

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**TAVŞAN İZOLE MİDE FUNDUSUNDA KOLİNERJİK AŞIRIM
ÜZERİNE NİKOTİNİN ETKİSİ : PİROGALLOL VE ANTİOKSİDANLARIN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI .**

DOKTORA TEZİ

Dr.Ainagül ANUVARBEKOVA

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yusuf SARIOĞLU

ANKARA
Eylül 2007

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**TAVŞAN İZOLE MİDE FUNDUSUNDA KOLİNERJİK AŞIRIM
ÜZERİNE NİKOTİNİN ETKİSİ : PİROGALLOL VE ANTİOKSİDANLARIN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI .**

DOKTORA TEZİ

Dr.Ainagül ANUVARBEKOVA

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yusuf SARIOĞLU

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından SBE-01/2004 – 77 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Eylül 2007

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI

ÖĞRENCİNİN ADI VE SOYADI : Ainagül ANUVARBEKOVA
ANABİLİM DALI : FARMAKOLOJİ (TIP)
SINAV TARİHİ : 27.09.2007
TEZ KONUSU : Tavşan İzole Mide Fundusunda Kolinerjik Aşırım Üzerine
Nikotinin Etkisi : Ksantin/Ksantin Oksidaz Sistemi Ve Allopurinol'ün Rolü.

KARAR : Başarılı

Yukarıda belirtilen tarihte yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda yukarıda konusu belirtilen tezin

Düzeltilmesine :
Kabulüne : Kabulüne
Reddine :

OYBİRLİĞİ / ~~ÇOKLUK~~ İLE KARAR VERİLMİŞTİR.

GEREKÇE : Tez başlığının değiştirilmesi; "Tavşan izole mide fundusundaki kolinerjik aşırım üzerine nikotinin etkisi; Pirogallol ve Antiksidanların etkisinin araştırılması." Yapılan tez çalışmasının içeriğini daha net yazdığı için.

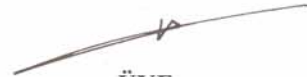
JÜRİ BAŞKANI

Prof.Dr. Yusuf SARIOĞLU



ÜYE

Prof.Dr. Sevim ERCAN



ÜYE

Prof.Dr. Deniz ERBAŞ

ÜYE

Prof.Dr. Atilla BOZKURT



ÜYE

Doç.Dr.Canan ULUOĞLU

İÇİNDEKİLER:

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekil ve Tablo listesi	vi
Semboller, Kısaltmalar	viii
I.GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Kolinerjik Sistem ve Nöronal Nikotinik Reseptörler.....	7
2.1.1.Nikotinik reseptörlerin moleküler yapısı.....	7
2.1.2.Nöronal nikotinik reseptörlerin patofizyolojideki Rolü.....	10
2.1.3. Periferik nöronal nikotinik reseptörler.....	12
2.1.4. Nöronal nikotinik reseptörlerin Kalsiyum Geçirgenliği.....	13
2.1.5. Nöronal nikotinik reseptörlerin agonistleri ve antagonistleri.....	14
2.2. Nikotin.....	16
2.3. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR).....	22
2.3.1.Serbest Oksijen Radikalleri Tanımı.....	22
2.3.2. SOR'lerin Fizyolojik Rolü.....	23

2.3.3.SOR'lerin İnsan Hastalıklarının	
Patogenezisindeki Rolü.....	24
2.3.4. Oksidatif Stres.....	25
2.3.5. Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu.....	27
2.4. SOR'un Etkileri İnceleyen Çalışmalar.....	29
2.4.1. SOR'un Düz Kasa Olan Etkileri.....	29
2.4.2. SOR'un ve Asetilkolinin	
Salıverilmesi Arasındaki İlişkileri.....	30
2.5. Araştırmada Kullanılan Maddelerin Özellikleri.....	32
2.5.1. Pirogallol.....	32
2.5.2. Allopurinol.....	32
2.5.3. Mannitol.....	33
2.5.4. Deferoksamin.....	33
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. Mide Fundus Dokusunun Hazırlanması.....	34
3.2. Deney Protokolü.....	35
3.2.1. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde	
Nikotinin Etkisi.....	36

3.2.2. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına Pirogallol'un Etkisi.....	37
3.2.3. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına Allopurinol'un Etkisi.....	37
3.2.4. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına Mannitol'un Etkisi.....	38
3.2.5. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına Deferoksamin'in Etkisi.....	38
3.3. Deneylerde Kullanılan Besleyici Solüsyon ve İlaçlar.....	39
3.4. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz.....	39
IV. BULGULAR.....	40
4.1. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Tetrodotoksin'in Etkisi.....	40
4.2. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Atropinin Etkisi.....	40
4.3. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Neostigminin Etkisi.....	41
4.4. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına	

Heksametonyum'un Etkisi.....	41
4.5. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde	
Nikotinin Etkisi.....	42
4.6. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde	
Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına	
Pirogallol'un Etkisi.....	44
4.7. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde	
Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına	
Allopurinol'un Etkisi.....	45
4.8. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde	
Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına	
Mannitol'un Etkisi.....	47
4.9. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde	
Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına	
Deferoksamin'in Etkisi.....	49
V. TARTIŞMA.....	50
VI. SONUÇ.....	65
VII. ÖZET.....	67
VIII. SUMMARY.....	69
IX. KAYNAKLAR.....	71
X. TEŞEKKÜR.....	89
XI. ÖZGEÇMİŞ.....	90
XII Deney Hayvanları Etik Kurul Kararı.....	92

Şekil ve Tablo Listesi:

Şekil 1. Ca⁺⁺'un artışı ile serbest oksijen radikallerinin oluşumu arasında karşılıklı etkileşim modeli.

Şekil 2. Heteromerik α 4- β 2 nöronal nikotirik reseptör ve homomerik α 7 nöronal nikotirik reseptör alt-üniteleri. Ak α alt birimlerine bağlanır.

Şekil 3. Nöronal nikotirik reseptörlerin alt-ünitelerin transmembran topolojisi.

Şekil 4. Myenterik motornöronlarda yerleşen presinaptik nikotirik reseptörlerin gastrointestinal motilitenin regülasyonunda rolü.

Şekil 5. Presinaptik sinir sonlanmasının yapısal görüntüsü.

Şekil 6. Nikotinin moleküler yapısı.

Şekil 7. Oksidatif stres.

Şekil 8. Tavşan izole mide fundusunda EAU'nın oluşturduğu kasılma cevapları üzerinde Tetrodotoksin'in (M, 10⁻⁶ M)'in etkisi.

Şekil 9. Tavşan mide fundusu düz kasında EAU'nın oluşturduğu kasılma cevabı üzerinde Nikotinin (10⁻⁴ M) etkisi.

Şekil 10. Tavşan izole mide fundusunda EAU'nın oluşturduğu kasılma cevapları üzerinde Nikotinin 10⁻⁴ M konsantrasyonunun kontraksiyonları arttırıcı etkisi. (*p<0.05)(10⁻⁴ M, n=46).

Şekil 11. Tavşan mide fundusu düz kasında EAU'nın oluşturduğu kasılma cevaplarında Nikotinin (10⁻⁴ M) oluşturduğu arttırıcı cevap üzerinde

Pirogallol (10^{-4} M) etkisi ($p > 0.05$, $n=5$). Kontrol olarak gösterilen grup, EAU'nın oluşturduğu dengeye erişmiş kontraksiyondur.

Şekil 12. Tavşan mide fundusu düz kasında EAU'nın oluşturduğu kasılma cevaplarında Nikotinin (10^{-4} M) oluşturduğu arttırıcı cevap üzerinde Allopurinolun (10^{-6} , 10^{-5} M) etkisi ($p>0.05$, $n=8$, $n=9$). Kontrol olarak gösterilen grup, EAU'nın oluşturduğu dengeye erişmiş kontraksiyondur.

Şekil 13. Tavşan mide fundusu düz kasında EAU'nın oluşturduğu kasılma cevaplarında Nikotinin (10^{-4} M) oluşturduğu arttırıcı cevap üzerinde Mannitol (5×10^{-3} M) etkisi ($*p < 0.05$, $n=5$). Kontrol olarak gösterilen grup, EAU'nın oluşturduğu dengeye erişmiş kontraksiyondur.

Şekil 14. Tavşan mide fundusu düz kasında EAU'nın oluşturduğu kasılma cevabı üzerinde Mannitolun (10^{-4} M) etkisi ($p > 0.05$, $n=6$).

Şekil 15. Tavşan mide fundusu düz kasında EAU'nın oluşturduğu kasılma cevaplarında Nikotinin (10^{-4} M) oluşturduğu arttırıcı cevap üzerinde Deferoksaminin (10^{-4} M) etkisi ($p > 0.05$, $n=7$).

Şekil 16. Eksitator Motornöronlar.

Tablo 1. Neostigmin'in EAU'ya Bağlı Kasıma Cevapları Üzerindeki Arttırıcı Etkisi.

Semboller, Kısaltmalar

dk	Dakika
EAU	Elektriksel Alan Uarısı
g	Gram
Hz	Hertz
V	Volt
M	Molar
ml	Mililitre
ms	Milisaniye
Ak	Asetilkolin
TTX	Tetrodotoksin
ESS	Enterik sinir sistemi
SOR	Serbest Oksijen Radikaller

I. GİRİŞ

Tütün kullanımı veya sigara içimi insanlar arasında yaygın ve uzun süredir var olan bir alışkanlıktır. 70'li yıllardan beri sigara içimi yüksek mortalite ve morbiditesi nedeniyle önemli bir sağlık problemi olarak değerlendirilmektedir ¹. 1512 yılında Portekiz'e getirilen tütün bitkisinin öğütülerek enfiye şeklinde migren baş ağrılarında kullanımı, 1559 yılına kadar Avrupa'ya yayılmadan bu ülkede sınırlı kalmıştır. 1560 yılında tütün bitkisi Jean Nicot isimli bir kişi tarafından kraliyet ailesine düğün hediyesi olarak Paris'e götürülmesinin ardından, 1570 yılında bu bitki için Nicotiana Tabacum ismi kullanılmaya başlanmıştır. Sigara kullanımının bağımlılık oluşturması üzerine odaklanan çalışmalar sonucunda, Nikotinin ($C_{10}H_{14}N_2$) tütündeki bağımlılık potansiyeli taşıyan madde ve temel psikoaktif maddenin bir alkaloidi olduğu kabul edilmektedir. B vitamini ya da niasin olarak bilinen Nikotinik asitten türemekte olan Nikotin 1828'de izole edilmiş, ve 1904 yılında da laboratuvarında sentez edilmiştir. Sigara tüketimi 19. yüzyılın ikinci yarısında J. Bonzak tarafından sigaraların sarması için üretilen makinaya patentini aldıktan sonra geniş ölçüde başlamış ² ve dramatik bir şekilde artmıştır. Günümüzde yaklaşık bir milyar erkek ve yarım milyar kadın sigara içmektedir ve her yıl 30 milyon civarında insan sigara içmeye başlamaktadır. Sigara 4700 tanımlanmış bileşeniyle kompleks bir karışımdır. Sigaranın toksik bileşenlerinden en önemlisi Nikotindir ³. Piridin ve pirolidin halkarından oluşan Nikotinin ⁴ bağımlılık oluşturmasından dolayı farmakolojik etkilerinin araştırılması hala

ilgi çekmektedir. Nikotin sadece insektisid ya da deneylerde kullanılmasına ya da ilaç olarak pratikte kullanılmamasına rağmen santral sinir sistemine olan etkisi bakımından tıpta yaygın araştırılan maddelerden biridir. Fakat, Nikotinin santral ve periferik sinir sistemlerine olan etkisi tam olarak açıklanmamıştır. İnsan hayatını tehdit eden sigaranın, hücre üzerinde farmakolojik, mutajenik, kanserojenik, toksik ve inflamatuvar etkileri vardır^{2, 5, 6, 7, 8, 9}. Ancak, aynı zamanda, Nikotinin tıpta yeterince bilinmeyen yararlı etkisine de dikkat etmek gerekmektedir. Klinik deneyimler ve laboratuvar çalışmaları bellek, dikkat ve bilişsel fonksiyonlar gibi karmaşık beyin işlevlerinde nöronal nikotinik reseptörlerinin yer aldığını göstermişlerdir. Böylece, son bilgiler şizofreni hastalarının otopsisinde nöronal nikotinik reseptörlerinin değişikliğinin bulunmasının, sigara içmenin ve şizofrenin negatif semptomları ile pozitif korelasyonunun olduğunu göstermiştir. Parkinson hastalığının patogenezinde nigrostriatal yollardaki nöronal nikotinik reseptörler aracılığıyla dopamin salıveren dopaminerjik nöronların az olması da bulunmaktadır. Clementi ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada sigara içenlerde Parkinson hastalığı oluşma riskinin azaldığını göstermişlerdir¹⁰. Alzheimer Hastalığında ise Nikotinin nöroprotektif etkisinde antioksidan olarak işlev görmesinin katkısı olabileceği ileri sürülmüştür¹¹. Sonuç olarak, nöronal nikotinik reseptörleri içeren hastalık listesinin sonu olmadığına göre, Nikotin bu süreçlerdeki önemini korumaktadır¹⁰. Bu yüzden, nöronal nikotinik reseptörleri santral

sinir sisteminde yaygın olarak incelenmektedir, fakat periferik sinir sisteminde bahsi geçen reseptörler bu kadar araştırılmamıştır.

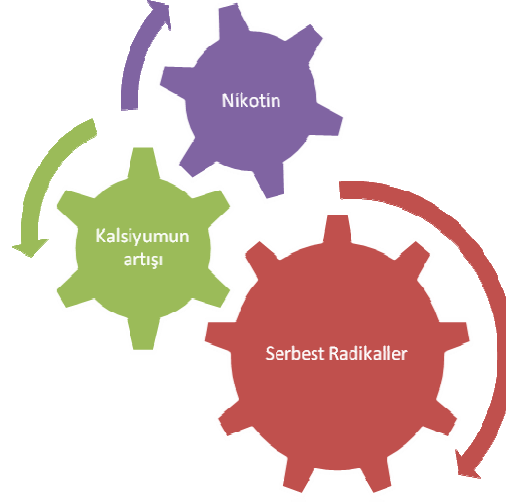
Nikotin yararlı etkisini nasıl gösterebilmektedir? Nörokimyasal ve farmakolojik yöntemlerle yapılan çalışmalarda, akson terminallerinde nöronal nikotinic reseptörlerinin presinaptik yerleşimli olduğu ¹² ve periferik ve santral sinir sisteminde nörotransmitter salıverilmesini modüle ettiği gösterilmiştir ¹³. Nikotinin nöronal nikotinic reseptörleri etkileyerek dopamin, norepinefrin, serotonin gibi nörotransmitterlerin salıverilmesini arttırdığı bilinmektedir ^{13, 14, 15, 16}. Ayrıca Nikotinin asetilkolin salıverilmesini de artırdığı çalışmalar mevcuttur ^{17, 18}. Böylece ortaya çıkan asetilkolinin vücudun birçok fonksiyonunu regüle ettiği bilinmektedir. Örneğin, enterik sinir sisteminde (ESS) yer alan myenterik plexus'taki asetilkolin, nöronal nikotinic reseptörleri etkileyen ana eksitatör nörotransmitter olarak bilinmektedir. Ayrıca, enterik sinir sisteminde asetilkolin'in nöronal nikotinic reseptörleri etkileyerek eksitatör nörotransmisyonunda (fEPSP) predominant rolü olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir ^{19, 20}. İn vivo çalışmalarda gastrointestinal motilitenin nöronal nikotinic reseptör antagonistleri tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir, bu bulgular gastrointestinal motor fonksiyonun kontrolünde nöronal nikotinic reseptörlerin santral rolü olduğunu göstermiştir. Birçok çalışmada nöronal nikotinic reseptörlerinin myenterik eksitatör motor sinir uçlarında veya gangliyonlarda yerleştiğini ve onların stimülasyonları sonrasında Ak

saliverilmesine, saliverilen Ak' ninde muskarinik reseptörleri etkileyerek düz kasın kasılmasına neden olduğu gösterilmiştir^{17, 18, 21, 22}. Nikotinin, nöronal nikotinik reseptörlerden bu nörotransmitterin saliverilmesinde rolü olduğu gösterilmiş, fakat bu etkinin altında yatan mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır²².

Üstelik, Nikotinin serbest oksijen radikallerinin oksidasyonunun değişik kısımlarını etkileyerek serbest oksijen radikallerinin (SOR) seviyesini artıran veya azaltan dualistik (çift) etkiye sahip olduğu hakkında çalışmalar mevcuttur⁴. Sigaranın antioksidan sistemi etkileyerek dokularda yapısal hasar meydana getirdiği birçok çalışmada gösterilmiştir²³. Baskaran ve ark. sigara kullanımının karaciğer, akciğer ve böbrek dokusunda lipid peroksidasyonuna neden olduğunu ve bu organlarda oluşan serbest oksijen radikallerinin zararlı etkisine karşı antioksidan enzimlerin seviyesinin yükseldiğini saptamışlardır²⁴. Nikotinin toksisitesinin oksidatif stres ve reaktif oksijen radikallerinin oluşmasıyla bağlantılı olduğu²⁶, özellikle Nikotinin 2.5 mg/kg dozunda serbest radikallerin oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir²⁷. Buna karşılık Nikotin beynin mitokondrial solunum zincirinin kompleks 1 ile etkileşimi sonucunda SOR'un oluşumunu azalttığı ve nöroprotektif etkiye sahip olduğu bilinmektedir^{4, 28}. Vurgulanması gereken nokta, sadece Nikotinin SOR'la ilgisi olmadığı ve bu konuda asetilkolinin kendisinin de SOR'ları oluşturduğuna dair çalışmalar olduğu gözlenmiş, Oldenburg O.

ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da atropin'in asetilkolin ile oluşan SOR üretimini azalttığı saptanmıştır²⁹.

Ayrıca, Nikotin ve serbest oksijen radikalleri arasındaki etkileşimin araştırılması için intraselüler süreçlere de başvurulmuştur. Nikotin ile nöronal nikotinic reseptörlerin uyarılması sonucu, sinir sonlanmalarında kalsiyum girişinin arttığı bulunmuştur²². Kalsiyumun belirgin bir şekilde artması SOR'un oluşması, enerjinin oluşma bozukluğu, bazı hidrolitik enzimlerin aktivasyonu gibi değişik yıkım (indirme) süreçlerini başlatabilmektedir³⁰. İntraselüler kalsiyumun artması fosfolipaz A₂ aktivitesini uyararak araşidonik asidin seviyesinin artmasından dolayı serbest oksijen radikallerinin oluşumunun artmasına da sebep olmaktadır^{31, 32}. Bunun dışında, kalsiyum konsantrasyonunun artmasının intraselüler sinyal ve organellerin fonksiyonlarını engelleyerek serbest oksijen radikallerin fazla oluşumunun esas sebebi olduğu gösterilmektedir⁵⁸. Dolayısıyla, Nikotinin nöronal nikotinic reseptörleri uyarması sonucunda kalsiyumun hücre içine girişi SOR'un oluşumuna sebep olabilmektedir (Şekil 1). Bu bilgiler ışığında, intraselüler Ca²⁺'un artışı ile serbest oksijen radikallerinin oluşumu arasında karşılıklı etkileşim olduğu varsayımıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır^{33, 34}.



Şekil 1. Ca^{2+} 'un artışı ile serbest oksijen radikallerinin oluşumu arasında karşılıklı etkileşim modeli.

Bu bilgilere dayanarak, Nikotinin nöronal nikotinic reseptörler aracılığı ile sinir sonlanmalarında oluşturduğu kalsiyum artışı ve buna bağlı geçici nörojenik kasılmalar üzerindeki arttırıcı etkisine ;

1) Süperoksit anyon vericisi olan Pirogallol kullanılarak oksidan sistemin katkısının araştırılması,

2) Allopürinol, Mannitol ve Deferoksamin kullanılarak antioksidan sistemin katkısının araştırılması amaçlanmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

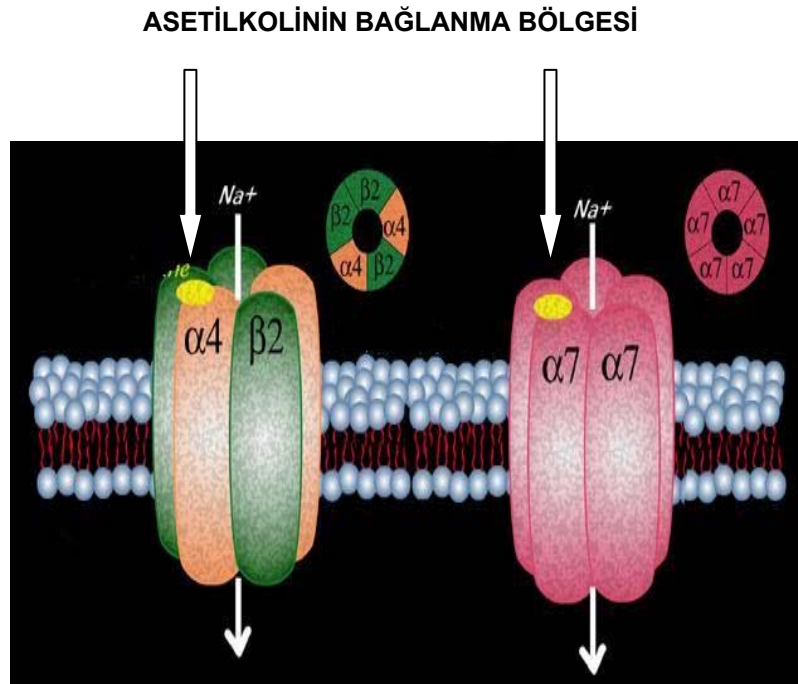
2.1. Kolinerjik Sistem ve Nöronal Nikotinik Reseptörler:

Kolinerjik nöronların, santral ve periferik sinir sistemlerinde geniş dağılımı bulunmaktadır. Kolinerjik sistem sempatik ve parasempatik sistemin birinci sıra nöronlarından ve parasempatik sistemin ikinci sıra nöronlarından oluşur. Bu nöronların gangliyonlarında veya nöroefektör kavşaklarında bulunan akson uçlarından salıverilen ve sinaptik aşırımdan sorumlu olan nörotransmitter asetilkolindir. Asetilkolin, kolin asetiltransferaz enzimi tarafından kolinin asetilasyonu sonucunda sentezlenen, ve iki tip (Muskarinik, Nikotinik) reseptör üzerinde agonist etkiler aracılığıyla nöronal aktiviteyi modüle eden nörotransmitterdir. Nöronal nikotinik reseptörler, Ak ve Ak'e yardımcı olan allosterik modülatörler tarafından regüle edilebilmektedir. Nöronal nikotinik reseptörler dopamin, γ -aminobutirik asid (GABA), glutamat ve norepinefrini salıvermekte ve dikkat, öğrenme, hafıza güçlendirme, duyuşsal algılama, lokomotor aktiviteyi kontrol etme, ağrı algılama ve vücut sıcaklığını kontrol etme gibi fonksiyonları regüle etmektedir.

2.1.1. Nikotinik reseptörlerin moleküler yapısı.

Nöronal nikotinik reseptörleri, mono ve divalent katyonlar için selektif olan pentamerik ligand kapılı iyon kanallarıdır. Bugünkü bilgilere göre, vertebralarda 17 alt-üniteler klonlanmıştır. Örneğin, $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , ϵ ve δ , nöromusküler kavşaktaki aşırıma aracılık eden ve kas dokuda bulunan

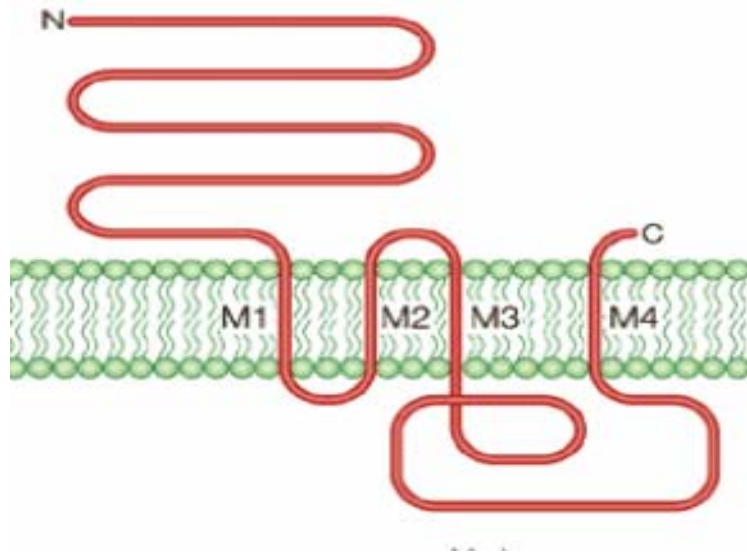
nikotink reseptörler. Nöronal nikotink reseptörleri ise $\alpha 2$ - $\alpha 10$, $\beta 2$ - $\beta 4$ alt-üniteleri içermektedir ³⁵. Fakat, $\alpha 8$ alt-ünitesi sadece civcivlerde bulunduğu gösterilmiştir. Üç α altünitesinin ($\alpha 2$, $\alpha 3$ ve $\alpha 4$) β altünitesiyle ($\beta 2$ veya $\beta 4$) kombinasyonda fonksiyonel, heteromerik reseptörlerini oluşturduğu gösterilmiştir. Üç diğer α altünitesi ($\alpha 7$, $\alpha 8$ ve $\alpha 9$) fonksiyonel, homomerik reseptörleri oluşturmaktadır ¹³. Alt-ünitelerin kompozisyonu reseptörlerin ligand spesifikliğini, ligand affinitesini, katyon geçirgenliğini ve kanal kinetiğini belirlemektedir. Örneğin, α -homomerler ve α -heteromerler yüksek Ca^{2+} geçirgenliğine sahiptir ³⁶.



Şekil 2. Heteromerik $\alpha 4$ - $\beta 2$ nöronal nikotink reseptör ve homomerik $\alpha 7$ nöronal nikotink reseptör alt-üniteleri. Ak α alt birimlerine bağlanır.

Şekil 2’de, homomerik ve heteromerik, nöronal nikotinik reseptörlerinin santral kanalının etrafında çevrelenmiş alt-ünitelerinden oluşan bir pentamer olduğu gösterilmektedir. Homo-oligomerik reseptörlerde iki bitişik alt-ünite arasında yerleşen 5 benzer asetilkolin bağlanma bölgesi bulunmakta. Hetero-oligomerik reseptörler iki α ve üç β alt-üniteden oluşmakta ve α , β alt-üniteler arasında yerleşen iki bağlanma bölgesi içermektedir¹⁰.

Şekil 3’te, ekstraselüler amino terminal segmenti, üç hidrofobik transmembranal segmenti (M1-M3), büyük intraselüler spiral ve dördüncü (M4) hidrofobik segmentinden oluşan nöronal nikotinik reseptörlerin alt-ünitelerinin transmembran topolojisi gösterilmektedir.



Şekil 3. Nöronal nikotinik reseptörlerin alt-ünitelerinin transmembran topolojisi.

2.1.2. Nöronal nikotik reseptörlerin patofizyolojideki Rolü.

Nöronal nikotik reseptörler nöronal ve non-nöronal sistemi içeren pek çok patolojik durum ile ilişkilendirilmektedir:

- Tourette Sendromunda Nikotinin sakız ya da transdermal bant olarak uygulaması tik ve diğer motor bozukluklarını anlamlı olarak azaltmakta, fakat bu zamana kadar bu sendromda nöronal nikotik reseptörlerin etkisi olup olmadığı açıklanmamıştır.
- Otizmde parietal korteks ve cerebellum'da $\alpha 4 \beta 2$ nöronal nikotik reseptörlerin azalması ve cerebellumda $\alpha 7$ 'nin artması saptanmıştır.
- Şizofreninin negatif semptomları ve sigara içimi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Sigaranın iyi bilinen ağır bedensel hastalık oluşturucu risklerine rağmen şizofreni hastalığı olan bireylerde sigarayı bırakmanın daha zor olduğu bilinmektedir. Çoğu araştırmacı bu direncin altında yatan önemli nedenlerden biri, Nikotin alımının şizofreni hastalarına sağladığı genel olumlu nöropsikolojik etkiler, yani "kendini tedavi arayışı", olabileceği görüşünde birleşmektedir. Bu bilgiler şizofreni hastalığı olanlarda sigara kullanımını azaltmaya yardımcı olabileceği gibi şizofreni hastalığının tedavisinde de yeni seçeneklerin gelişimini sağlayabilir ¹.

- Ağrı. Nikotinin analjezik aktivitesinin olması hakkındaki ilk yorumlar 1932 yılına aittir. Daha sonra, $\alpha 4\beta 2$ agonistlerinin ağrının modülasyonunda rolü olduğu saptanmıştır³⁷.

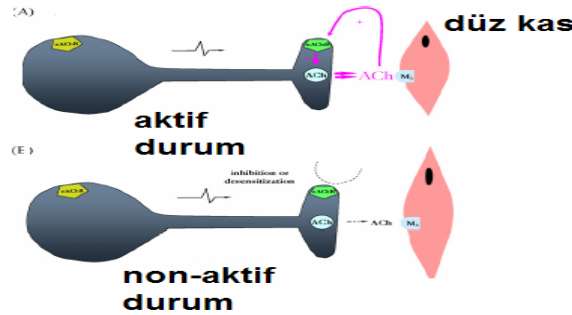
- Parkinson Hastalığı. Substantia nigra'nın zona compacta bölgesindeki dopaminerjik nöronların progressif dejenerasyonu Parkinson hastalığının oluşmasında rol oynar. Aynı zamanda, Parkinson hastalığı bu bölgede yüksek-affiniteli Nikotinin bağlanma sitelerin ve striatum'da nöronal nikotinik reseptörlerin kaybı ile bağlantılıdır. Parkinson hastalığını inceleyen hayvan modellerinden elde edilen deneylerin sonuçlarına göre, bu dejenerasyon Nikotinin uygulanmasıyla önlendiği gösterilmiştir.

- Alzheimer hastalığı: Bazal ön beyin bölgesindeki kolinerjik sistemin zayıflığı Alzheimer hastalarının (AH) beyin nörodejenerasyonunun en önemli sebeplerinden biridir, ve bunun kognitif bozuklukların oluşturulmasında temel rolü aldığı düşünülmektedir. Neokorteks, amygdala ve hippokampus'a yaygın giden Meynert nukleus basalis'inde kolinerjik nöronların geniş kaybı bulunmaktadır. Kortikal kolin asetiltransferazın azalan aktivitesi Alzheimer hastalarında kognitif bozuklukla ve Senil plak miktarıyla bağlantılı olmaktadır. Postmortem biopsi araştırmaları, AH'nda bazal önbeyin kolinerjik nöronların progresif kaybı cerebral kortikal nöronlarındaki nikotinik reseptörlerin ($\alpha 4\beta 2$) artan kaybı ile bağlantılı olduğunu göstermektedir^{38, 39}.

Bu yüzden, nöronal nikotinik reseptörler santral sinir sisteminde yaygın olarak incelenmektedir, fakat periferik sinir sisteminde bahsi geçen reseptörler bu kadar araştırılmamıştır. Aşağıda periferideki nöronal nikotinik reseptörler üzerinde yapılan çalışmalar ele alınacaktır.

2.1.3. Periferik nöronal nikotinik reseptörler.

Bildiğimiz gibi mide-bağırsak kanalının tonusu ve motilitesi ile salgılama ve absorpsiyon fonksiyonları enterik sinir sistemi tarafından düzenlenir. Literatürde enterik sinir sisteminde (ESS) yer alan myenterik pleksus'taki asetilkolin (Ak), nöronal nikotinik reseptörlerini etkileyen ana eksitatör nörotransmitter olarak bilinmektedir (Şekil 4). İn vivo çalışmalarda gastrointestinal motilite nöronal nikotinik reseptör antagonistleri tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu bulgular gastrointestinal motor fonksiyonunun kontrolünde nöronal nikotinik reseptörlerin santral rolü olduğunu göstermektedir.

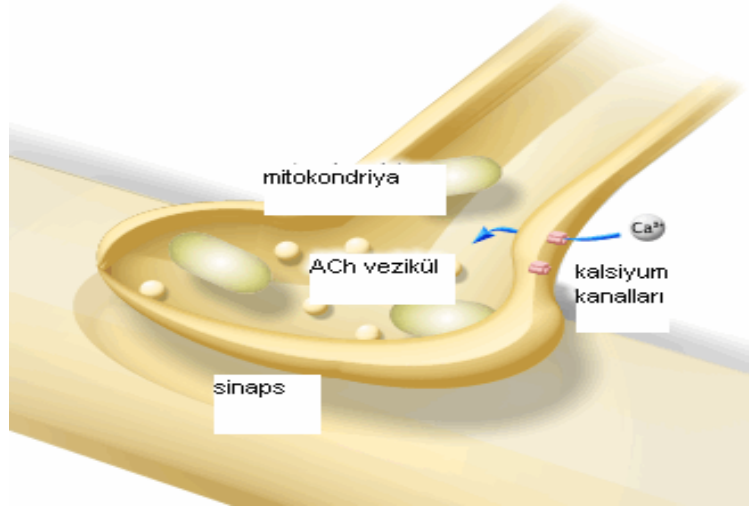


Şekil 4. Myenterik motonöronlarda yerleşen presinaptik nöronal nikotinik reseptörlerin gastrointestinal motilitenin regülasyonunda rolü.

Nöronal nikotinik reseptörler enterik sinir sisteminde önemli rolü oynadığı yukarıda bahsedilmiştir. Böylece, myenterik nöronların somatodendritik bölgelerinde yerleşen nöronal nikotinik reseptörler kolinerjik nöronların ve Auerbach pleksusun motornöronları arasında eksitator transmisyonuna aracılık etmektedir.

2.1.4. Nöronal nikotinik reseptörlerin Kalsiyum Geçirgenliği.

Presinaptik nöronal nikotinik reseptörleri nörotransmitterin saliverilmesini ⁴⁰, presinaptik terminallerde intraselüler serbest Ca^{2+} 'un konsantrasyonunun artırılmasıyla modüle etmektedir (Şekil 5). Nöronal nikotinik reseptörlerinin stimülasyonu, Ca^{2+} 'a bağımlı süreçler aracılığıyla sinaptik plastisite oluşmasını da sağlayabilmektedir ³⁵. Kalsiyumun influxu 2 mekanizmayla yerine getirilmektedir. Örneğin, nöronal nikotinik reseptörlerin stimülasyonu sonucunda ligand kapılı iyon kanalları ve/veya voltaja bağımlı kanallar aracılıklarıyla ⁴¹. Konfokal Mikroskopu ve kalsiyum indikatörü Oregon Green 488BAPTA-1 dekstran kullanılarak yapılan çalışmalarda da Nikotinin sinir sonlanmalarındaki kalsiyum konsantrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir ²². Anılan çalışmada, sinir sonlanmalarında Nikotinin kalsiyumu arttırıcı etkisi aksiyon potansiyelinin uyarılmasına bağımlı ve kalsiyum artışından bağımsız olan tetrodotoksinin kullanılmasıyla belirlenmiştir.



Şekil 5. Presinaptik sinir sonlanmasının yapısal görüntüsü.

Böylece, Nikotinin Ca^{2+} üzerinde olan etkileri intraselüler depolardan kalsiyumun saliverilmesini düzenleyen ryanodin ve kafein tarafından önlenmiştir ²². Bu sonuçlar Nikotinin nöronal nikotinic reseptörlerini etkilemek suretiyle sinir sonlanmalarında kalsiyumun saliverilmesi üzerinde arttırıcı etki oluşturduğunu göstermektedir ⁴².

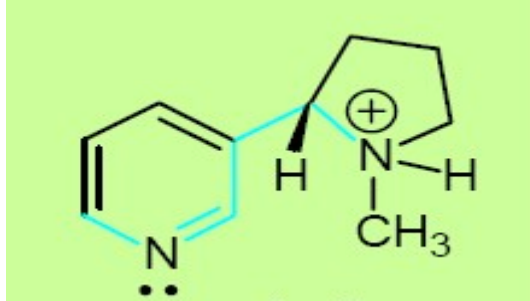
2.1.5. Nöronal nikotinic reseptörlerin agonistleri ve antagonistleri.

Birçok çalışmalarda ^{14, 15, 16} mevcut nöronal nikotinic reseptörlerin agonist ve antagonistlerin göreceli etkinliği ve gücü incelenmiş ve nöronal nikotinic reseptörlerin alt tipleri belirlenmiştir. Nöronal nikotinic reseptörler için tanımlanan bazı agonistler: Nikotin, sitizin, 1-dimetil-4-fenilpiperazinyum (DMPP), lobelin, epibatidin ($\alpha 4\beta 2$ nöronal nikotinic reseptör agonisti) ve anatoksin- α ($\alpha 4\beta 2$ nöronal nikotinic

reseptör parsiyel agonisti), 3-bromositizindir. Nöronal nikotinik reseptörler için tanımlanan bazı antagonistler ise: dihidro- β -eritroidin (göreceli selektif $\alpha 4\beta 2$ nikotinik reseptörlerin antagonistidir), mekamilamin (göreceli $\alpha 3\beta 4$ nikotinik reseptörlerin antagonistidir), α -bungarotoksin veya α -konotoksin ($\alpha 7$ nöronal nikotinik reseptörlerin antagonistleri).

Aşağıda, ele alınan Nikotin genelde literatürde agonist olarak geçmektedir. Fakat, bazı çalışmalarda Nikotinin antagonist olduğu iddia edilmektedir ⁴¹, ayrıca, bazı sınıflandırmalara göre, gangliyon blokör niteliği taşıdığı bilinmektedir ⁴³.

2.2. Nikotin



Şekil 6. Nikotin moleküler yapısı.

Nikotin 162.23 kDa moleküler ağırlığına sahiptir ve açık kimyasal ismi 3-(1-Metil-2-pirolidinil) piridin'dir (Şekil 6) . Çok düşük konsantrasyonda santral sinir sisteminin hafif bir uyarıcısı olan Nikotin saf formuyla yüksek derecede zehirleyicidir ve insektisid olarak kullanılmaktadır. Kanda düşük mikromolar ya da yüksek nanomolar Nikotin konsantrasyonu bağımlılık için yeterlidir ve bu düzeyler sigara içimi ile kolaylıkla sağlanabilmektedir. Sigara içimi ile alınan Nikotin 7 saniyede beyin dokusuna ulaşır ve 15-20 saniyede tüm vücuda dağılır ¹.

Bazı çalışmalarda Nikotin plazma konsantrasyonu enterik sinir sistemindeki presinaptik nöronal nikotinik reseptörleri aktive etmek için yeterli olduğu gösterilmekte ⁴⁴. Buna göre, sigara bırakma hastalarının %17'de dışkıının oluşumunu azaltmakta ve hastaların %9'de ise şiddetli konstipasyona neden olmaktadır. Bu fenomen şöyle açıklanmakta; myenterik terminallerde yerleşen nöronal nikotinik reseptörleri sigara kullanımı sırasında ekzojen Nikotin tarafından sürekli olarak stimüle

edilmektedir. Bundan dolayı, sigara bırakılmasıyla Nikotinin eksikliği kolinerjik transmisyonun yetersizliğini getirmekte ve gastrointestinal motilitenin azalmasına neden olmaktadır ⁴⁴. Böylece, nöronal nikotinic reseptörler ve özellikle Nikotin gastrointestinal motilitenin regülasyonunda büyük katkılar sağlamaktadır.

Nikotin nörotransmitter Ak'ni taklit ettiği bilinmektedir ⁴⁵. Aynı zamanda, Nikotin nöronal nikotinic reseptörlerin α -alt-ünitelerinin asetilkolin bağlanma bölgelerine bağlanmak suretiyle nöronal nikotinic reseptörleri stimüle ederek asetilkolin salıverilmesini fasilite etmektedir. Nikotin yukarıda bahsedilen reseptörleri etkileyerek asetilkolini dışında, glutamat, dopamin, norepinefrin, serotonin ve γ -aminobutirik asid gibi nörotransmitterleri fasilite etmektedir. Böylece, Nikotin öğrenme, hafıza ve kognitif fonksiyonlarında iştirak ettiği çeşitli insan ve hayvan deney modelleri bulgularına dayanmaktadır ^{25, 46}. Reseptörlerin nörotransmitterlerin salıverilmesini modüle etme fikri yaklaşık olarak 35 yıllık bir tarihi kapsamaktadır. Esas olarak "presinaptik" terimi nörotransmitterlerin, ko-transmitterlerin ve otakoidlerin salıverilebilme özelliği için konmaktadır ⁴⁴.

Nikotinin literatürde genellikle zararlı etkileri yaygın olarak açıklanmaktadır. Buna rağmen, Nikotinin yararlı etkilerini de gösteren birçok çalışma mevcuttur ^{1,38,39}. Bu bağlamda aşağıda Nikotinin rolü ve

özellikle zararlı ve yararlı etkileri belirlenmeye çalışılacaktır. İlk önce, sigara içmenin zarar verme özelliği ve bağımlılık etkileri Nikotinden kaynaklanmaktadır ^{47, 48}. Örneğin, Nikotin sinir sonlanmalarında inflamatuvar nöropeptidlerin (taşikininleri, calcitonin gene-related peptide v.s.) salıverilmesini modüle edebildiği ve nörojenik inflamatuvar reaksiyonları başlatabildiği bilinmektedir ⁴⁹. Nikotinin yüksek dozu hafızayı fasilite etmesine rağmen, SOR konsantrasyonunun artmasına, DNA'nın bozulmasına ve lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır. Aynı zamanda, Nikotin vitamin C ve vitamin E gibi antioksidanların plazma konsantrasyonlarını değiştirebilmekte, ve bu yolla serbest radikal mekanizmaları çalıştırılarak kalp damar hastalıkları başta olmak üzere pek çok sağlık sorununa predispozisyonu oluşturmaktadır. Ayrıca, Nikotinin akciğer kanserinin gelişiminde katkıda bulunduğu inkar edilemez bir gerçektir. Bazı çalışmalarda, kanserin oluşması Nikotinin sebep olduğu genomun oksidatif hasarından kaynaklandığı ileri sürülmektedir ⁵⁰. Adluri Ram Sudheer ve arkadaşları yapılan araştırmalarda Nikotin toksisitesini antioksidanlar tarafından azaltılabileceğini ve bu antioksidanların gelecekte kanserin oluşumunun önleyici ajanları olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir ⁵¹. Bunun yanında, antioksidan niteliğini taşıyan Vitamin E, SOD ve katalazın Nikotinin zararlı etkilerinden koruduğu bilinmektedir ⁵².

Nikotinin toksik etkisini gösteren çalışmaların sınırlı olduğu görünmekte, ve Nikotinin genotoksik olmadığı ve DNA'nın değişikliği

Nikotin tarafından yapılmadığı hakkında araştırmalar mevcuttur⁵³. Ayrıca, bazı alışmalar Nikotinin nöroprotektif etkisinden dolayı çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda kullanabildiğini göstermektedir^{1, 25}. Hüresel membrandaki reseptörlerin agonistle oluşturulan aşırı stimölasyonu zamanla bu reseptör sayısını azaltmakta ve antagonistlerin uygulaması ise ters etkiler yaptığı görölmektedir. Fakat, deney hayvanları üzerinde yapılan Nikotin uygulanma araştırmalarına göre Nikotinin kronik uygulanması yukarıda bahsedilen genel gereğın dışına çıkmakta ve reseptörlerin azaltılmasının aksine Nikotin nöronal nikotidik reseptörlerin sayısını arttırmaktadır⁴¹. Bu yüzden nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde nöronal nikotidik reseptörleri hedeflenmenin amacı bu reseptörlerin fonksiyonlarının kaybını karşılamak ve ayrıca, nigrostriatal nöronların yaşlanma sürecini geciktirmek ve ekzositotoksik hücre ölüminden korumaktadır. Bu nedenle Nikotin ilaç hedefi olarak kabul edilmekte ve bu durum in vivo ve in vitro yaygın farmakolojik araştırmaların yapılmasını teşvik etmektedir. İzlenilebileceğı gibi Nikotin; hem eser elementler, antioksidanlar ve dokular arasındaki ilişki hem de serbest radikal sisteminin elemanlarını etkilemektedir^{54, 55}.

Nikotinin elektriksel alan uygulaması (EAU) üzerinde oluşan asetilkolinin salıverilmesinde SOR'un herhangi bir katkısının olup olmadığını öğrenmek için Nikotin SOR'u nasıl bir şekilde oluşturabileceğı mekanizmaların açıklanmasına başvurmamız gerekmektedir. Nikotin

aracılığıyla SOR'un oluşum mekanizmasının açıklanması birçok çalışmacılar tarafından incelenmektedir. Böylece, genel olarak Nikotin CYP2A6 aracılığıyla 5-hydroxilasyona uğratılmakta ve kotinin ve formaldehidi içeren metabolitleri oluşturmak üzere SOR'un oluşumunu sağlanmaktadır ⁵¹. Diğer bir açıklanmaya göre, Nikotin polimorfonükleer lökositlere kemotaktik olduğu, adı geçen lökositlerin aktif C5a komplemen'e karşı cevap vermesini arttırarak SOR oluşturduğu gösterilmektedir ⁵¹. Nikotin, aynı zamanda, nuclear transkripsyonun kappa B faktörünün aktivasyonu sağlayarak SOR'u arttırmaktadır ⁵³. Feokromositoma PC 12 hücresinde yapılan bir çalışmada ise Nikotin ift etki oluşturmakta: Nikotin yüksek dozda nörotoksik etkiye sahip olup oksidatif stress'i stimüle edebilmektedir; düşük dozda ise antioksidan olmakta ve nöroprotektif etkiye önemli derecede katkıda bulunmaktadır. Ancak, bu dualistik özelliklere sahip olan Nikotinin serbest oksijen radikalleri oluşturması veya onun antioksidan olması mekanizmaları tam olarak açıklanmamıştır. Yüksek dozda Nikotin mitokondriyal solunum zincirini bozarak, süperoksit anyonun ve hidrojen peroksid'in oluşmalarını arttırmaktadır. Serbest oksijen radikallerin oluşması Nikotidik enantiomerlerin intrasellüler metabolizması sırasında sitokrom P-450 enziminin aktivitesini de arttırabilmektedir ⁴.

Bu özelliklere karşı, Nikotinin düşük dozda çeşitli mekanizmalarla koruyucu etkisi vardır. Örnek olarak şu mekanizmalar gösterilmektedir ⁴:

i) Fe^{2+} mu ayırmakta ve Fenton reaksiyonunu inhibe etmektedir;

ii) mitokondriyal elektron transportunda kompleks 1'i inhibe ederek süperoksit anyonunun oluşmasını azaltmaktadır;

iii) serbest oksijen radikal koruyucusu olarak etkilemekte, suksinat dehidrojenaz'ın aktivitesini artırmakta, mitokondriyal elektron transport zincirini stimüle etmekte veya geri çevirmektedir.

Nikotinin SOR'un oluşumunu çift yönlü olarak tam açıklanmayan bir çok mekanizma ile etkilemektedir.

2.3. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

2.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri Tanımı.

Dünyada canlı organizmaların (anaerob mikroorganizmalar hariç) oksijensiz yaşanması imkansızdır. Çünkü oksijen bütün metabolik süreçlerinin önemli parçalarının birisidir. Fakat, bu süreçler esnasında, oksijenin dokularda belirli koşullarda kısmen indirgenmesi sonucu oluşan, çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli oksijen metabolitlerin oluşması bulunmaktadır⁵⁶. Normalde, hücrede tüketilen oksijenin % 80'den fazlası sitokrom oksidaz enzimi tarafından azaltılmakta ve bunun sonucunda serbest oksijen radikalleri oluşmamaktadır. Geriye kalan %10- %20 oksijeni diğer oksidasyon reaksiyonlarına katılmakta ve bu reaksiyonlar sonucunda SOR'leri oluşmaktadır⁵⁷.

Bugün bilinen kimyasal ajanların geniş spektrumunu kapsayan Serbest Oksijen Radikalleri: Hidrojen peroksidi (H_2O_2), Süperoksit anyonu O_2^- , Hidroksil radikalini (OH^-), Singlet oksijeni ve onların ikincil metabolitleri (peroksinitril ($ONOO^-$), aldehidler, ketonlar ve lipid peroksidasyonu ürünleri)⁵⁸. Bunlar - dış orbit'te eşlenmemiş elektron çifti içeren molekül, atom veya atomlar grubudur⁵⁷. SOR'ları ayırt eden iki belirti bulunmaktadır: 1) güçlü oksidan olması ve 2) manyetik niteliği olmasıdır. Bundan dolayı, aktivitesi yüksek olan SOR'leri "ne zaman olursa olsun, kime olursa olsun" bağlanmaya hazır olmaktadır. SOR'a ait olan diğer bir özellik, - hücre içi Ca^{2+} seviyelerini artırmaktır. Endotel bağımsız

izole rat aortasında yapılan bir çalışmada SOR intraselüler Ca^{2+} seviyesini modüle ederek hücrel fonksiyonları etkileyebileceği gösterilmiştir ⁵⁹. SOR, ekstraselüler kalsiyum girişini artırarak intraselüler Ca^{2+} konsantrasyonunu artırmaktadır ve antioksidanlar Ca^{2+} konsantrasyon değişimini ortadan kaldırmaktadır. Ca^{2+} kanal blokörün uygulanması ekzojen SOR ile oluşan kasılmayı önemli ölçüde azaltmaktadır ³³. Benzer şekilde, Auch-Schwelk ve arkadaşları, rat aorta halkalarında SOR'un kontraksiyonunun ekstraselüler kalsiyuma bağımlı olduğunu göstermişlerdir ³⁴.

2.3.2. SOR'lerin Fizyolojik Rolü.

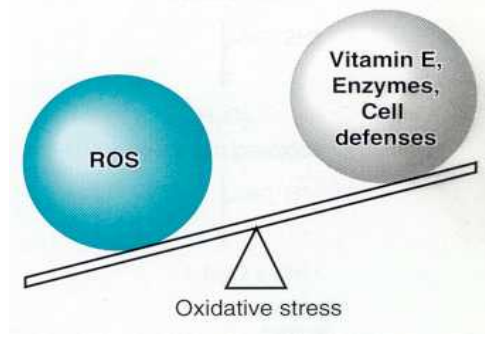
Oksijen radikallerinin reaktif ve toksik potansiyel olmasına rağmen bu radikaller düşük konsantrasyonlarda çoğu biyokimyasal reaksiyonlara katılmakta ve hücrenin normal metabolitleri olarak bilinmektedir. İlk olarak, oksijen radikalleri lipid peroksidasyonunun indüklenmesini sağlayarak fosfolipidlerin yenilenmesinde ve membran permeabilitesinin regülasyonunda gerekli olmaktadır. Serbest oksijen radikaller çeşitli reaksiyonların ve lipid peroksidasyonunun ürünleri olan progesteron, steroid, ve tiroid hormonların, tromboksan A_2 , lökotrienlerin sentezinde katılmaktadır ⁵⁸. Oksijen metabolitleri bağışıklık sisteminde regülatör ve efektör olarak rol almaktadır. İntraselüler SOR'un üretilmesi, G-proteine bağımlı veya bağımsız reseptör aktivasyonunu içeren birçok ekstraselüler uyarılarını başlatabilmektedir. Bu nedenle SOR sadece

hasar yapan bir ajan değil, aynı zamanda fizyolojik fonksiyonların mediatörleri de olabilmektedir ⁶⁰.

2.3.3. SOR'lerin İnsan Hastalıklarının Patogenezisindeki Rolü.

“Yaşlanma teorisi”nin esasında serbest oksijen radikallerinin birikimi rol oynamakta ve yaşlanmanın meydana gelmesine neden olmaktadır ⁵⁸. Bu teori çerçevesinde değişik hastalıklar açıklanmaktadır. Birçok makalede SOR - aracılı hücresele hasarlar çeşitli hastalıklarda rol oynadığı gösterilmiştir ^{61, 62}. Bu hasarlar arasında myokardial iskemi-reperfüzyon hasarı, inflamasyon, kardiyak hipertrofi, arteroskleroz ve diabetik endotelyal disfonksiyon bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, SOR sinyal transdüksiyon kaskadları, transkripsiyon faktörün aktivasyonu, gen ekspresyonu, kas kontraksiyonu, hücre büyümesi, kemotaksis ve apoptozis'i stimüle ettiği gösterilmiştir. Söz konusu radikaller sitoplazmik membranın ve hücre-içi organel membranın lipidlerinin peroksidasyonuna, membran permeabilitesinin artmasına, enzimlerinin ve sitostrüktürel proteinlerin sulfidril gruplarının oksidlenmesine ve çapraz-bağlanmasına, enzimlerin inaktivasyonuna, proteolitik enzimlerin aktivasyonuna, DNA yapısının bozulmasına ve mutasyona neden olurlar ⁶³.

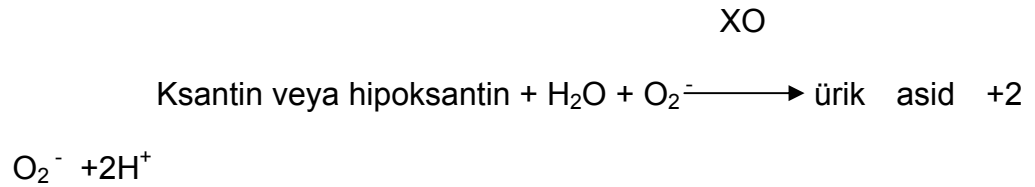
2.3.4. Oksidatif Stres.



Şekil 7. Oksidatif stres.

Bugünlerde yaygın kullanılan “oksidatif stres” ifadesi ilk olarak Sie tarafından önerilmiştir. Sie'nin bu ifadenin orijinal açıklaması: “Pro-oksidan - Antioksidan dengesinin ilkin lehine bozulması potansiyel hasara yönlendirmektedir” (Şekil 7) ⁶⁴. Patolojik olaylar sırasında (örn. iskemi/reperfüzyonu olayı) hücrede aşırı miktarda serbest oksijen radikallerinin oluşması “oksidatif stress” olarak tanımlanır. Tavşan ince bağırsağı üzerinde yapılan araştırmada deneysel iskemi / reperfüzyon sırasında oluşturulan hasardaki antioksidanların etkisini değerlendirilmiştir ⁶⁵. İskemin hücrede zamanla hasara neden olduğu ve bunun sonucunda hücrenin ölümüne sebep olduğu bilinmektedir. Diğer yandan, reperfüzyon sonucunda mantığa aykırı gibi görünen bir iskemi / reperfüzyon tablosu gözlemlenmektedir. Bu tabloda hasarın daha da ilerlemesi söz konusudur. Bu fenomenin mekanizması tam olarak açıklanmamıştır. Son zamanlarda

yapılan çalışmalar, bu hasarın ilerlemesine serbest oksijen radikallerin ortaya çıkmasının ve ksantin oksidazın reaktif radikallerinin aktive olmasının sebep olduğunu göstermektedir. Normal koşullarda ksantin dehidrojenaz enzimi hipoksantin ürik aside metabolize edilmesini katalize etmektedir. İskemi ksantin dehidrojenazı ksantin oksidaza dönüştürür. Bunun sonucunda, hipoksantin ürik aside dönüşmesi sırasında ksantin oksidaz (XO) süperoksit anyonunun saliverilmesine neden olur¹⁰². Bu tanımlanan olaylar aşağıdaki denklemle gösterilebilir:



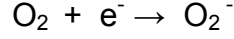
Usamah S. Kayyali ve arkadaşlar, yaptığı çalışmada sigara etkisiyle sinaptozomda, akciğer ve mide'de XO aktive edildiği ve ayrıca, XO inhibitörü olan Allopurinol'un uygulanması sonucunda mide mukoza'sının apoptozisi inhibe edildiği ve mide ülser'in iyileştiği ve kan akımının düzeltildiğini gözlemlemişlerdir⁶⁶. Neticede araştırmacıların belirlemelerine göre, XO inhibitörünün kullanılması sigara-bağlantılı hastalıkların önlenmesinde potansiyel yarar sağlamaktadır. Sigara içmenin SOR'un seviyesini arttırdığı ve onun süpürücülerini (scavenger) azalttığı görünmektedir. Bunun sonucunda pro-oxidan ve antioxidant arasındaki dinamik dengenin değişmesiyle oksidatif stresin oluşması kadın sigara tiryakilerinin follikulojenesis'inin bozulmasına neden olmaktadır⁶⁷.

2.3.5. Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu.

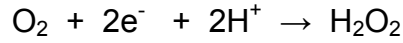
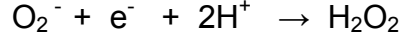
Serbest oksijen radikaller fizyolojik veya patolojik olaylar sonucunda meydana gelmektedir. Sözkonusu radikalleri oluşturan fizyolojik olaylar mitokondriyel ve mikrozomal elektron transport zincirleri ile bağlantılı olmaktadır. SOR'un oluşumunun ana kaynağı oksijeni indirgeyici özelliğe sahip olan enzimatik sistemlerdir. XIX. yüzyılın sonunda Warburg, oksidaz olarak bilinen enzimlerin bileşimi geçiş metalleri içerdiğini gösterdi ⁵⁸. Bütün oksijen indirgeyici enzimlerin aktif merkezi bir veya birkaç geçiş metal atomları (Fe, Cu, Zn, Mo, Mn, Co) ihtiva ettiği bilinmektedir. Bugünlerde oksidazların 220'den fazla olduğu gösterilmiştir ⁵⁸. Bunlar: ksantin oksidaz, siklooksijenaz, lipoksijenaz, monoamin oksidaz, triptamin dioksijenazlar v.s. Patolojik olaylar (beyin hipoksisi gibi) sırasında intraselüler kalsiyumun artışı değişik enzimatik yolları aktive edebilmesiyle serbest oksijen radikallerin oluşmasında rol almaktadır. Bu yollar arasında fosfolipaz A2 aktivasyonu, siklooksijenaz ve lipoksijenaz'la araşidonik asid'in metabolizması, proteaz tarafından ksantin dehidrojenazdan ksantin oksidaz'ın oluşması, nitrik oksid sentetaz'ın aktivasyonu ve peroksinitrit'in(ONO-) oluşmasıdır ⁵⁷.

Serbest oksijen radikallerin oluşumu aşağıda ele alınmaktadır.

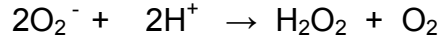
Süperoksit radikali hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu (O_2^-) meydana gelir:



Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır:

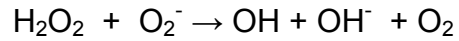


Ancak, biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur:



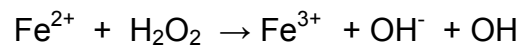
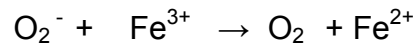
Hidrojen peroksit süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.

Haber-Weiss reaksiyonu:



Fenton reaksiyonunda ise önce üç değerlikli demir (Fe^{3+}) süperoksit tarafından iki değerlikli demire (Fe^{2+}) indirgenir, sonra bu iki değerlikli demir kullanılarak hidrojen peroksitten OH ve OH^- üretilir⁶⁸.

Fenton reaksiyonu:



Böylece, yukarıda ele alınan serbest radikallerinin oluşumunda Nikotin anahtar rolü oynadığını görünmektedir. Ayrıca, Nikotin çeşitli araçlarla SOR'un oluşumunda katkıda bulunmaktadır ve/veya indirekt olarak intraselüler kalsiyumun artışının sonucunda da serbest radikalleri oluşturmaktadır. Birçok çalışmada antioksidanların uygulanmasından sonra intraselüler kalsiyumun değişikliklerinin ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir ³³. SOR'un oluşması değişik yollarla sağlanabilmektedir. Mesela, Nikotin katkısıyla sağlanan presinaptik sonlanmalarında kalsiyumun artışı veya Nikotin aracılığıyla salıverilen asetilkolin SOR'un oluşmasına neden olmaktadır.

2.4. SOR'un Etkileri İnceleyen Çalışmalar

2.4.1. SOR'un Düz Kasa Olan Etkileri.

Birçok çalışmaya göre, çeşitli bileşiklerden veya sistemlerden oluşan SOR vasküler tonusun regülasyonuna katılabilmektedir. Örneğin, H₂O₂ bazı düz kas preparatlarında gevşemelere neden olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir ^{69, 70, 71}. Bu gevşemelerin endotel bağımlı ya da endotel bağımsız olduğu yönünde çalışmalar vardır ^{33, 72, 73, 74, 75}. H₂O₂'nin EDRF (endotel kaynaklı gevşetici faktör) oluşmasını veya salıverilmesini stimüle edebileceği ⁷⁶, endotel bağımlı EDRF aracılı gevşemeleri arttırdığı veya cGMP aktivasyonu ile gevşemeye neden olduğu gösterilmiştir ⁶⁹. Diğer yandan, H₂O₂'nin izole sıçan aort halkalarında kontraksiyon oluşturduğu görülmektedir ⁷⁷. H₂O₂, vasküler düz kas ve endotel

hücrelerinde hem protein kinaz C hem de tirozin kinazı aktive etmektedir. Bunun yanında, endotel bağımlı ve endotel bağımsız tavşan intrapulmoner bronşiollelerinde H_2O_2 , siklooksijenaz yolağı yoluyla araşidonik asit metabolizmasını stimüle etmekte ve konstriktör prostaglandinler olan $PGF_{2\alpha}$ ve TXA_2 sentezini artırmaktadır ⁷⁸. İzole tavşan trakeası düz kasında yapılan başka bir çalışmada ise H_2O_2 'nin gevşetici prostaglandinler PGE_2 ve PGI_2 oluşumunu stimüle ettiği görünmektedir. Bu bulgular kasılmanın veya gevşemenin epitelden salıverilen biyolojik aktif maddelerin aracılığıyla olabileceğı göstermektedir ⁷³. Dolayısıyla bu maddelerin etkisini bertaraf etmek için çalışmamızda mide düz kas preparatları epitelsiz araştırılmıştır.

2.4.2. SOR'un ve Asetilkolinin Salıverilmesi Arasındaki İlişkileri.

Nikotinin tarafından oluşturulan SOR'un sinaptik nörotransmisyonu etkisinin olup olmadığını inceleyen çalışmalar bilimsel literatürde çok az görünmektedir. Esas olarak bizim çalışmamızda Nikotinin asetilkolin salıverici etkisine ve bu etkiye serbest radikallerinin katkısının olup olmadığı üzerinde durulmaktadır. Bazı araştırmalarda görüldüğü gibi, asetilkolinin SOR'un oluşumunda rolü bulunmaktadır, böylece anılan çalışmada atropinin asetilkolin tarafından oluşturulan SOR üretimini azalttığı saptanmıştır ²⁹.

SOR'un ve asetilkolinin saliverilmesi arasındaki ilişki ile ilgili yapılan çalışmalarda oksidanların veya antioksidanların Ak'nin saliverilmesinde rolü araştırılmıştır. Bauer V. ve arkadaşların yaptığı araştırmada kedi bronşiyol düz kasında Pirogallol (10 ve 100 µmol/l konsantrasyonlarında) EAU tarafından oluşturulan bifazik kolinerjik kasılmayı etkilemediği görünmektedir ⁷⁹. Fakat, DEDTCA'nın (endojen süperoksit dismutazın inhibitörü) uygulanması bu kontraksiyonu uzun süreli olarak ortadan kaldırmaktadır. Bununla beraber, aynı çalışmada trakeal şeritte Pirogallol tek EAU ile oluşturulan eksitatör kavşak potansiyel (EJP-excitatory junction potential) amplitüdünü ortadan kaldırmakta, ve DEDTCA'nın uygulamasından sonra EJP amplitüdünde anlamlı artış meydana gelmektedir. Bu sonuçlara dayanarak Pirogallolun kolinerjik nörotransmisyonunu inhibe ettiği, hidrojen peroksidin ise arttırdığı gösterilmiştir ⁷⁹. Diğer yandan, süperoksit anyonunun Ak ile oluşan kontraktileti hidrojen peroksite göre, daha kuvvetli bir şekilde azalttığına dair yayınlar mevcuttur ⁷³. Ayrıca, O_2^- düz kasın Ak'e olan duyarlılığını da azaltabilmektedir.

H_2O_2 'nin ise sinaptik transmisyonunu modüle ettiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir ^{80, 75, 79}. Bu konuda H_2O_2 'nin serebral damarların sinir sonlanmalarından endojen asetilkolini salıverdiğine dair bir hipotez mevcuttur ⁷⁵. Buna göre, atropin (muskarinik reseptör antagonisti) H_2O_2 'nin oluşturduğu baziler arter gevşemesini azaltmakta, neostigmin (asetilkolinesteraz antagonisti) ise bu gevşemeyi anlamlı

olarak artırmaktadır. H_2O_2 , lipid-solübl özelliğine sahip olduğu için hücre membranlarını kolaylıkla geçebilmekte ve bu sayede intraselüller mekanizmalarını etkilemektedir. Böylece, H_2O_2 nöromusküler kavşağı etkileyerek Ak'nin saliverilmesini stimüle etmektedir. Hidrojen peroksit Ak'nin saliverilmesini modife ederek NO oluşturduğu görünmektedir ⁸¹. Tavşan intrapulmoner bronşiol düz kaslarında yapılan bir çalışmada endoteli olmayan preparatta hidrojen peroksit'in Ak'nin oluşturduğu kasılmayı azalttığı gösterilmiştir ⁷⁸.

2.5. Araştırmada Kullanılan Maddelerin Özellikleri

2.5.1. Pirogallol

Pirogallol - katehin bileşiği ve $O_2^{\cdot-}$ jeneratörüdür. Pirogallol biyolojik sistemlerde süperoksidin araştırılması için kullanılmaktadır ^{82, 83}.

2.5.2. Allopurinol

Allopurinol, Hitchings ve Elion tarafından ilk sentezlendiği yıllarda antineoplastik bir ajan olarak takdim edilmişken, sonraları aslında antimetabolit aktivitesinin olmadığı ancak ksantin oksidaz enziminin inhibitör bir substratı olduğu keşfedilmiştir. Allopurinol, merkaptopürinin, ksantin oksidaz tarafından inaktivasyonunu geciktirerek ürik asitin renal ekskresyonunu azaltır ve plazma seviyelerini düşürür. Bu özellikleriyle Allopurinol, Gut hastalığına bağlı primer hiperüriseminin ve hematolojik hastalıklar ve kemoterapötik ajan kullanımına bağlı gelişen sekonder

hiperürisemilerin tedavisinde kullanım alanı bulmuştur ⁸⁴. Bugünlerde Allopurinol antioksidan bir madde olarak nitelendirilmektedir.

2.5.3. Mannitol

Mannitol osmotik diüretik olmakla birlikte OH⁻ radikalini toplayıcı bir madde olduğu bilinmektedir ⁸⁵.

2.5.4. Deferoksamin

Deferoksamin (DFO) daha çok demir ve 3-değerlikli alüminyum iyonlarıyla kompleksler oluşturan bir maddedir; Kelat oluşturma özelliği nedeniyle, DFO plazma ya da hücrelerde bulunan serbest demiri olarak ferrioksamin (FO) kompleksi oluşturabilir. DFO dokuya bağlı alüminyum, alüminoksamin (AIO) kompleksi meydana getirerek bağlayabilir ve mobilize edebilir. Bu nedenle antioksidan özelliklere sahiptir.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Mide Fundus Dokusunun Hazırlanması

Deneylerde 3-4 aylık 2,5-3 kg. ağırlığında Albino erkek tavşanlar kullanıldı. Deneyler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarında yapıldı. Tavşanlar normal laboratuvar koşullarında taze yeşillikle beslendi. Bir gece önce aç bırakılan tavşanlar kulak veninden tiopental (30mg/kg, i.v.) ile anesteziye edildikten sonra karın orta hattan açıldı ve mideye ulaşıldı. Mide fundusu distal kısmından ayrılarak büyük kurvatür boyunca açılıp özefagus sfinkteri ile büyük kurvatur arasındaki bölge kesilerek vücut dışına çıkarıldı. Dışarı alınan doku, önceden 37°C'ye ısıtılmış ve %5 CO₂, %95 O₂ karışımı ile havalandırılan Krebs solüsyonu bulunan petrilere konuldu. Üzerindeki mukoza tabakası ayrılan mide fundusu, 0.2- 0.3 cm eninde. 1-1,5 cm boyunda longitudinal şeritler halinde kesilerek hazırlandı. Dokular organ askısı yardımıyla Krebs solüsyonu içeren 15 ml'lik organ banyosuna bir ucu organ askısına, bir ucu izometrik kasılmaları kayıt etmek için Grass FT-03 (Quincy, Mass.,A.B.D.) force-displacement transdüsüne bağlı olacak şekilde yerleştirildi. İzometrik kas kontraksiyonları transdüsörler aracılığı ile Grass Poligraf (Model 7 E, Quincy, Mass.,A.B.D.) 'a kaydedildi.

Elektriksel Alan Uyarısı (EAU) için dokular iki platin elektrod arasına vertikal olarak ve elektrodalara değmeyecek şekilde asıldı. Elektriksel stimulation için Grass S48 (Quincy, Mass.,A.B.D.) stimulatör

kullanıldı. Dokulara deneylerin başlangıcında “1g” ön gerim uygulandı ve 15 dk da bir kez yıkanarak 1 saat dengelenmeye bırakıldı.

3.2. Deney Protokolu

Dengelenme periyodunun ardından yapılan ön deneylerde EAU için uygun parametreler belirlendi. Dokulara değişik frekans ve voltajlar altında EAU yapılarak kasılma cevapları elde edildi. Uygun parametreler 60 V , 8-32Hz., 1ms. olarak 120 saniyede bir 5 s süre ile uygulandı.

Deneylerin başlangıç aşamasında ayrı seri deneylerde tetrodotoksin'in (10^{-6} M) EAU ile elde edilen kasılma cevapları üzerine olan etkisine bakıldı. EAU bağlı uyarıların tetrodotoksin ile tamamen ortadan kalkması, Ak'nin salıverilmesinin sinirsel uyarıma bağlı olduğunu gösterdi.

Ayrı bir seri deneyde muskarinik reseptör antagonisti Atropin 'in 10^{-6} M dozda EAU kasılma cevaplarını ortadan kaldırdığı ve antikolinesteraz olan neostigmin (10^{-6} - 10^{-5} M)'in EAU kasılma cevaplarını artırdığı izlenmiş, bu veriler, gözlenen cevapların kolinerjik transmisyonla bağlı olduğunu göstermiştir.

Ayrı bir seri deneyde de nöronal nikotinic reseptör blokörü heksametyum'un (10^{-5} M) EAU'ya bağlı nörojenik kasılmalar üzerinde nikotinin oluşturduğu geçici cevap artışlarına olan etkisine bakıldı. Nikotinin oluşturduğu geçici cevap artışları heksametyum ile azaldı.

Etkisi araştırılan maddeler (oksidan ve antioksidanlar) EAU cevapları dengeye ulaştıktan sonra uygulanarak, Nikotin uygulamasından önce 20 dk. organ banyosuna ilave edilmiştir.

3.2.1. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Etkisi

Farklı seri deneylerde EAU ile oluşan kontraksiyonlar dengeye ulaştığında ortama Nikotin eklendi. Nikotine ait geçici kasılma cevapları elde edilmiş, EAU'nın dengeye eriştiği cevap kontrol cevabı olarak alınıp 100 kabul edildi ve Nikotinin oluşturduğu geçici nörojenik kasılmalar üzerindeki artışlar % artış olarak sunulmuştur. Nikotin verildikten sonra gözlenen artışlar yedi uyarıya bağlı olarak oluşan artışların ortalaması olarak % artış şeklinde sunuldu.

3.2.2. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına Pirogallol'un Etkisi:

EAU ile oluşan kontraksiyon platoya ulaştığında ortama Nikotin ($10^{-4}M$) eklendi ve Nikotine ait geçici kasılma cevapları elde edildi. Bu kontrol cevabını takiben , dokular 10 dk ara ile en az 4 kez yıkandıktan sonra EAU açıldı. Kontraksiyon platoya ulaştığında banyo ortamına Pirogallol ($10^{-4}M$) eklendi. 20 dk. inkubasyondan sonra Pirogallol varlığında EAU ile oluşan kontraksiyon platoya ulaştığında ortama Nikotin eklendi ve Nikotine ait kasılma cevapları tekrar edildi.

3.2.3. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına Allopurinol'un Etkisi:

EAU ile oluşan kontraksiyon platoya ulaştığında ortama Nikotin ($10^{-4}M$) eklendi ve Nikotine ait geçici kasılma cevapları elde edildi. Bu kontrol cevabını takiben, dokular 10 dk ara ile en az 4 kez yıkandıktan sonra, aynı preparatta Allopurinolun etkisini incelemek üzere banyo ortamına EAU cevaplarından 20 dk. önce Allopurinol (10^{-5} ve 10^{-6} M) eklendi. Daha sonra EAU ve Nikotin cevapları tekrarlandı.

3.2.4. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına Mannitol'un Etkisi:

EAU ile oluşan kontraksiyon platoya ulaştığında ortama Nikotin (10^{-4} M) eklendi ve Nikotine ait geçici kasılma cevapları elde edildi. Bu kontrol cevabını takiben , dokular 10 dk ara ile en az 4 kez yıkandıktan sonra, aynı preparatta Mannitol etkisini incelemek üzere banyo ortamına EAU cevaplarından 20 dk. önce Mannitol ($10^{-4} - 5 \times 10^{-3}$ M) eklendi. Daha sonra EAU ve Nikotin cevapları tekrarlandı.

3.2.5. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına Deferoksamin'in Etkisi:

EAU ile oluşan kontraksiyon platoya ulaştığında ortama Nikotin (10^{-4} M) eklendi ve Nikotine ait geçici kasılma cevapları elde edildi. Bu kontrol cevabını takiben , dokular 10 dk ara ile en az 4 kez yıkandıktan sonra, EAU cevapları tekrarlandı. Kontraksiyon platoya ulaştığında banyo ortamına Deferoksamin (10^{-4} M) eklendi. 20 dk. inkubasyondan sonra EAU ile oluşan kontraksiyon dengeye ulaştığında ortama Nikotin eklendi ve Nikotine ait kasılma cevapları tekrar edildi.

3.3. Deneyleerde Kullanılan Besleyici Solüsyon ve İlaçlar

Banyo solüsyonu olarak kullanılan Krebs çözeltilisinin bileşimi (mM), NaCl 118; KCl 4.7; NaHCO₃ 25; NaH₂PO₄-2H₂O 0.9; CaCl₂ - 2 H₂O 1.26; MgCl-6 H₂O 0.5; Glukoz monohidrat 11.

Nikotin, Heksametonyum, Atropin sülfat, Neostigmin metilsülfat, Allopurinol, Mannitol, Pirogallol, Deferoksamin, Sigma Chemical Co. (St.Louis MO)' dan alınmıştır. Kullanılan ilaçların stok çözeltileri distile suda çözümlenerek hazırlandı. Stok çözeltilerden dilüsyonlar günlük olarak hazırlanmıştır.

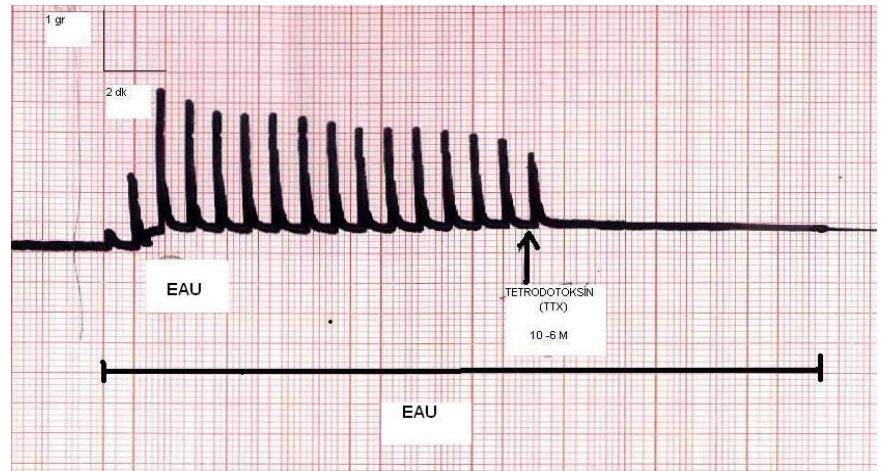
3.4. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz

Deney sonuçları metin içinde (n) sayıda deneyin aritmetik ortalaması \pm ortalamanın standart hatası olarak sunuldu. Nikotin verildikten sonra gözlenen artışlar yedi uyarıya bağlı olarak oluşan artışların ortalaması olarak (% artış şeklinde) sunuldu. Gruplar arası farkın anlamlılığı post-hoc "Dunn testi " ile araştırıldı. P<0.05 olması halinde fark anlamlı kabul edildi. Antagonist ve etkisi araştırılan maddelerin varlığında Nikotinin kasılma cevapları arasındaki farklar "Wilcoxon testi " uygulanarak değerlendirildi. P<0.05 olması halinde fark anlamlı kabul edildi.

IV. BULGULAR

4.1. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Tetrodotoksin'in Etkisi:

Deneylerin başlangıç aşamasında tavşan mide fundusu düz kas preparatlarında EAU ile elde edilen kasılma cevapları üzerinde tetrodotoksin (10^{-6} M)'in etkisine bakıldı (şekil 8). Tetrodotoksin EAU'sı cevaplarını ortadan kaldırdı.



Şekil 8. Tavşan izole mide fundusunda EAU'nın oluşturduğu kasılma cevapları üzerinde tetrodotoksin'in (10^{-6} M)'in etkisi.

4.2. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Atropinin Etkisi:

Ayrı bir seri deneyde tavşan mide fundusu düz kasına EAU uygulanması ile kasılma cevapları oluşturuldu. Bu cevaplar üzerine

muskarinik reseptör blokörü atropin (10^{-6} M) uygulandı. Atropin EAU kasılma cevaplarını ortadan kaldırdı.

4.3. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Neostigminin Etkisi:

Ayrı bir seri deneyde de bir antikolinesteraz olan neostigmin, (10^{-6} - 10^{-5} M) tavşan mide fundusu düz kasında EAU'nın oluşturduğu kasılma cevapları üzerine uygulandı. Cevaplarda konsantrasyon bağımlı olarak bir artış izlenmektedir (Tablo 1).

Tablo 1 : Neostigmin'in EAU'ya Bağlı Kasıma Cevapları Üzerindeki Arttırıcı Etkisi.

Konsantrasyon	10^{-6}M	3×10^{-6} M	10^{-5} M
% Artış	11,1±2,5	100±8,7	722,2±50,2

4.4. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına Heksametonyum'un Etkisi:

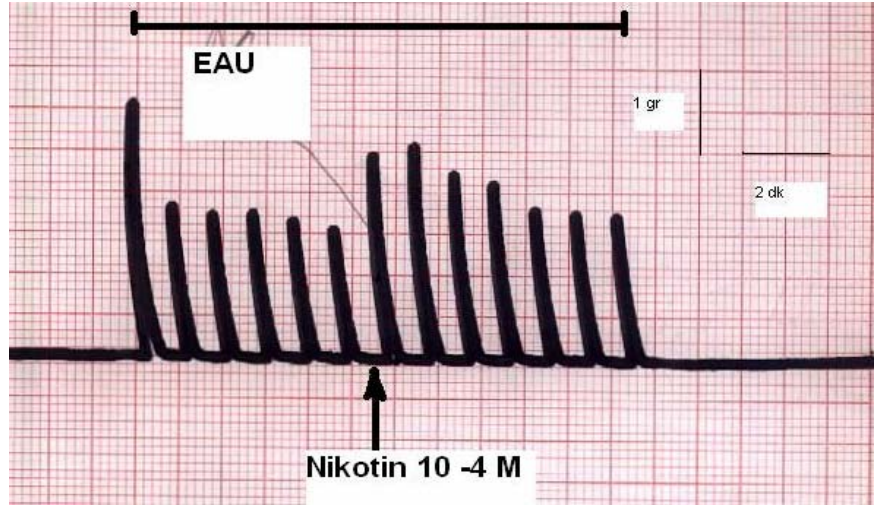
Ayrı bir seri deneyde de nöronal nikotinik reseptör blokörü heksametonyum'un (10^{-5} M) EAU'ya bağlı nörojenik kasılmalar üzerinde nikotinin oluşturduğu geçici cevap artışlarına olan etkisine bakıldı.

Nikotinin oluşturduğu geçici cevap artışları (% 158,32±12,62) heksametonyum ile % 75.73±15.17'ye azaldı.

4.5. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde

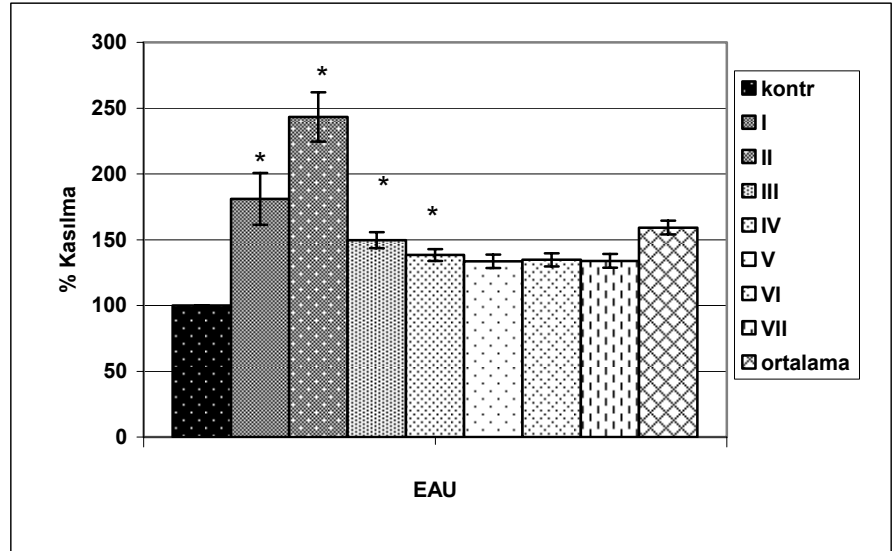
Nikotinin Etkisi:

Tavşan mide fundus düz kası preparatlarında EAU ile oluşan kontraksiyonlar platoya (dengeye) eriştikten sonra cevaplar üzerine Nikotin değişik konsantrasyonlarda uygulandı. Nikotin, konsantrasyona bağımlı olarak, bu gözlenen nörojenik kasılmaları geçici olarak arttırdı . Nikotine ait geçici kasılma cevaplarını daha iyi inceleyebilmek için deneylerin tümünde Nikotinin 10^{-4} M konsantrasyonu kullanıldı. Nikotin verildikten sonra gözlenen artışlar yedi uyarıya bağılı olarak oluşan artışların ortalaması olarak (% artış şeklinde) sunuldu. Her bir konsantrasyonun oluşturduğu toplam artışlar ile Nikotin uygulamasından önceki EAU kontrol cevapları karşılaştırıldı. Nikotinin 10^{-4} M konsantrasyonunda bir, iki, üç ve dördüncü uyarılarda izlenen geçici artışların ortalaması kontrol cevabına göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulundu (şekil 9, 10).



Şekil 9. Tavşan mide fundusu düz kasında EAU'nın oluşturduğu kasılma cevabı üzerinde Nikotinin (10^{-4} M) etkisi.

Nikotin 10^{-4} M

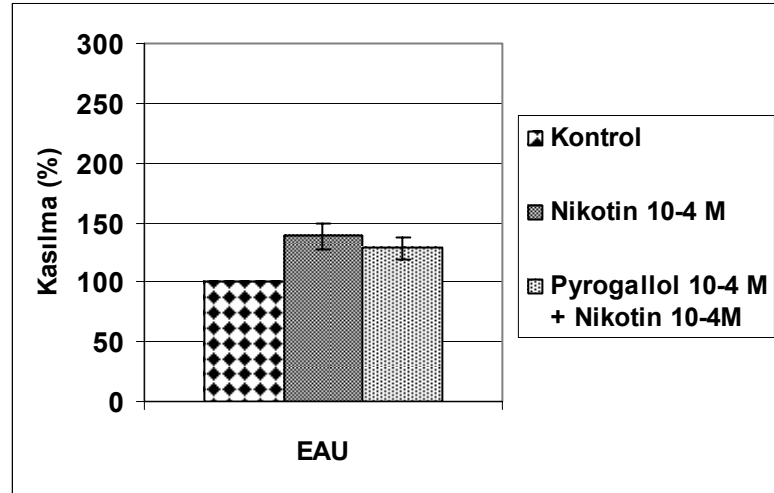


Şekil 10. Tavşan izole mide fundusunda EAU'nın oluşturduğu kasılma cevapları üzerinde Nikotinin 10^{-4} M konsantrasyonunun kontraksiyonları arttırıcı etkisi. (* $p < 0.05$)(10^{-4} M, n=46).

4.6. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına Pirogallol'un Etkisi:

EAU ile oluşan kontraksiyonlar dengeye erişince Nikotin uygulandı. Bu kontrol cevabını takiben dokular 10^{-4} M Pirogallol ile 20 dk. inkübe edildi. Bu deneylerde de Nikotinin 10^{-4} M konsantrasyonu kullanıldı. Pirogallol EAU' ya bağlı cevapları azaltmaktadır. Pirogallol uygulamasını takiben EAU cevapları alındı ve Nikotin uygulaması yapıldı (şekil 11). Pirogallol, Nikotin etkisi ile oluşan kasılma cevapları üzerinde kontrol cevaplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadı. ($p > 0.05$, $n=5$)

Pirogallol 10^{-4} M

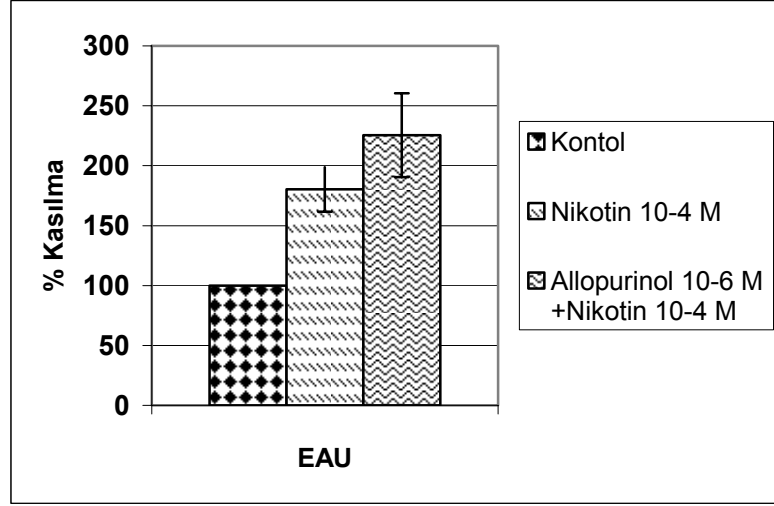


Şekil 11. Tavşan mide fundusu düz kasında EAU'nın oluşturduğu kasılma cevaplarında Nikotinin (10^{-4} M) oluşturduğu arttırıcı cevap üzerinde Pirogallol (10^{-4} M) etkisi ($p > 0.05$, $n=5$). Kontrol olarak gösterilen grup, EAU'nın oluşturduğu dengeye erişmiş kontraksiyondur.

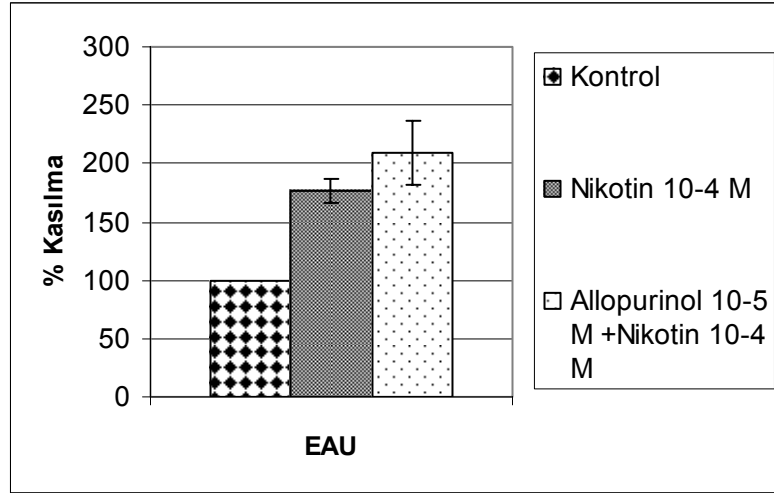
4.7. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına Allopurinol'un Etkisi:

Tavşan izole mide fundusunda EAU ile oluşan kontraksiyonlar dengeye erişince Nikotin uygulandı. Bu kontrol cevabını takiben dokular Allopurinol (10^{-6} , 10^{-5} M) ile 20 dk. inkübe edildi. Nikotinin 10^{-4} M konsantrasyonu kullanıldı. Allopurinol uygulamasını takiben EAU cevapları alındı ve Nikotin uygulaması yapıldı. Allopurinol 10^{-6} , 10^{-5} M Nikotin etkisi ile oluşan kasılma cevaplarını arttırdı (şekil 12), ancak kontrol cevaplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadı ($p>0.05$, $n=8$, $n=9$).

Allopurinol 10^{-6} M



Allopurinol 10^{-5} M

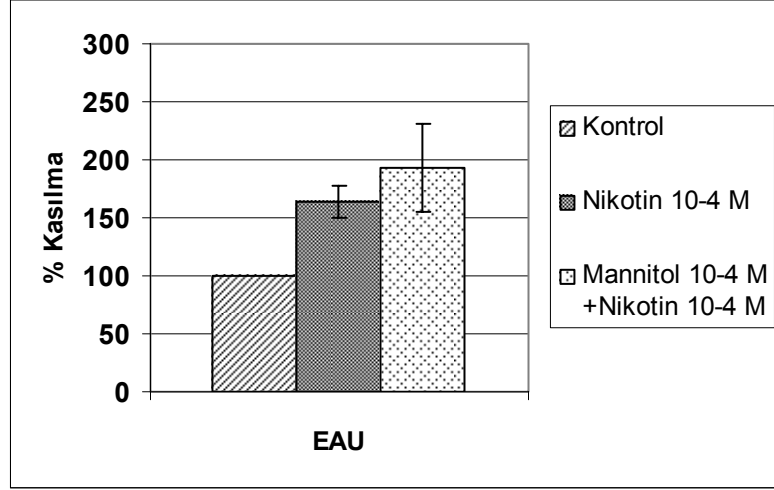


Şekil 12. Tavşan mide fundusu düz kasında EAU'nın oluşturduğu kasılma cevaplarında Nikotinin (10^{-4} M) oluşturduğu arttırıcı cevap üzerinde Allopurinolun (10^{-6} , 10^{-5} M) etkisi ($p>0.05$, $n=8$, $n=9$). Kontrol olarak gösterilen grup, EAU'nın oluşturduğu dengeye erişmiş kontraksiyondur.

4.8. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına Mannitol'un Etkisi:

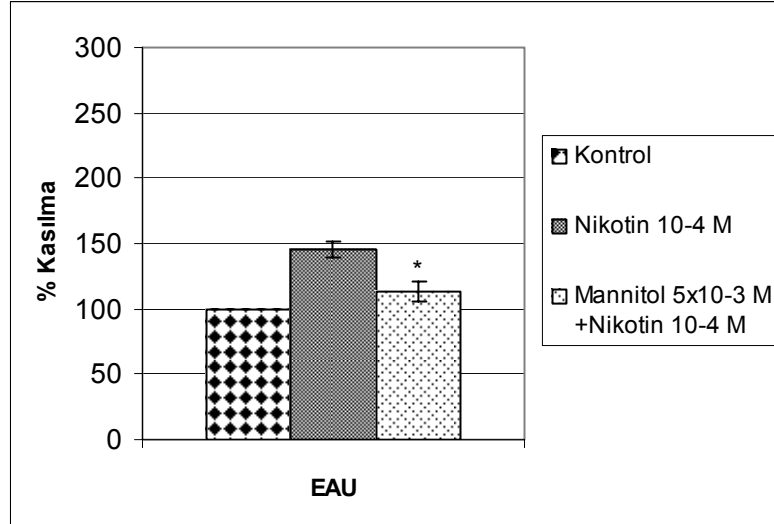
EAU ile oluşan kontraksiyonlar plato oluşturunca Nikotin uygulandı. Bu kontrol cevabını takiben dokular yıkandı ve EAU cevapları alındı. Kontraksiyonlar dengeye erişince 10^{-4} M - 5×10^{-3} M Mannitol ile 20 dk. inkübe edildi. Nikotinin 10^{-4} M konsantrasyonu kullanıldı. Mannitol uygulamasını takiben EAU cevapları alındı ve Nikotin uygulaması yapıldı. Mannitol 10^{-4} M konsantrasyonunda Nikotin etkisi ile oluşan geçici kasılma cevaplarını arttırdı, ancak kontrol cevaplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadı (şekil 13) ($p > 0.05$, $n=6$). Mannitol 5×10^{-3} M, yüksek konsantrasyonda ise Nikotin etkisi ile oluşan kontraksiyonları kontrol cevaplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde azalttı (şekil 14) ($*p < 0.05$, $n=5$).

Mannitol 10^{-4} M



Şekil 13. Tavşan mide fundusu düz kasında EAU'nın oluşturduğu kasılma cevabı üzerinde Mannitolun (10^{-4} M) etkisi (* $p > 0.05$, $n=6$).

Mannitol 5×10^{-3} M

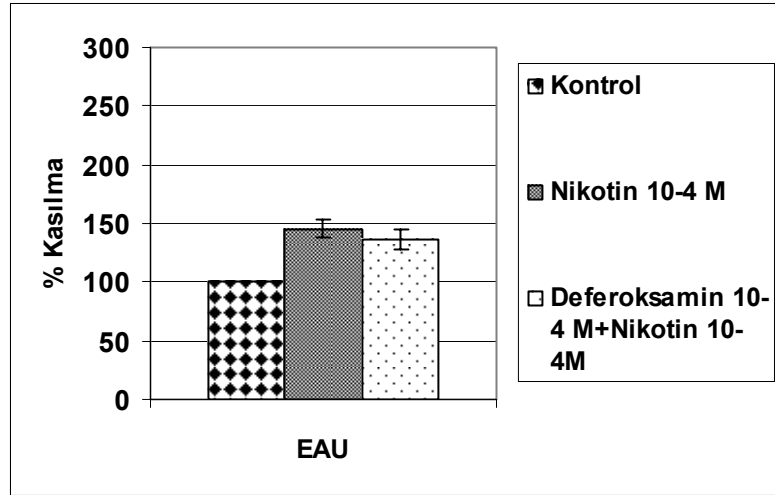


Şekil 14. Tavşan mide fundusu düz kasında EAU'nın oluşturduğu kasılma cevaplarında Nikotinin (10^{-4} M) oluşturduğu arttırıcı cevap üzerinde Mannitol (5×10^{-3} M) etkisi (* $p < 0.05$, $n=5$). Kontrol olarak gösterilen grup, EAU'nın oluşturduğu dengeye erişmiş kontraksiyondur.

4.9. EAU'na Bağlı Nörojenik Kasılmalar Üzerinde Nikotinin Oluşturduğu Geçici Cevap Artışlarına Deferoksamin'in Etkisi:

Kontrol cevabını takiben EAU cevapları tekrarlandı. Kontraksiyon dengeye ulaştığında banyo ortamına Deferoksamin 10^{-4} M eklendi. 20 dk. inkübasyondan sonra Nikotin cevapları tekrarlandı. . Nikotinin 10^{-4} M konsantrasyonu kullanıldı. Deferoksamin 10^{-4} M konsantrasyonunda Nikotin etkisi ile oluşan geçici kasılma cevaplarını azalttı, ancak kontrol cevaplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadı (Şekil 15) ($p > 0.05$, $n=6$).

Deferoksamin 10^{-4} M



Şekil 15. Tavşan mide fundusu düz kasında EAU'nın oluşturduğu kasılma cevaplarında Nikotinin (10^{-4} M) oluşturduğu arttırıcı cevap üzerinde Deferoksaminin (10^{-4} M) etkisi ($p > 0.05$, $n=7$).

V. TARTIŞMA:

Bu çalışma Nikotinin tavşan mide fundusunun düz kasında EAU'nın oluşturduğu nörojenik kasılmaları geçici olarak arttırıcı etkisinin olduğunu gösterdi. EAU'nın oluşturduğu kasılma cevapları tetrodotoksin tarafından ortadan kaldırıldı. Muskarinik reseptör blokörü olan atropin EAU'nın oluşturduğu kontraksiyonları inhibe etti. Antikolinesteraz olan neostigmin ise, bu kontraksiyonları arttırdı. Nikotinin EAU'nın oluşturduğu nörojenik kasılmaları geçici arttırıcı etkisi üzerinde Allopurinolün 10^{-5} M ve 10^{-6} M, Deferoksaminin 10^{-4} M ve Pirogallolün 10^{-4} M konsantrasyonlarında uygulanması kontrol cevaplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmamaktadırlar. Nikotinin EAU'nın oluşturduğu nörojenik kasılmaları geçici arttırıcı etkisi üzerinde Mannitolun 5×10^{-3} M yüksek konsantrasyonda uygulanması kontrol cevaplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azaltırken, Mannitolun 10^{-4} M konsantrasyonda uygulanması kontrol cevaplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmamaktadır.

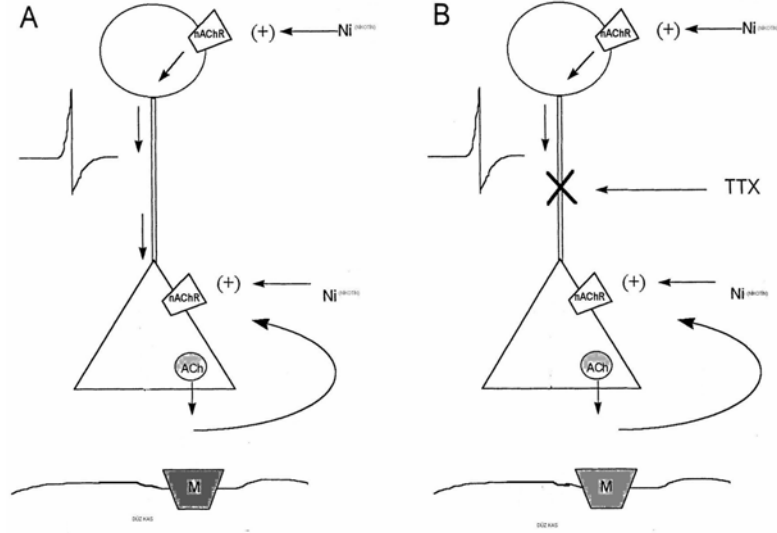
Bu tez çerçevesinde yapılan deneylerde EAU'nun oluşturduğu kontraksiyon cevapları üzerine atropin ve neostigmin uygulanmıştır. Atropinin uygulandığı dokuda kasılma cevapları tamamen ortadan kalkmaktadır ve neostigmin uygulandığı dokuda kasılma cevapları konsantrasyona bağımlı olarak artmaktadır. Bu sonuçlar gözlemlenen

cevapların kolinerjik sinirlerin aktivasyonuna bağlı olduğunu göstermektedir.

Bu alışmada Nikotinin n6ronal nikotidik resept6rleri etkilediği ve tavşan mide fundusu d6z kasında EAU'nın oluşturduğu n6rojenik kasılmaları geçici olarak arttırdığı g6r6nmektedir. Bu etkisini presinaptik reg6lasyon aracılığıyla yaptığını bildiren çalışmalar mevcuttur. Presinaptik reg6lasyon, transmitter saliverilmesinin inhibisyonu veya fasilitasyonu ile n6rotransmisyonu kontrol eden 6nemli mekanizmalardan biridir. Santral sinir sisteminde ve otonomik gangliyonlarda presinaptik n6ronal nikotidik resept6rlerin aktivasyonu n6rotransmitterlerin saliverilmesini fasilite ettiğine dair çalışmalar vardır ^{12, 13, 14, 16, 21}. Fakat, bu zamana kadar, n6ronal nikotidik resept6rlerinin myenterik n6ronların somatodendritik alanlarında yerleştiği ve sadece "hızlı" sinaptik transmisyonu katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bazı myenterik n6ronların motorn6ronları d6z kas tabakalarında sonlanmaktadır. Son yapılan çalışmalara g6re, myenterik pleksus olmayan preparatlarda n6ronal nikotidik resept6r-bağımlı mekanizma ile Nikotin d6z kas kontraksiyonuna neden olmaktadır. n6ronal nikotidik resept6rleri sadece somatodendritik b6lgede olsaydı, myenterik gangliyondan gelen motor aksonların ve onların varikozitelerinin izolasyonu sonrasında, n6ronal nikotidik resept6r aracılığıyla etki g6steren agonistin oluşturduğu kontraksiyonların ortadan kalkması gerekirdi. Ayrıca, sodyum kanal blok6r6 Tetrodotoksin'in (TTX) kullanılması, Nikotinin

nöronal nikotink reseptörleri aracılığıyla oluşturulduğu kontraksiyonları tamamen ortadan kaldırmadığı, ancak Elektriksel Alan Uyarısı(EAU)' na bağlı kontraksiyonları tamamen ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Şekil 16). Bu sonuçlar nöronal nikotink reseptörlerinin myenterik eksitatör motor sinir uçlarında veya gangliyonlarda yerleştiğini ve onların stimülasyonları sonrasında Ak saliverilmesine, saliverilen Ak' ninde muskarinik reseptörleri etkileyerek düz kasın kasılmasına neden olduğunu göstermektedir^{17, 18, 21}. Nikotinin gangliyonik nikotink reseptörlerinde bu nörotransmitterin saliverilmesinde rol olduğu gösterilmekte, fakat bu etkinin altında yatan mekanizmalar tam olarak açıklanamamaktadır²². Agangliyonik sıçan vas deferensinde yapılan bir çalışmada EAU'ya bağlı kontraksiyonun bretilium (adrenerjik nöron blokörü) tarafından etkilenmediği ve Nikotinin presinaptik nikotink reseptörleri etkileyerek Ak'nin saliverilmesini artırdığı gösterilmiştir¹⁷.

Bu çalışmada EAU'nun oluşturduğu kontraksiyonlar üzerine sodyum kanal blokörü olan TTX uygulandı. TTX'nin (10^{-6} M) konsantrasyonu EAU ile oluşan Ak'nin saliverilmesini ortadan kaldırdı. TTX'in EAU'ya bağlı uyarıları ortadan kaldırıcı etkisi, bu uyarıların sinirsel uyarıyla bağlantılı olduğunu göstermektedir.



Şekil 16. Eksitator Motornöronlar. Nikotin, somatodendritik bölgedeki ve sinir terminalindeki nöronal nikotinik reseptörlerini etkileyerek Ak'nin saliverilmesine neden olmaktadır. TTX varlığında Nikotin somatodendritik nöronal nikotinik reseptörleri etkileyebilmekte, fakat aksiyon potansiyeli somatodendritik alandan sinir sonlanmasına yayılamamaktadır. Nikotin sinir sonlanmalarındaki nöronal nikotinik reseptörleri etkileyerek kontraksiyon oluşturabilmektedir.

Nikotinin myenterik plexus'tan asetilkolinin saliverilmesine neden olduğu yukarıda bahsedilmiştir. Asetilkolinin presinaptik nikotinik reseptörleri etkileyerek motor terminallerinden asetilkolinin saliverilmesini arttırdığı ilk olarak Koelle tarafından gösterilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda Nikotinin düz kas şeritlerinde "geçici" asetilkolinin saliverilmesine neden olduğu gösterilmiştir. Bu saliverilmenin geçici olması nöronal nikotinik reseptörlerin desensitizasyonu ile açıklanmaktadır

⁸⁶. İzole fare vas deferensinde agangliyonik dokuda yapılan başka bir çalışmada Nikotin elektriksel alan uyarılmasına bağlı nörojenik kasılmaların gücünde “geçici” artışa neden olurken, aynı zamanda, eksitator kavşak potansiyelinin amplitüdünde ve spontan eksitator kavşak potansiyellerinin frekansında da artış sağlamaktadır ¹⁷. Ayrıca, bu çalışmada Nikotinin EAU’ya bağlı nörojenik kasılmaların gücünde “geçici” olarak neden olduğu artışın nöronal asetilkolin reseptör blokörü olan heksametonyum tarafından önlediği gösterilmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada Nikotinin oluşturduğu geçici kasılmaların heksametonyum tarafından % 50’ye yakın bir oranda anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ⁸⁷. Heksametoniyum bir gangliyon blokör olduğuna göre, ve kasılmanın % 50’ye yakın azalması nedeniyle Nikotinin asetilkolini salıvermesini parasempatetik gangliyonik ve presinaptik nöronal nikotinik reseptörleri aracılığıyla yaptığı düşünülmektedir.

Son yıllarda elde edilen veriler Nikotinin ülseratif kolit, Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı gibi birçok hastalıkta yararlı etkisini gösterebileceğine işaret etmektedir. Literatürde bu pozitif etki Nikotinin nöronal nikotinik reseptörlerini etkilemesiyle dopamin, noepinefrin, serotonin gibi nörotransmitterlerin salıverilmesinin artırılması olarak gösterilmektedir ^{10, 13, 14, 15, 16}. Bunun yanında, santral sinir sisteminde Nikotinin presinaptik nöronal nikotinik reseptörleri aracılığı ile aşırımı hızlandırıcı etkisi hakkında çalışmalar vardır ¹⁷. Periferik sinir

sisteminde de Nikotinin nöronal nikotidik reseptörlerini etkilediği ve nörotransmitterin saliverilmesini arttırdığı görölmektedir. Örneğin, izole rat mide fundusunda Nikotinin ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) konsantrasyonu noradrenalin saliverilmesini arttırmaktadır ¹⁰. Anılan bu çalışmada α -bungarotoksin ve α -konotoksin kullanılması ile elde edilen veriler $\alpha 7$ Nikotidik reseptör alttipinin noradrenalinin saliverilmesi üzerinde etkisi olmadığını göstermiştir. Bunun yanında, mekamilamin kullanılması ile elde edilen sonuçlar $\alpha 3\beta 4$ reseptör alttipinin noradrenalinin saliverilmesinde rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca, rat mide fundusunda asetilkolinin saliverilmesinin $\alpha 7$ veya $\alpha 3\beta 4$ nikotidik reseptör alttipi aracılığıyla sağlandığı belirlenmiştir ⁹⁸.

Yukarıda bahsedilen presinaptik nöronal nikotidik reseptörler sinir terminallerinde intraselüler serbest Ca^{2+} 'un konsantrasyonunun arttırılmasıyla nörotransmitterlerin saliverilmesini modüle etmektedir. Szilard I. Szabo ve ark., gösterdiği gibi son teknoloji aracılığıyla yapılan nöronal nikotidik reseptörler üzerindeki araştırmalarda, Nikotinin düşük dozu bile intraselüler kalsiyum düzeyinde anlamlı değişiklikler oluşturmaktadır ⁸⁸. Fare vas deferensinde yapılan bir çalışmada ²², Nikotinin Ca^{2+} üzerinde olan etkileri, intraselüler depolardan kalsiyum saliverilmesini düzenleyen ajanlar - ryanodin ve kafein - tarafından önlenmektedir. Sevil Ö.İlhan'ın çalışmasında ise ⁸⁷, kadmiyum sülfatin uygulaması Nikotinin EAU'nın oluşturduğu nörojenik kasılmaları azalttığı

görülmektedir. Bu gözlemler, nöronal nikotik reseptörlerin nörotransmitterleri kalsiyum aracılığıyla salıverdiği fikrini desteklemektedir.

Nikotinin uygulanması hipokampal striatum radiatum internöronlarında dendritik Ca^{2+} 'un geçici artmasını $\alpha 7$ ve $\alpha 4\beta 2$ nöronal nikotik reseptörler aracılığıyla sağlamaktadır. Böylece, kalsiyum girişinin presinaptik sinir sonlanmalarında fizyolojik rol oynadığı gösterilmiştir ⁸⁸. Üstelik, Nikotin Ca^{2+} 'un girişini arttırdığından dolayı, nöronların fazla yaşamasını sağladığı hakkında hipotez bulunmaktadır ³⁸. Fakat, sigara kullanımında nöronal nikotik reseptörlerin kalsiyuma olan geçirgenliğinden dolayı patofizyolojik etki gösterdiği bilinmektedir. Kalsiyum konsantrasyonunun artması intraselüler sinyal ve organellerin fonksiyonlarını engelleyerek serbest radikallerinin oluşumunun esas sebebi olduğu da gösterilmiştir ²⁵.

$\alpha 7$ Nikotik reseptörleri aracılığıyla oluşan kalsiyum influsu protein kinaz C ve nNOS gibi kalsiyuma-bağılı olan süreçleri de aktive edebilmektedir ⁸⁹. Kalsiyumun belirgin bir şekilde artması SOR'un oluşması, enerjinin oluşma bozukluğu, bazı hidrolitik enzimlerin aktivasyonu gibi değişik degradatif (indirme) süreçleri başlatabilmektedir ³⁰. İntraselüler kalsiyumun artması fosfolipaz A_2 aktivitesini stimüle ederek ve araşidonik asidin seviyesini arttırarak serbest radikallerinin oluşumuna sebep olmaktadır ^{31,32}. Dolayısıyla, kalsiyumun sadece nörotransmitterlerin

modülasyonunda değil SOR'un oluşumunda da katkıda bulunabildiği varsayılmaktadır.

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Genel olarak serbest radikal üretimi, patolojik mekanizmaların bir parçasıdır. Pek çok ksenobiyotiğin toksisitesi serbest radikal üretimi ile ilgilidir. Aynı zamanda, Nikotinin de bu süreçlerde katkıda bulunması hakkında değişik yayınlar yapılmıştır^{50, 49}. Nikotin toksisitesinin oksidatif stress, reaktif oksijen radikallerinin oluşmasıyla bağlantılı olduğu pekçok çalışmalar da mevcuttur²⁶. Buna karşılık, Nikotinin beynin mitokondrial solunum zincirinin kompleks 1 ile etkileşimi sonucunda SOR'un oluşumunu azalttığı bilinmektedir^{4, 28}. Bundan dolayı, Nikotin ve serbest oksijen radikalleri arasındaki ilişki ile ilgili hipoteze dayanarak Nikotinin asetilkolini salıverme özelliğinin üzerinde oksidanların ve antioksidanların etkisi olup olmadığını araştıran yazılar gözden geçirilmiştir.

Bu konu üzerinde değişik araştırmacıların yaptığı çalışmalarda Pirogallolun nöronal nikotinik reseptörleri aracılığıyla Ak'nin salıverilmesinde rolü olup olmadığı incelenmiştir. Pirogallol süperoksit anyonun donoru ya da jeneratörü olarak tanımlanmakta ve biyolojik sistemlerde $O_2^{\cdot-}$ 'in rolünü araştırmak için kullanılmaktadır. Pirogallol

süperoksit anyonu oluşturan mezengial hücreler, insan lenfoma hücreleri ve insan glioma hücreleri gibi bazı hücrelerin ölümüne sebep olmaktadır⁹⁰. Fakat, bu süreçler çerçevesinde nöronal hücre ölümünde $O_2^{\cdot-}$ rolü tam olarak açıklanmamıştır. Bu nedenle $O_2^{\cdot-}$ rolü belirlenmek için feokromositoma PC 12 hücreleri kullanılmıştır. PC 12 hücrelerinde Pirogallolun uygulanması süperoksidin intrasellüler seviyesini artırmaktadır⁹⁰. Böylece, daha önce yapılan benzer araştırmalara göre bu tezin çalışmalarda elde edilen sonuçlarındaki Pirogallolun kolinerjik tranmsmisyonun üzerinde etkileri karşılaştırılmıştır. Literatürde Pirogallolun asetilkolinin etkileşimi ve kolinerjik aşırım üzerindeki olan etkileri incelendiğinde, Bauer V. ve arkadaşlarının çalışmasında, Pirogallol kedi bronşiyol düz kasında EAU tarafından oluşturulan bifazik kolinerjik kasılmayı etkilemediği, fakat DEDTCA'nın (endojen süperoksid dismutazın inhibitörü) uygulanması sonucu bu kontraksiyonu uzun süreli olarak ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir⁷⁹. Bununla beraber, aynı çalışmada Pirogallol trakeal şeritte tek (single) EAU ile oluşturulan eksitatör kavşak potansiyel (EJP-excitatory junction potential) amplitüdünü ortadan kaldırmış, ve DEDTCA'nın uygulamasından sonra EJP amplitüdünde anlamlı artış meydana getirmiştir. Bu sonuçlara dayanarak Pirogallolun kolinerjik nörotransmisyonunu inhibe ettiği, hidrojen peroksidin ise arttırdığı gösterilmiştir⁷⁹.

Bu konuda asetilkolinin etkisi üzerinde yapılan diğerk bir çalışmada, süperoksit anyonunun Ak ile oluşan kontraktileteyi hidrojen peroksided göre daha kuvvetli bir şekilde azalttığı gösterilmektedir ⁷³. Ayrıca, anılan çalışmaya göre, O₂⁻ düz kasın Ak'e olan duyarlığını da azaltabilmektedir. Bozkurt T. ve arkadaşları rat mesanesinde yaptığı bir çalışmada preparatın hidrojen peroksit ve Pirogallol ile inkübe edilmesinin, Ak ile elde edilen gevşeme yanıtını değiştirmediği gösterilmiştir ⁷⁴. Bununla beraber SHR (spontan hipertensif ratlar) ve WKY (normotensif Wistar Kyoto ratlar) aortalarında yapılan bir çalışmada ise Pirogallol Ak'nin oluşturduğu gevşemeyi tamamen ortadan kaldırmaktadır ⁹⁴. Yukarıda anılan kedi bronşiyolu ile ilgili çalışmada ⁷⁹ Pirogallol anlamlı olarak kontraksiyon oluşurmakta, fakat DEDTCA'nın (diethyldithiocarbamic acid-endojen superoksid dismutazın inhibitörü) uygulanması sonucunda bazal kas tonusunda Pirogallolun hiçbir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar kontraksiyonun süperoksidin hidrojen peroksided transformasyonu ile ortaya çıktığını kanıtlamaktadır. Çünkü, süperoksit bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemli olan süperoksit, hidrojen peroksidin kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indergeycisi olmaktadır ⁶⁸. Dolaysıyla, süperoksit anyonu kararsız bir molekül olduğu için, dismutasyonla veya spontan olarak hidrojen peroksided dönüşür. H₂O₂'nin sinaptik transmisyonu modüle ettiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir ^{80, 75, 79}. H₂O₂'nin serebral damarların sinir sonlanmalarından endojen Ak'yı salıverdiğine dair bir hipotez mevcuttur ⁷⁵.

Çünkü H₂O₂'nin oluşturduğu baziler arter gevşemesi atropin (muskarinik reseptör antagonisti) tarafından azaltıldığı, ve neostigmin (asetilkolinesteraz antagonisti) tarafından ise anlamlı olarak artırıldığı gösterilmiştir. H₂O₂ lipid-solübl özelliğine sahip olduğu için hücre membranlarını kolaylıkla geçebilmekte ve bu sayede intraselüller mekanizmalarını etkilemektedir. Böylece, H₂O₂ nöromuskuler kavşağı etkileyerek Ak'nin saliverilmesini stimüle etmektedir. Hidrojen peroksit Ak'nin saliverilmesini modife ederek NO oluşturduğu görünmektedir ⁸¹. Tavşan intrapulmoner bronşiyol düz kaslarında yapılan bir çalışmada endotel bağımsız preparatta hidrojen peroksidin Ak'nin oluşturduğu kasılmayı azalttığı gösterilmiştir ⁷⁸. Sevil Ö. İlhan'ın çalışmasında ise Nikotinin EAU'nın oluşturduğu nörojenik kasılmalarında geçici arttırıcı etkisi hidrojen peroksidin 10⁻⁴ M konsantrasyonu ile azaldığı ve katalazın 500 U/ml konsantrasyonu ile anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir ⁸⁷.

Bu çalışmamızda Pirogallol (10⁻⁴ M), EAU üzerinde Nikotinin oluşturduğu arttırıcı kasılma cevapları üzerinde kontrol cevaplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. Fakat, EAU'ya bağlı kasılma cevaplarını azalttığı gözlemlendi. Pirogallol'un EAU'ya bağlı kasılma cevaplarını azaltması nörotransmisyonunda inhibe edici etkisi olduğunu göstermektedir. Fakat, süperoksit anyonu çok kararsız bir molekül olduğu için endojen SOD enzimi aracılığıyla hidrojen peroksitde transforme olabileceği düşünülmektedir. H₂O₂ ise, nörotransmisyonu arttırabildiği için

EAU'ya bağlı ve Nikotinin oluşturduğu arttırıcı kasılma yanıtı anlamlı olmayabilmektedir. Ayrıca Pirogallolun EAU'ya bağlı kasılmalarını azalttığı asetilkolinin SOR'un oluşumunda katkısı olabileceğini işaret etmektedir.

Bu alışmada EAU aracılığıyla Nikotinin (10^{-4} M) oluşturduğu kasılma cevapları üzerinde SOR'un etkisini test etmek için Mannitolu, Allopurinolu ve Deferoksamin gibi antioksidanlar kullanılmıştır.

Son zamanlarda Allopurinolun nöroprotektif etkisi olduğuna dair çalışmalar mevcuttur ^{91, 92}, fakat, nöroprotektif etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Allopurinol'un esas etkisi ksantin oksidaz aktivitesini inhibe etmesidir. Böylece, Allopurinol SOR'un oluşturduğu beyin hücrelerindeki hasarı azaltmaktadır. Bunun yanında, Allopurinol'un yüksek konsantrasyonda serbest radikal toplayıcı olduğu, üç değerlikli demir gibi metal iyonların şelasyonunda rolü olduğu, nötrofil birikiminin inhibisyonuna katkıda bulunduğu ve iki değerlikli demirden ferrisitokrom C'ye olan elektron transportunu fasilite ettiği gösterilmiştir ^{99, 100, 101}. Fakat, organotipik hippokampal model üzerinde yapılan bir çalışmada Allopurinol'un nöroprotektif etkisi olmadığı ve böyle bir etkiyi elde etmek için fonksiyonel endotel hücrelerin var olması gerektiği varsayılmıştır ⁹³. Rat aortasında yapılan bir çalışmada, asetilkolinin oluşturduğu endotel-bağımlı kontraksiyonlara serbest oksijen radikallerinin de katkıda bulunabileceği ifade edilmiştir ³³. Anılan alışmada Allopurinol ve Deferoksamin'in endotel-bağımlı kasılmayı azalttığı, fakat bu azalmanın

istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirtilmiştir. Bununla beraber, endotel-bağımsız izole rat aortasında, Allopurinol'un ksantin veya ksantin oksidaz'ın neden olduğu kontraktileteyi önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Konuyla ilgili SHR (spontan hipertensif ratlar) ve WKY (normotensif Wistar Kyoto ratlar) aortalarında yapılan diğer bir çalışmada Allopurinol'un Ak'nin oluşturduğu gevşemeyi anlamlı olarak arttırdığı gözlenmiştir ⁹⁴. Çalışmamızda EAU aracılığıyla Nikotinin oluşturduğu kasılma cevapları üzerinde Allopurinolun etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Bunun nedeninin endotel hücrelerinden kaynaklanabileceğinin düşündürmektedir.

Hidrojen peroksidin daha çok indirekt etkiye sahip olduğu yukarıda belirtilmiştir, fakat hidroksil radikalinin direkt olarak etki edebileceği ve son derece reaktif olduğu hakkında çalışmalar mevcuttur ⁶⁸. ⁷⁶. Genel olarak, hidroksil radikali (OH⁻) hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu ile) meydana gelir. Mannitol OH⁻ radikalini toplayıcı bir madde ⁸⁵ ve Deferoksamin serbest demir şelatörü olarak tanımlanmaktadır. Bu konuda tavşan ince bağırsağında ⁶⁵, ve rat ince bağırsağında ⁹⁵ yapılan değişik çalışmalarda Mannitol'un deneysel iskemi/ reperfüzyon sırasında oluşan hasarı anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Rat aortasında yapılan farklı bir araştırmada hidroksil radikali tarafından oluşturulan düz kas kasılmasının 'Deferoksamin + Mannitol' tarafından anlamlı olarak azaltıldığı

görünmüştür ⁷⁶. Sıçan serebral kortikal nöronlarında ise yapılan bir çalışmada gösterildiği gibi Mannitol, NO'nin oluşturduğu Ak salıverilmesini artırmıştır ⁸¹. Kailash Prasad ve arkadaşları bu konuyla yaptığı araştırmada Ak'nin oluşturduğu vasküler gevşemenin OH⁻ radikali aracılığıyla meydana geldiğini belirtmişlerdir ⁷¹. Bu çalışmaya göre, Ak NO'nin seviyesini artırıp süperoksit ile etkileşmesini sağlamakta. Prasad ve arkadaşlar bu sürecin sonucunda OH⁻ radikali oluştuğunu ileri sürmüşler ve bu hipotezi doğrulamak için izole aortada OH⁻ radikali toplayıcı Mannitol'ü kullanmışlardır. Mannitol Ak'nin oluşturduğu gevşemeyi yaklaşık olarak %74 oranında azaltmıştır.

Bazı araştırmalarda Deferoksamin'in antioksidan olarak etki gösterdiği varsayılmaktadır ⁹³. İlk önce, Deferoksamin Fenton/Haber-Weiss reaksiyonu üzerinden üç değerlikli demiri bağlayarak hidroksil radikallerinin oluşumunu önlemektedir. İkincisi, Deferoksamin metal ile katalizlenen peroksinitritin nitrasyonunu inhibe etmektedir. Son olarak, Deferoksamin 0.5-1mM konsantrasyonlarında süperoksit ve hidroksil radikalleri toplayabilmektedir. Tavşan intrapulmoner bronşiyol düz kaslarında yapılan bir çalışmada Deferoksamin ortamda H₂O₂ olmadığı zaman Ak'nin oluşturduğu fazik ve tonik kasılmaları anlamlı olarak azaltmakta, fakat H₂O₂ varlığında anlamlı bir etki oluşturmamaktadır ⁷⁸. Rat hipokampal preparatlarında yapılan farklı bir çalışmada Deferoksamin, H₂O₂'nin oluşturduğu sinaptik transmisyonun inhibisyonunu

önlemektedir ⁹⁶. Bu çalışmamızın verileri Deferoksaminin kolinerjik transmisyon üzerinde etkisi olmadığı gözlemlendi. Mannitolun yüksek konsantrasyonu ise kolinerjik transmisyon üzerinde istatistiksel anlamlı bir etkisi olduğunu göstermektedir. Mannitolun yüksek konsantrasyonda anlamlı olarak Ak'nin salıverilmesini azaltma mekanizması tam olarak bilinmemektedir, ancak, Nikotinin direkt etkisi sonucunda veya Ak'nin düz kastaki NO seviyelerini artırması sonucunda oluşan NO'in süperoksit ile etkileşmesinin OH⁻ radikallerinin oluşmasını arttırdığı, ve bunun sonucunda EAU'ya bağlı Nikotinin oluşturduğu "geçici" cevaplarının azalmasına neden olduğu söylenebilir.

VI. SONUÇ:

Yukarıda açıklanan verileri değerlendirerek şu sonuçlara ulaşabiliriz. TTX ve Heksametonyum ile elde edilen veriler Ak'nin saliverilmesinin nöronal nikotinik reseptörlerin uyarılmasına bağlı olduğunu doğrulamıştır. Nikotin presinaptik nöronal nikotinik reseptörlerini etkilemekte ve Ak'nin saliverilmesini fasilite etmektedir. Nörotransmisyona olan etkisi dışında Nikotinin SOR üzerinde farklı etki oluşturduğu görülmüştür. Nikotin yüksek dozda nörotoksik etkiye sahip olup oksidatif stress'i stimüle edebilmektedir, düşük dozda ise antioksidan etki gösterip nöroprotektif etkiye önemli derecede katkıda bulunabilmektedir ^{4, 97}. Bu nedenle, çalışmamızda EAU aracılığıyla Nikotinin (10^{-4} M) oluşturduğu kasılma cevapları üzerinde SOR'un etkisini test etmek için Pirogallol ve koruyucu maddeler (Mannitol, Allopurinol ve Deferoksamin) kullanılmıştır. Mannitol 10^{-4} M konsantrasyonda Nikotin etkisi ile oluşan geçici kasılma cevaplarını arttırmış, ancak anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Mannitol daha yüksek konsantrasyonda (5×10^{-3} M) ise Nikotin etkisi ile oluşan kontraksiyonları istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde azaltmıştır. Mannitolun yüksek konsantrasyonda anlamlı olarak Ak'nin saliverilmesini azaltma mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Allopurinol ve Deferoksamin uygulanması ise, Nikotinin oluşturduğu kasılma cevapları üzerinde anlamlı bir değişiklik yapmamıştır. Bu veriler, muhtemelen, Nikotinin ve antioksidanların doku ile kısa süreli temas etmesinden kaynaklanmaktadır.

Nikotin nöronal nikotik reseptörleri uyararak asetilkolinin salıverilmesini ve sinir sonlanmalarında kalsiyumun konsantrasyonunu artırmakta, aynı zamanda, bu sürecin sonucunda Nikotin SOR'un oluşumuna da sebep olabilmektedir. Üstelik, Nikotinin, kalsiyumun artışına ve asetilkolinin serbest radikalleri oluşturabileceğine dair bulgular gözlenmektedir ^{26, 31, 32, 30, 29}. Bu tez çerçevesinde yapılan araştırmada, Nikotinin EAU 'nın oluşturduğu kontraksiyonlar üzerinde geçici bir artışa neden olduğu gösterilmiş ve bu etkinin mekanizmaları incelenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar, Nikotinin kolinerjik aşırım üzerinden gerçekleştirdiği etki değişik şekillerde sağlanabilmektedir. Mannitol bu etkinin konsantrasyona bağımlı arttırmasına veya azaltmasına neden olurken, Pirogallol ise EAU'ya bağlı yanıtlarının azalttığını göstermiş, bu yanıtlara serbest oksijen radikallerinin ve antioksidanların katkıda bulunduğunu gözlenmiştir. Bu sonuçlar Nikotin ile yapılacak diğer alanlardaki çalışmalar için yol gösterici olabilir.

Bu bulgular, sigaranın sağlığa zararlı etkilerini olumlu kabul edilebilecek herhangi bir etkisini belirlemeye ve birçok hastalığın nörobiyolojisinin moleküler düzeyde anlamaya yardımcı olabilir.

VII. ÖZET

Nikotin, nöronal nikotinic reseptörleri etkileyerek sinir sonlanmalarından asetilkolinin saliverilmesini arttırdığını bilinmektedir. Çalışmamızda tavşan mide fundus düz kas preparatında EAU'ya bağlı kasılma cevapları üzerinde Nikotinin "geçici" artışa neden olduğu ve Heksametonyumun, nöronal nikotinic reseptör antagonisti, EAU üzerinde Nikotinin oluşturduğu "geçici" artırıcı etkiyi ortadan kaldırdığını gösterdik. Atropin tarafından EAU'ya bağlı kasılma yanıtlarının ortadan kalkması ve Neostigmin tarafından artması, bu olayın kolinerjik aşırım üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca Nikotin mitokondriyal solunum zincirini bozarak, süperoksit anyonun ve hidrojen peroksidin oluşmasını artırdığı bilinmektedir. Bu nedenle EAU üzerinde Nikotinin oluşturduğu asetilkolinin saliverilmesi ve SOR'un etkisinin arasında bir ilişki olup olmadığını araştırılması amaçlanmıştır.

İzole tavşan mide fundusundan longitüdüal şeritler hazırlandı. İn vitro, şeritlere (60 V, 8-32 Hz, 1 ms) stimülasyon ile EAU uygulandı. İlk olarak, EAU'ya bağlı Nikotinin etkisi araştırıldı, ayrı seri deneyde ise EAU'ya bağlı Nikotinin etkisi Pirogallol, Allopurinol, Deferoksamin ve Mannitolun uygulaması sonucunda değerlendirildi.

Sonuç olarak, Tetrodotoksin EAU'ya bağlı kontraksiyonu ortadan kaldırılmaktadır. Pirogallol EAU'ya bağlı kontraksiyonu anlamlı azaltırken, Nikotin oluşturduğu EAU üzerindeki kasılmayı anlamlı etkilemediği bulundu. Mannitol yüksek konsantrasyonda (5×10^{-3} M) EAU üzerindeki Nikotinin oluşturduğu yanıtı anlamlı olarak azalttı. Allopurinolun, Deferoksaminin ve Mannitolun dűřük dozun uygulaması ise Nikotinin oluşturduğu kasılma cevapları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik yapmadı.

Anahtar kelimeler: asetilkolin, nöronal nikotinic reseptörleri, antioksidanlar, oksidanlar.

VIII. SUMMARY

Nicotine having an effect upon presynaptic receptors while having increased the release of Acetylcholine from nerve endings. Our data shows that electrical field stimulation (EFS) dependent Nicotine induced transiently increased contraction of the smooth muscle in the rabbit isolated fundus and Hexamethonium, an antagonist of the neuronal nicotinic receptor, significantly inhibited the contractile response to nicotine on EFS. Furthermore, EFS induced contractions were abolished by Atropine and enhanced by Neostigmine. This data demonstrates that response to Nicotine on EFS proceeds as a result of cholinergic transmission. It is also known that nicotine possesses the property of increasing the formation of reactive oxygen species (ROS). Thus, we decided to investigate whether there is interrelation between the effects of ROS and EFS dependent nicotine induced acetylcholine release.

Longitudinal strips of smooth muscle were subjected to electrical field stimulation (EFS) in vitro using stimulus parameters (60 V, 8-32 Hz, 1 ms). The effect of nicotine on EFS responses was then measured in the absence and presence of a Pirogallol, Allopurinol, Deferoxamine and Mannitol.

In conclusion, TTX abolished EFS induced contractions. Pirogallol induced decreased EFS-induced contractile response, while there was no significant contractile response to nicotine on EFS. At that,

Mannitol significantly reduced contractile response to nicotine on EFS only in high concentration. Whereas in small concentrations Mannitol statistically did not cause any results. Deferoxamine and Allopurinol also had no significant response.

Key words: acetylcholine, neuronal nicotinic receptors, antioxidants, oxidants.

IX. KAYNAKLAR

1. Üneri Ö, Tural Ü, Memik NÇ, Şizofreni Ve Sigara İçimi: Biyolojik Bağlantı Nerede?; Türk Psikiyatri Dergisi 2006; 17(1):55-64.
2. Popova E, Sigara İçme Ve Kanser Oluşumunun Riski, Vrach Dergisi, 2006, 12: 10-13.
3. Çolakoğlu N, Ozan E, Sönmez MF, Yılmaz S, Ozan G, Sigaranın Karaciğerde Oluşturduğu Yapısal Değişiklikler Üzerine Melatonin Ve C Vitamininin Etkileri, Fırat Tıp Dergisi, 2005; 10 (3): 108-112.
4. Guan ZZ, Yu WF and Nordberg A, Dual effects of nicotine on oxidative stress and neuroprotection in PC12 cells, Neurochem. Int., 2003; 43 (3): 243-249
5. Zoghi M, Nalbantgil İ., Hipertansiyon ve Endotel Fonksiyon Bozukluğu, Anadolu Kardiyoloji Dergisi, 2002; 2: 142-7
6. Öztuna F, Sigaranın Hücresel Etkileri, Akciğer Arşivi: 2004; 2: 111-116.
7. Karafakoğlu YS, Tütün Çalışanlarında Oksidan-Antioksidan Durum, Kocatepe Tıp Dergisi, 2004; 5: 7 – 10.

8. Doğan YH, Sigarayı Bırakmada Antidepresanların Rolü, Türk Aile Hekimliği Dergisi, 2005; 9(1): 32-36.

9. Pekmez H, Kuş İ, Çolakoğlu N, Zararsız İ, Ögetürk M, Sarsılmaz M, Sıçanlarda Sigara İnhasyonunu Sonucu Prefrontal Kortekste Oluşan Yapısal Değişiklikler Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester (Cape)'İN Etkisi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2004; 13(3): 18-25.

10. Gotti C and Clementi F, Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology, Progress in Neurobiology, 2004; 74 (6): 363-396

11. Dileköz E, Ercan S, Alzheimer Tedavisinde Muskarinik ve Nikotinik Reseptörleri Etkileyen İlaçların Yeri, Demans dergisi 2002; 2: 84-87.

12. Vizi ES and Lendvai B, Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system, Brain Reserch Reviews, 1999; 30 (3): 219-235

13. Yokotani K, Wang M, Okada S, Murakami Y and Hirata M, Characterization of nicotinic acetylcholine receptor-mediated noradrenaline release from the isolated rat stomach, European Journal of Pharmacolgy, 2000; 402 (3): 223-229.

14. Rao TS, Correa LD, Adams P, Santori EM and Sacaan AI, Pharmacological characterization of dopamine, norepinephrine and serotonin release in the rat prefrontal cortex by neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists, *Brain research*, 2003; 990 (1-2): 203-208.

15. Wang M, Okada S, Murakami Y and Yokotani K, Nicotine-induced noradrenaline release from the isolated rat stomach by activation of L- and N-type calcium channels, *J.Pharmacology*, 2000; 83: 102-106.

16. Yokotani K, Okada S, Murakami Y and Nakamura K, Nicotinic receptors involved in gastric noradrenaline release evoked by electrical stimulation of the splanchnic nerve in rats, *European Journal of Pharmacology*, 2001; 423 (2-3): 149-155.

17. Cuprian AM, Solanki P, Jackson MV, Cunnane TC, Cholinergic innervation of the mouse isolated vas deferens, *Br. J. Pharmacol.* 2005; 46(7):927-34.

18. Schneider DA and Galligan JJ, Presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the myenteric plexus of guinea pig intestine, *Am. J. Physiol. Gastrointestinal Liver Physiol*, 2000; 279: 528-535.

19. LePard KJ and Galligan JJ, Analysis of fast synaptic pathways in myenteric plexus of guinea pig ileum, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 1999; 276: 529-538.

20. Galligan JJ, Pharmacology of synaptic transmission in the enteric nervous system, *Curr Opin Pharmacol*. 2002; 2(6): 623-9.

21. Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA, Zhou X, Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system, *J Auton Nerv Syst*. 2000; 81(1-3):97-103.

22. Brain KL, Trout SJ, Jakson VM, Nicotine induces calcium spikes in single nerve terminal varicosities: a role for intracellular calcium stores. *Neuroscience*, 2001; 106(2): 395-403.

23. Wu HJ, Chi CW, Liu TY, Effects of pH on nicotine-induced DNA damage and oxidative stress, *J Toxicol Environ Health A*. 2005; 68(17-18):1511-23.

24. Baskaran S, Lakshmi S, Prasad PR, Effect of cigarette smoke on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in albino rat. *Indian J Exp Biol*, 1999; 37:1196-2000.

25. Barros DM, Galhardi FG, Ribas Ferreira JL, Guterres LB, Dickel O, Geracitano LA, Izquierdo I, Monserrat JM, The benefits and

drawbacks of nicotine exposure in the cortex and hippocampus of old rats, *Neurotoxicology*, 2007; 28 (3): 562–568.

26. Kovacic P, Cooksy A, Iminium metabolite mechanism for nicotine toxicity and addiction: Oxidative stress and electron transfer, *Medical hypotheses*, 2005; 64 (1): 104-111.

27. Balakrishnan A, Menon VP, Effect of hesperidin on matrix metalloproteinases and antioxidant status during nicotine-induced toxicity, *Toxicology*. 2007; 238(2-3): 90-8.

28. Cormier A, Morin C, Zini R, Tillement J . and Lagrue G, In vitro effects of nicotine on mitochondrial respiration and superoxide anion generation, *Brain Res*. 2001; 900(1): 72-9.

29. Oldenburg O, Critz SD, Cohen MV, Downey JM, Acetylcholine-induced production of reactive oxygen species in adult rabbit ventricular myocytes is dependent on phosphatidylinositol 3-and Src-kinase activation and mitochondrial KATP channel opening, *J. Mol. Cell Cardiol*. 2003; 35(6):653-60.

30. Liu Q and Zhao B, Nicotine attenuates β -amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures, *British Journal of Pharmacology*, 2004; 141: 746–754.

31. Bonventre JV, Phospholipase A₂ and signal transduction. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1992; 3: 128–150.
32. Verity MA, Mechanisms of phospholipase A₂ activation and neuronal injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1993; 679: 110–120.
33. Rubanyi GM, Vanhoutte PM, Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle, *Am J Physiol.* 1986; 250(5 Pt 2):H815-21.
34. Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM, Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat, *Hypertension.* 1989; 13 :859-64.
35. Fucile S, Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors, *Cell Calcium*, 2004; 35 (1): 1-8.
36. Lips KS, Brüggmann D, Pfeil U, Vollerthun R, Grando SA and Kummer W, Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta, *Placenta* , 2005; 26 (10): 735-746.
37. Arneric SP, Holladay M, Williams M, Neuronal nicotinic receptors: A perspective on two decades of drug discovery research, *biochemical pharmacology* [online]. 2007 [cited 2007 June 26]. Available from : URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

38. Hogg RC, Bertrand D, Partial agonists as therapeutic agents at neuronal nicotinic acetylcholine receptors, *biochemical pharmacology*, 2007; 73: 459– 468.

39. Picciotto MR, Zoli M, Nicotinic Receptors in Aging and Dementia, *J Neurobiol.* 2002; 53(4): 641-55.

40. Leonard S, Bertrand D, Neuronal nicotinic receptors: from structure to Function, *Nicotine & Tobacco Research*, 2001 3: 203– 223.

41. Gaimarri A, Moretti M, Riganti L, Zanardi A, Clementi F, Gotti C, Regulation of neuronal nicotinic receptor traffic and expression, *Brain Res Rev.* 2007; 55(1): 134-43.

42. Oh ST, Yedidag E, Conklin JL, Martin M and Bielefeldt K, Calcium release from intracellular stores and excitation- contraction coupling in intestinal smooth muscle, *J Surg Res.* 1997; 71(1):79-86.

43. Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC, *Pharmacology* 3rd edition, Philadelphia: Lippincott's Illustrated Reviews, 2003.

44. Mandl P, Kiss JP, Role of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of gastrointestinal motility, *Brain Research Bulletin*, 2007; 72: 194–200.

45. Doğan YH, Sigara içme davranışında cinsiyet farkı ve Nikotinin temel etki mekanizmaları, Türk Aile Hekimliği dergisi, 2004, 8 (4): 177-182.

46. Kellar KJ, Dfivila-Garcfa MI, Xiao Y, Pharmacology of neuronal receptors: effects of acute nicotinic acetylcholine and chronic nicotine, Nicotine & Tobacco Research, 1999; 1: 117-120.

47.Figuero E, Soory M, Cerero R, Bascones A, Oxidant/antioxidant interactions of nicotine, Coenzyme Q10, Pycnogenol and phytoestrogens in oral periosteal fibroblasts and MG63 osteoblasts, steroids, 2006; 71 (13-14): 1062–1072.

48. Cooke JP, Bitterman H, Nicotine and angiogenesis: a new paradigm for tobacco-related disease, Ann Med. 2004; 36(1):33-40.

49. Lee LY, Burki NK, Gerhardstein DC, Gu Q, Kou YR, Xu J, Airway irritation and cough evoked by inhaled cigarette smoke: Role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors, Pulm Pharmacol Ther. 2007;20(4):355-64.

50. Kalpana C and Menon VP, Protective Effect of Curcumin on Circulatory Lipid Peroxidation and Antioxidant Status During Nicotine-Induced Toxicity, Toxicology Mechanisms and Methods, 2004, 14: 339–343.

51. Sudheer AR, Muthukumaran S, Kalpana C, Srinivasan M., Menon V.P., Protective effect of ferulic acid on nicotine-induced DNA damage and cellular changes in cultured rat peripheral blood lymphocytes: A comparison with N-acetylcysteine, *Toxicol In Vitro*. 2007; 21(4): 576-85.

52. Kovacic P, Cooksy AL, Unifying mechanism for toxicity and addiction by abused drugs: electron transfer and reactive oxygen species, *Med Hypotheses*. 2005; 64(2):357-66.

53. Barr J, Sharma CS, Sarkar S, Wise K, Dong L, Periyakaruppan A, Ramesh GT, Nicotine induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor kappa B in rat mesencephalic cells, *Mol Cell Biochem*. 2007; 297(1-2): 93-9.

54. Dubick MA, Keen CL, Influence of nicotine on tissue trace element concentrations and tissue antioxidant defense. *Biol Trace Elem. Res*. 1991; 31: 97-109.

55. Petruzzelli S, Tavanti LM, Pulerà N, Fornai E, Puntoni R, Celi A, Giuntini C, Effects of nicotine replacement therapy on markers of oxidative stress in cigarette smokers enrolled in a smoking cessation program, *Nicotine Tob Res*. 2000; 2(4): 345-50.

56. Kayaalp SO, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 9. Baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara; 2000; 728-729.

57. Mishra OP and Delivoria-Papadopoulos M, Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain, *Brain Research Bulletin*, 1999; 48 (3): 233-238.
58. Shanin YN, Shanin VY, Zinovyev E.V., *Klinikte antioksidanların kullanılması*, Moskova: Meditsina; 2003. p.15-45.
59. Jin L, Ying Z, and Webb RC, Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004; 287: 1495-1500.
60. Shen JZ, Zheng XF, Kwan CY, Differential contractile actions of reactive oxygen species on rat aorta: selective activation of ATP receptor by H₂O₂, *Life Sci*. 2000; 66(21): 291-6.
61. Miller AA, De Silva TM, Jackman KA, Sobey CG, Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress, *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34(10): 1037-43.
62. Kaplan M, Mutlu EA, Benson M, Fields JZ, Banan A, Keshavarzian A., Use of herbal preparations in the treatment of oxidant-mediated inflammatory disorders, *Complement Ther Med*. 2007; 15(3):207-16.

63. Kayaalp SO, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 7. Baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara; 1995 p. 1609-1611.

64. Newman MB, Arendash GW, Shytle R D, Bickford PC, Tighe T and Sanberg PR, Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS, Life Sciences, 2002; 71 (24): 2807-2820.

65. Byrka-Owczarek K, Stęplewska-Mazur K, Krasoń M, Bohosiewicz J, Koszutski T and Wojtynek G, The evaluation of the protective action of antioxidants on small intestine of rabbits experimentally injured by ischemia and reperfusion, Journal of Pediatric Surgery, 2004; 39 (8): 1226-1229.

66. Kayyali US, Budhiraja R, Pennella CM, Cooray S, Lanzillo JJ, Chalkley R, Hassoun PM., Upregulation of xanthine oxidase by tobacco smoke condensate in pulmonary endothelial cells, Toxicol Appl Pharmacol. 2003; 188(1): 59-68.

67. Paszkowski T, Clarke RN and Hornstein MD, Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle, Human reproduction, 2002; 17 (4): 921-925.

68. Akkuş İ, Serbest radikalleri ve fizyopatolojik etkileri, Konya: Mimoza Basım ; 1995, p.10-34.

69. Sato A, Sakuma I, Gutterman DD, Mechanism of dilation to reactive oxygen species in human coronary arterioles, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285(6): 2345-54.

70. Fujimoto S, Asano T, Sakai M, Sakurai K, Takagi D, Yoshimoto N, Itoh T, Mechanisms of hydrogen peroxide-induced relaxation in rabbit mesenteric small artery, *Eur J Pharmacol*. 2001; 412(3):291-300.

71. Prasad K and Bharadwaj LA, Hydroxyl radical--a mediator of acetylcholine-induced vascular relaxation, *J Mol Cell Cardiol*. 1996; 28(9): 2033-41.

72. Yang D, Feletou M, Boulanger CM, Wu HF, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM., Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats, *Br J Pharmacol*. 2002; 136(1):104-10

73. Prasad K and Gupta JB, Relaxant effect of oxygen free radicals on rabbit tracheal smooth muscle, *Pulm Pharmacol Ther*. 2002;15(4):375-84.

74. Bozkurt TE, Sahin-Erdemli I, Evaluation of the rat bladder-derived relaxant factor by coaxial bioassay system, *Eur J Pharmacol*. 2004; 495(2-3):193-9.

75. Yang ZW, Zhang A, Altura BT and Altura BM, Endothelium-dependent relaxation to hydrogen peroxide in canine basilar artery: a potential new cerebral dilator mechanism, Brain Research Bulletin, 1998; 47 (3): 257-263.

76. Hibino M, Okumura K, Iwama Y, Mokuno S, Osanai H, Matsui H, Toki Y, Ito T, Oxygen-derived free radical-induced vasoconstriction by thromboxane A₂ in aorta of the spontaneously hypertensive rat, J Cardiovasc Pharmacol. 1999; 33(4):605-10.

77. Ardanaz N, Beierwaltes WH, Pagano PJ., Comparison of H₂O₂-induced vasoconstriction in the abdominal aorta and mesenteric artery of the Mouse, Vascul Pharmacol.[online]; [cited 2007 Sep 7]. Available from : URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

78. Asano T, Hattori T, Tada T, Kajikuri J, Kamiya T, Saitoh M, Yamada Y, Itoh M and Itoh T, Role of the epithelium in opposing H₂O₂-induced modulation of acetylcholine-induced contractions in rabbit intrapulmonary bronchiole, British Journal of Pharmacology, 2001; 132: 1271–1280;

79. Bauer V, Nakajima T, Pucovsky V, Onoue H, Ito Y, Effects of superoxide generating systems on muscle tone, cholinergic and NANC responses in cat airway, J Auton Nerv Syst. 2000; 79(1): 34-44.

80. Katsuki H, Nakanishi C, Saito H, Matsuki N, Biphasic effect of hydrogen peroxide on field potentials in rat hippocampal slices, *Eur J Pharmacol.* 1997; 337(2-3): 213-8.

81. Ohkuma S, Katsura M, Chen DZ, Guo JL and Kuriyama K, Hydroxyl radical scavengers enhance nitric oxide-evoked acetylcholine release from mouse cerebral cortical neurons, *Molecular Brain Research*, 1995; 34 (2): 347-350.

82. Park WH, Han YH, Kim SH, Kim SZ., Pirogallol, ROS generator inhibits As4.1 juxtaglomerular cells via cell cycle arrest of G2 phase and apoptosis, *Toxicology.* 2007; 235 (1-2):130-9.

83. Park WH, Han YW, Kim SH, Kim SZ, A superoxide anion generator, Pirogallol induces apoptosis in As4.1 cells through the depletion of intracellular GSH content, *Mutat Res.* 2007; 619 (1-2): 81-92.

84. Dileköz E, İzole perfüze tavşan böbreğinde histamin yanıtlarına katalaz ve Allopurinol'ün etkisi, *Doktora Tezi, Ankara, Gazi Üniversitesi, 2005*

85. Wenli Y and Yaping Z, Chemiluminescence evaluation of oxidative damage to biomolecules induced by singlet oxygen and the protective effects of antioxidants, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* , 2005; 1725 (1): 30-34

86. Starke K, Gothert M, and Kilbinger H, Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Rev*, 1989; 69: 864–989.

87. Özger İlhan S, The effect of nicotine on the cholinergic transmission in the rabbit isolated gastric fundus: Role of free oxygen radicals., PhD thesis in pharmacology, Ankara: Gazi University, 2005

88. Szabo SI, Zelles T, Lendvai B, Intracellular Ca²⁺ dynamics of hippocampal interneurons following nicotinic acetylcholine receptor activation, *Neurochemistry International* [online]. 2007 [cited 2007 May 31]. Available from : URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

89. Pubill D, Chipana C, Camins A, Pallàs M, Camarasa J and Escubedo E, Free radical production induced by methamphetamine in rat striatal synaptosomes, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005; 204 (1): 57-68.

90. Yamada J, Yoshimura S, Yamakawa H, Sawada M, Nakagawa M, Hara S, Kaku Y, Iwama T, Naganawa T, Banno Y, Nakashima S, Sakai N, Cell permeable SOR scavengers, Tiron and Tempol, rescue PC12 cell death caused by Pirogallol or hypoxia/reoxygenation, *Neurosci Res*. 2003; 45(1):1-8.

91. Van Bel F, Shadid M, Moison RM , Dorrepaal CA, Fontijn J, Monteiro L, Van De Bor M, and Berger HM, Effect of Allopurinol on

Postasphyxial Free Radical Formation, Cerebral Hemodynamics, and Electrical Brain Activity, *Pediatrics*, 1998; 101: 185-193.

92. Shadid M, Buonocore G, Groenendaal F, Moison R, Ferrali M, Berger HM and Van Bel F, Effect of deferoxamine and Allopurinol on non-protein-bound iron concentrations in plasma and cortical brain tissue of newborn lambs following hypoxia-ischemia, *Neuroscience Letters*, 1998; 248(1): 5-8.

93. Peeters C, Hoelen D, Groenendaal F, Van Bel F and Bär D, Deferoxamine, Allopurinol and oxypurinol are not neuroprotective after oxygen/glucose deprivation in an organotypic hippocampal model, lacking functional endothelial cells, *Brain Research*, 2003; 963 (1-2): 72-80.

94. Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U, Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation, *Cardiovasc Res*. 2003; 59(2):488-500.

95. Aldemir M, Ozturk H, Guloglu C, Buyukbayram H, Effects of in vivo freezing and Mannitol in intestinal ischaemia-reperfusion injury, *Injury*. 2003 ; 34(3):173-9.

96. Avshalumov MV, Chen BT and Rice ME, Mechanisms underlying H₂O₂-mediated inhibition of synaptic transmission in rat hippocampal slices, *Brain Research*, 2000; 882 (1-2): 86-94.

97. Túnez I, Montilla P, Muñoz MC and Drucker-Colín R, Effect of nicotine on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes, *European Journal of Pharmacology*, 2004; 504 (3): 169-175.

98. Sahibzada N, Ferreira M Jr, Williams B, Wasserman A, Vicini S and Gillis RA, Nicotinic Ach receptor subtypes on gastrointestinally projecting neurones in the dorsal motor vagal nucleus of the rat, *J Physiol*, 2002; 545 (3): 1007-1016.

99. Hudome S, Palmer C, Roberts RL, Mauger D, Housman C and Towfighi J, The role of neutrophils in the production of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Pediatr. Res.* 1997 (41): 607-616.

100. Ko KM and Godin DV, Inhibition of transition metal ion-catalysed ascorbate oxidation and lipid peroxidation by allopurinol and oxypurinol. *Biochem. Pharmacol.* 1990 (40) : 803-809.

101. Peterson DA, Kelly B and Gerrard JM, Allopurinol can act as an electron transfer agent. Is this relevant during reperfusion injury?. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 (137) : 76-79.

102. Kayaalp SO, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 10. Baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara, 2002; p. 724-725.

TEŐEKKÖR

Bu alıőma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir (01/2004 – 77).

Doktora eğitimimin her aşamasında gōsterdikleri hoőtęörü, yardım ve destekleri için öncelikle Prof. Dr. Yusuf SARIOğLU'na ve Prof. Dr. Sevim ERCAN'a, emeiği geçen bōlümümüz tüm oğretim üyelerine, tez döneminde destek veren Prof. Dr. Deniz ERBAŞ'a, tez çalıőması sırasında yardım ve desteklerini gördüğüm baőtta Dr. Gökçe Sevim ÖZTÖRK ve Dr. İ. Mert VURAL olmak üzere tüm asistan arkadaőtlarım ve ailemin bütün fertlerine tüm kalbimle teőtakkör ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Ainagül
Soyadı : ANUVARBEKOVA
Doğum Yeri ve Tarihi : Kırgızistan, 18.08.1977
Medeni Hali : Evli, 1 çocuğu var.

EĞİTİMİ:

2002 – : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji (Tıp) Doktora programı,
Ankara, Türkiye

2000 – 2002 : Kırgız Devlet Tıp Akademisi, Onkoloji
Enstitüsü, Uzmanlık Eğitimi, Bishkek,
Kırgızistan

1994 – 2000 : Kırgız Devlet Tıp Akademisi, Bishkek,
Kırgızistan

Yabancı Dili : Türkçe, Rusça ve İngilizce

BİLİMSEL ETKİNLİKLER

ALDIĞI BURSLAR

- Milli Eğitim Bursu (2002-)
- NATO Bursu (Aralık 2003 – Nisan 2006)

PROJELER

- **01/2004 – 77** : Tavşan İzole Mide Fundusunda Kolinerjik Aşırım Üzerine Nikotinin Etkisi : Ksantin / Ksantin Oksidaz Sistemi ve Allopürinol'ün Rolü.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

22.12/2003

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/ 94/17697
KONU:

Sayın

Prof.Dr.Yusuf SARIOĞLU
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-03.027 kod numaralı ve "*İzole tavşan mide fundusunda kolinerjik aşırım üzerine nikotin'in etkisi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ve allopurinol'ün rolü*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanmıştır.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

I certify that the research project numbered G.Ü.ET-03.027 and entitled "*Effects of nicotine on cholinergic transmission in isolated rabbit gastric fundus strips: Possible role of xantine/xantine/oxidase system and allopurinol*" is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

Prof.Dr.Emin TÜRKÖZ
Gazi Üniversitesi
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı