengh XH, Chen C, Boyd AE. Functional expression of the rat glucagon-like peptide-1 receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C. *Endocrinology* 1993;133:57-62.
96. Gromada J, Dissing S, Bokvist K, Renström E, Frokjaer-Jensen J, Wulff BS, Rorsman P. Glucagon-like peptide 1 increases cytoplasmic calcium in insulin secreting BTC3-cells by enhancement of intracellular calcium mobilization. *Diabetes* 1995;44:767-774.
97. Thorens B, Widmann C. Signal transduction and desensitization of the glucagon-like-peptide-1 receptor. *Acta Physiol. Scand.* 1996;157:317-319.
98. Göke R, Fehmann HC, Linn T, Schmidt H, Krause M, Eng J, Göke B. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like-peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin secreting β -cells. *J. Biol. Chem.* 1993;268:19650-19655.
99. Raufmann J-P, Singh L, Singh G, Eng J. Truncated glucagon-like peptide-1 interacts with exendin receptors on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem.* 1992;267:21432-21437.

100. Singh G, Eng J, Raufmann J-P. Use of ^{125}I -[Y 39]exendin-4 to characterize exendin receptors on dispersed pancreatic acini and gastric chief cells from guinea pig. *Reg. Peptides* 1994;53:47-59.
101. Schmidtler J, Scheep W, Janczewska I, Weigert N, Furlinger C, Schusdziarra V, Classen M. GLP-1-(7-36) amide, -(1-37), and -(1-36)amide potent cAMP-dependent stimuli of rat parietal cell function. *Am J Physiol* 1991;260(Gastrointest. Liver Physiol. 23):G940-G950.
102. Schmidtler J, Dehne K, Offermans S, Rosenthal W, Classen M, Scheep W. Stimulation of rat parietal cell function by histamine and GLP--(7-36) amide is mediated by G $_{\text{ia}}$. *Am. J. Physiol.* 1994;266(Gastrointest. Liver Physiol. 29):G775-G782.
103. Rai A, Singh G, Raffeniello R, Eng J, Raufmann J-P. Actions of Helodermatidae venom peptides and mammalian glucagon-like peptides on gastric chief cells. *Am. J. Physiol.* 1993;265(Gastrointest. Liver Physiol. 28):G118-G125.
104. Uttenthal LO, Blazquez E. Characterization of high affinity receptors for truncated glucagon-like peptide-1 in rat gastric glands. *FEBS Lett.* 1990;262:139-141.
105. Hoosein NM, Gurth GS. Human glucagon-like peptides 1 and 2 activate rat brain adenylate cyclase. *FEBS Lett.* 1984;178:83-86.

106. Merida E, Delgado E, Molina LM, Villanueva-Panacarrillo M-L, Valverde I. Presence of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide receptors in solubilized membranes of human adipose tissue. *J. Clin. End. Met.* 1993;77:1654-1657.
107. Valverde I, Merida E, Delgado E, Trapote MA, Villanueva-Panacarrillo ML. Presence and characterization of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide receptors in solubilized membranes of rat adipose tissue. *Endocrinology* 1993;132:75-79.
108. Richter G, Göke R, Göke B, Schimidt H, Arnold R. Characterization of glucagon-like peptide-1(7-36)amide receptors of rat lung membranes by covalent cross-linking. *FEBS Lett.* 1991;280:247-250.
109. Gromada J, Dissing S, Rorsman P. Desensitization of glucagon-like peptide 1 receptors in insulin-secreting BTC3 cells: role of PKA-independent mechanisms. *British J. Pharmacol.* 1996;118:769-775.
110. Göke B, Steffen H, Göke R. The signal transduction of the glucagon like peptide 1 receptor: fishing beyond the protein kinase level. *Acta Physiol. Scand.* 1996;157:321-328.
111. Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman J-P. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem.* 1992;267:7402-7405.

112. Wang Z, Wang RM, Owji AA, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 is a physiological incretin in rat. *J. Clin. Invest.* 1995;95:417-421.
113. D'Alessio D, Vogel R, Prigeon R, Lachansky E, Koerker D, Eng J, Ensink JW. Elimination of the action of glucagon-like peptide-1 causes an impairment of glucose tolerance after nutrient ingestion by healthy baboons. *J. Clin. Invest.* 1996;97:133-138.
114. Fehmann HC, Göke B, Göke R. Synergistic stimulatory effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide on the endocrine rat pancreas. *FEBS Lett.* 1989;252:109-112.
115. Fieseler P, Bridenbaugh S, Nustede R, Martell J, Orskov C, Holst JJ, Nauck MA. Physiological augmentation of aminoacid- induced insulin secretion by GIP and GLP-1 but not by CCK-8. *Am. J. Physiol.* 1995;268(Endocrinol. Metab. 31):E949-E955.
116. Jones PM, Persaud SJ, Howell SL. Ca^{+2} -induced insulin secretion from electrically permeabilized islets. *Biochem. J.* 1992;285:973-978.
117. Nauck MA, Heimsaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide-1 (7-36 amide) but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 1993;91:301-307.

118. Kawai K, Suzuki S, Ohashi S. Comparison of the effects of glucagon-like peptide-1-(1-37) and (7-37) and glucagon on islet hormone release from isolated perfused canine and rat pancreas. *Endocrinology* 1989;124:1768-1772.
119. Hvidberg A, Nielsen MT, Hilsted J, Orskov C, Holst JJ. Effect of glucagon-like peptide-1 (proglucagon 78-107 amide) on glucose production in healthy man. *Metabolism* 1994;43:104-108.
120. Elahi D, Mc Aloon-Dyke M, Fukagawa NK, Meneilly GS, Sclater AL, Minaker KL, Habener JF, Andersen DK. The insulinotropic actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (77-37) in normal and diabetic subjects. *Reg. Peptides* 1994;51:63-74.
121. Villanueva-Panacarrillo M-L, Alcantara AI, Clemente F, Delgado E, Valverde I. Potent glycogenic effect of GLP-1 (7-36) amide in rat skeletal muscle. *Diabetologia* 1994;37:1163-1166.
122. Valverde I, Morales M, Clemente F, Lopez-Delgado MI, Delgado E, Perea A, Villanueva-Panacarrillo M-L. Glucagon like peptide -1:a potent glycogenic hormone. *FEBS Lett.* 1994;349:313-316.
123. Delgado E, Luque MA, Alcantara A, Trapota MA, Clemente F, Galera C, Valverde I, Villanueva-Panacarrillo ML. Glucagon-like peptide-1 binding to rat skeletal muscle. *Peptides* 1995;16:225-229.
124. Fürnsinn C, Ebner K, Waldhausl W. Failure of GLP-1 (7-36) amide to affect glycogenesis in rat skeletal muscle. *Diabetologia* 1995;38:864-867.

125. Campos RV, Lee YG, Drucker DJ. Divergent tissue specific and developmental expression of receptor for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. *Endocrinology* 1994;134:2156-2164.
126. Villanueva-Panacarrillo M-L, Delgado E, Trapote MA, Alcantara AI, Clemente F, Luque MA, Perea A, Valverde I. Glucagon-like peptide-1 binding to rat hepatic membranes. *J. Endocrinology* 1995;146:183-189.
127. Blackmore PF, Mojsov S, Exton JH, Habener JF. Absence of insulinotropic glucagon-like peptide-1 (7-36) receptors on isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 1991;283:7-10.
128. Shimizu I, Hirota M, Ohboshi C, Shima K. Effect of glucagon-like peptide-1 and -2 on glycogenolysis in cultured rat hepatocytes. *Biomedical Research.* 1986;7:431-436.
129. Willms B, Werner J, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W, Nauck MA. Gastric emptying, glucose responses and insulin secretion after a liquid test meal: Effects of glucagon like peptide-1(GLP-1)-(7-36)amide in type 2(noninsulin dependent) diabetic patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996;81:327-332.
130. Layer P, Holst JJ. GLP-1: a humoral mediator of the ileal brake in humans? *Digestion* 1993;54:385-386.

131. Dupre J, Behme MT, Hramiak IM, McFarlane P, Williamson MP, Zabel P, McDonald TJ. Glucagon-like peptide 1 reduces postprandial glycemic excursions in IDDM. *Diabetes* 1995;44:626-630.
132. Eiselle R, Koop H, Arnold R. Effect of glucagon-like peptide-1 on gastric somatostatin and gastrin secretion in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* 1990;225:449-454.
133. Jia X, Brown JC, Kwok YN, Pederson RA, McIntosh CHS. Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1(7-36) amide exert similar effects on somatostatin secretion but opposite effects on gastrin secretion from the rat stomach. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1994;72:1215-1219.
134. Suda K, Takahashi N, Fukase N, Manaka H, Tominaga M, Sasaki H. Distribution and molecular forms of glucagon-like peptide in the dog. *Life Sci.* 1989;45:1793-1798.
135. Gross L, Hollande F, Thorens F, Kervran A, Betaille D. Comparative effects of GLP-1-(7-36) amide, oxyntomodulin and glucagon on rabbit gastric parietal cell function. *Eur. J. Pharmacol.* 1995;288:319-327.
136. Schimidtler J, Dehne K, Aliescher H-D, Schusziarra V, Classen M, Holst JJ, Polack A, Scheep W. Rat parietal cell receptors for GLP-1-(7-36) amide: northern blot, cross-linking and radioligand binding. *Am. J. Physiol.* 1994;267(Gastrointest. Liver Physiol. 30):G423-G432.

137. Bamba T, Sasaki M, Hosodo S. Enteroglucagon a putative humoral factor inducing pancreatic hyperplasia after proximal small bowel resection. *Dig. Dis. Sci.* 1994;39:1532-1536.
138. Yoshimoto S, Hirota M, Ohboshi C, Shima K. Identification of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in the rat brain. *Ann. Clin. Biochem.* 1989;26:169-171.
139. P Blanche, Kervran A, Bataille D. Oxyntomodulin and glicentin: Brain-gut peptides in the rat. *Endocrinology* 1988;123:2782-2787.
140. Shughrue PJ, Lane MV, Mercenthaler I. Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 1996;137: 5159-5162.
141. Richter G, Feddersen O, Wagner U, Barth P, Göke R, Göke B. GLP-1 stimulates secretion of macromolecules from airways and relaxes pulmonary artery. *Am. J. Physiol.* 1993;265 (Lung Cell Mol. Physiol. 9): L374-L381.
142. Roman C, Gonella J. Extrinsic control of digestive tract motility. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2nd edition, edited by Leonard R Johnson. Raven Press. New York 1987, p. 507-553.
143. Grundy D, Stratcherd T. Sensory afferents from the gastrointestinal tract. *Handbook of Physiology: The Gastrointestinal System. Motility and Circulation.* American Physiological Society, Bethesda Maryland. 1989, sect. 6, vol. I pt. I, chap. 16, sayfa. 593-620.

144. Mayer EA. The physiology of gastric storage and emptying. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 3rd edition, edited by Leonard R Johnson. Raven Press. New York 1994, p. 929-976..
145. Malbert CH, Mathis C, Laplace JP. Vagal control of pyloric resistance. Am. J. Physiol. 1995;269 (Gastrointest. Liver Physiol 32):G558-G569.
146. Dent J, Sun WM, Anvari M. Modulation of pumping functions of gastric body and antropyloric contractions. Dig. Dis. Sci. 1994;12:28S-31S.
147. Hölzer HH, Raybould HE. Vagal and splanchnic sensory pathways mediate inhibition of gastric motility induced by duodenal distention. Am. J. Physiol. 1992;262 (Gastrointest. Liver Physiol 25):G603-G608.
148. Forster ER, Green T, Elliot M, Bremner A, Dockray GJ. Gastric emptying in rats: role of afferent neurons and cholecystokinin. Am J Physiol 1990;258:G552-G556.
149. Forster ER, Green T, Dockray GJ. Efferent pathways in the reflex control of gastric emptying in rats. Am J Physiol 1991;260:G499-G504.
150. Raybould HE, Zittel TT, Holzer HH, Lloyd KCK, Meyer JH. Gastroduodenal sensory mechanisms and CCK in inhibition of gastric emptying in response to a meal. Dig. Dis. Sci. 1994;39: 41S-43S.
151. Yeğen BÇ, Gürbüz V, Coşkun T, Bozkurt A, Kurtel H, Alican İ, Dockray GJ. Inhibitory effects of gastrin releasing peptide on gastric emptying in rats. Reg. Peptides 1996;61:175-180.

152. Hölzer HH, Turkelson CM, Solomon TE, Raybould HE. Intestinal lipid inhibits gastric emptying via CCK and vagal capsaicin-sensitive afferent pathways in rats. *Am. J. Physiol.* 1994;267 (Gastrointest. Liver Physiol. 30): G625-G629.
153. Ewart WR, Wingate D L. Central representation of arrival of nutrient in the duodenum. *Am J Physiol* 246 (Gastrointest. Liver Physiol. 9): G750-G756, 1984.
154. Lin HC, Doty JE, Reedy TJ, Meyer JH. Inhibition of gastric emptying by glucose depends on length of intestine exposed to nutrient. *Am. J. Physiol.* 1989;256 (Gastrointest. Liver Physiol 19): G404-G411.
155. Raybould HE. Capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK in inhibition of gastric motor function induced by intestinal nutrients. *Peptides* 1991;12:1279-1283.
156. Mei N. Vagal glucoceptors in the small intestine of the cat. *J. Physiol. (Lond.)*. 1978;282: 485-506.
157. Raybould HE, Zittel TT. Inhibition of gastric motility induced by intestinal glucose in awake rats: role of Na⁺-glucose co-transporter. *Neurogastroenterol. Mot.* 1995;7:9-14.
158. Raybould HE, Hölzer HH. Dual capsaicin-sensitive pathways mediate inhibition of gastric emptying in rat induced by carbohydrate. *Neurosci. Lett.* 1992;141: 236-238.
159. Barnett JL, Owyang C. Serum glucose concentration as a modulator of interdigestive gastric motility. *Gastroenterology* 1988;94: 739-744.

160. Fraser R, Horowitz M, Dent J. Hyperglycaemia stimulates pyloric motility in normal subjects. *Gut* 1991;32: 475-478.
161. Hirano T, Nijima A. Effects of 2-deoxy-D-glucose and insulin on efferent activity in gastric nerve. *Experientia (Basel)* 1980;36: 1197-1198.
162. Gillis RA, Quest JA, Pagani FD, Norman WP. Control centers in the central nervous system for regulating gastrointestinal motility. *Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System. Motility and Circulation. American Physiological Society, Bethesda, Maryland. 1989, sect. 6, vol. I pt. I, chap. 17, sayfa 621-683.*
163. Coşkun T, Bozkurt A, Alican İ, Özkutlu U, Kurtel H, Yeğen B Ç. Pathways mediating CRF-induced inhibition of gastric emptying in rats. *Reg. Pep. (baskıda)*
164. Dimaline R, Carter N, Barnes S. Evidence for reflex adrenergic inhibition of acid secretion in the conscious rat. *Am. J. Physiol.* 1986;251 (Gastrointest. Liver Physiol. 14): G615-G618.
165. Raybould HE, Sternini K, Yoneda M, Eysselein VE, Holzer P. Selective ablation of spinal sensory neurons containing CGRP inhibits the increase in rat gastric mucosal blood flow due to acid back-diffusion. *Peptides* 1992;13: 249-254.
166. Green T, Dimaline R, Peikin S, Dockray GJ. The action of the cholecystokinin antagonist L364,718 on gastric emptying of liquid meals in the conscious rat. *Am. J. Physiol.* 1988;255 (Gastrointest. Liver Physiol. 18): G685-G689.

167. Scarpignato C, Capovilla T, Bertaccini G. Action on gastric emptying of conscious rats. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 1980; 246: 708-711.
168. Wang W Ss F, Rahwan RG. Antiulcer activity of the calcium antagonist propylmethylene-dioxyindene-11. Effects on acid secretion and gastric emptying in rats. *Clin. Pharmacol.* 1990; 21: 327-331.

