

TASTROMİN'İN FARMAKOLOJİK ETKİLERİ

Rana BEİS

Doktora Tezi

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji Anabilim Dalı
Ekim – 2000**

Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

Yardımcı Danışman: Yard.Doç. Dr. Zerrin İNCESU

90228

**Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca Desteklenmiştir.
Proje No: 99 03 13**

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

**TASTROMİN'İN
FARMAKOLOJİK ETKİLERİ**

Rana BEİS

Doktora Tezi

JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Rana BEİS' in " Tastromin' in Farmakolojik Etkileri " başlıklı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalındaki, Doktora tezi 27.10.2000 tarihinde, aşağıdaki juri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

ÜYE (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK



ÜYE : Prof.Dr. Melih ALTAN



ÜYE : Prof.Dr. Kevser EROL



ÜYE : Doç.Dr. Süleyman AYDIN



ÜYE : Yard.Doç.Dr. Zerrin İNCESU



Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 18.10.2000 tarih ve 36 Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

**Enstitü Müdürü
Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK**



ÖZET

Doktora Tezi

TASTROMİN'İN FARMAKOLOJİK ETKİLERİ

RANA BEİS

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK
2000

Geçmişte tastrominin, sempatik (adrenerjik) sistem üzerine etkileri nedeniyle incelendiği bilinmektedir. Ancak adrenerjik sistemdeki spesifitesi belirli değildir. Son yıllarda değişen adrenerjik reseptör bilgileri ışığında tastrominin farmakolojik etkilerinin araştırılması bu tez kapsamında amaçlanmıştır.

Bu tez kapsamında tastrominin çeşitli izole organlardaki etkileri ile bazı in vivo deney sistemlerindeki aktiviteleri ele alınmıştır. Bu çalışmada kullanılan izole organlar α_1 -adrenerjik reseptör baskınlığına göre α_{1A} -adrenerjik reseptör için sıçan vas deferens, α_{1B} -alttipi için sıçan dalak ve α_{1D} -adrenerjik reseptör alttipi için ise sıçan aortası olarak seçildi. Bu organların dışında ileumla da çalışıldı. Tastromin'in adrenerjik reseptörler üzerindeki spesifitesini belirlemek için; KCl'de tıpkı NA gibi bu dokularda agonist olarak kullanıldı.

Bulgularımıza göre; tastromin spesifik bir adrenerjik reseptör blokeri gibi gözükmemektedir. Çünkü yukarıda belirtilen izole organların hiç birinde NA ile kompetitif bir etkileşim göstermemiştir. Tastromin'in NA cevaplarını olduğu gibi tüm çalışılan dokularda KCl ve ileumda Ach yanıtlarını da düşürmesi etkisinin non-spesifik olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca tastromin'in sıçan dalağında kontraktıl yanıtlara neden olduğu görülmektedir. Yapılan analjezi deneylerinde tastrominin ağrı ve analjezi mekanizmalarından daha farklı noktaları etkilediği görüldü. Akut toksisitesi ise nispeten yüksek bulundu.

Sonuç olarak, tastrominin deneysel farmakoloji açısından ilginç etkilerinin bulunmasına karşın, akut letal toksisitesinin de düşük olmaması nedeniyle terapötik açıdan yeni bir indikasyon alanının olamayacağı söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Tastromin, α_1 -adrenoseptör, aorta, vas deferens, dalak

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF TASTROMINE

RANA BEİS

**Anadolu University
Graduate School of Health Sciences
Pharmacology Program**

**Supervisor: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK
2000**

It has been long known that tastromine had been investigated in the pharmacological history due to its effects on the adrenergic system. In this thesis, it was aimed to investigate pharmacological activities of tastromine on the basis of adrenoceptor knowledge that has been changed in recent years.

Effects of tastromine were evaluated on various isolated organs and certain experimental systems *in vivo*. In regard to α_1 -adrenoceptor predominancy, isolated organs used in this study were selected as rat vas deferens, spleen and aorta for α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1D} -adrenoceptors, respectively. In addition to these tissues, rat ileum was also employed. Like NA, KCl was used as an agonist in these tissues, in order to determine the specificity of tastromine on adrenoceptors.

According to our findings, tastromine does not seem to be a specific adrenoceptor blocker, since it exhibited no competitive interaction with NA on the isolated tissues mentioned above. As in the case of responses to NA, the decreased responses to KCl in all isolated tissues and Ach in rat ileum suggested that, its effect is non-specific in nature. Furthermore, it was observed tastromine causes contractile responses in rat spleen. In analgesia experiments, tastromine affected sites other than those involved in pain and analgesia mechanisms. Its acute lethal toxicity was found relatively high.

In conclusion, although tastromine exhibits interesting effects in terms of experimental pharmacology, it can be said that it may not have a new therapeutic implication since it does not have a low toxicity.

Keywords: Tastromine, α_1 -adrenoceptor, aorta, vas deferens, spleen

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında yakın ilgisi ve yapıcı eleştirileri ile deneysel farmakoloji alanında gelişmeye olanak sağlayan, bilgi ve desteğini esirgemeyen hocam, danışmanım, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü, Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e,

Bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmesine imkan sağlayan hocam, Eczacılık Fakültesi Dekanı ve Merkez Müdürü, Prof.Dr. K.Hüsnü Can BAŞER'e,

Deney çalışmalarında bilgi ve görüşlerini esirgemeyen hocam, Doç.Dr. Süleyman AYDIN'a,

Çalışmalarında kullanılan tastromin'in sentezini gerçekleştiren Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Şeref DEMİRAYAK'a,

Çalışmalarım sırasında değerli yardımlarını esirgemeyen Arş. Grv. Tuba DEMİR, Arş. Grv. Devrim TOPBAŞ ve TBAM'daki çalışma arkadaşlarıma,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tastrominle Önceden Yapılmış Çalışmalar.....	2
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	3
2.1. Otonom Sinir Sisitemi.....	3
2.1.1. Parasempatik Sinir Sistemi.....	4
2.1.1.1. Parasempatik Sistem Sinaps, Kavşak ve Nörotransmitterleri.....	4
2.1.1.2. Parasempatik Sistem Reseptörleri ve Altipleri.....	5
2.1.2. Sempatik Sinir Sistem.....	9
2.1.2.1. Sempatik Sistem Sinaps ve Kavşakları.....	9
2.1.2.2. Sempatik Sistem Nörotansmitterleri ve Salınımı.....	10
2.1.2.3. Sempatik Sistem Reseptörleri ve Altipleri.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	32
3.1. Materyal.....	32
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. İn vitro DeneYler	33
3.2.1.1. İzole Organ Banyosu DeneYleri.....	33
3.2.2. İn vivo DeneYler.....	34
3.2.2.1. Kan Basıncı DeneYleri.....	34
3.2.2.2. Analjezi DeneYleri	35
3.2.2.3. Akut Toksisite DeneYleri.....	35
3.2.3. İstatistik ve Veri Analizi.....	35

4. BULGULAR	38
4.1 İn vitro Deneyler.....	38
4.1.1. İzole Organ Banyosu Deneyleri.....	38
4.1.1.1. Aorta Deneyleri.....	38
4.1.1.2. Vas deferens Deneyleri	39
4.1.1.3. Dalak Deneyleri	39
4.1.1.4. İleum Deneyleri	40
4.2. İn vivo Deneyler.....	41
4.2.1. Kan Basıncı Deneyleri	41
4.2.2. Analjezi Deneyleri	41
4.2.3. Akut Toksikite Deneyleri.....	41
4.3. Şekiller ve Tablolar.....	42
5. TARTIŞMA	52
6. KAYNAKLAR	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sinir sistemi sınıflandırması	3
Şekil 2.2. Adrenerjik reseptörlerin şematik sınıflandırması	13
Şekil 2.3. Bir diğer α_1 -adrenerjik reseptör sınıflandırması	17
Şekil 2.4. α_1 -Adrenerjik reseptörlerin sinyal iletim mekanizmaları	20
Şekil 4.1. Sıçan aortasında tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında noradrenalin yanıtları	42
Şekil 4.2. Sıçan aortasında tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında KCl yanıtları	42
Şekil 4.3. Sıçan aortasında propranolol (10^{-6}) + desipramin (10^{-7}) varlığında ve yokluğunda noradrenalin yanıtları	43
Şekil 4.4. Sıçan aortasında propranolol (10^{-6}) + desipramin (10^{-7}) ve tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında ve yokluğunda noradrenalin yanıtları	43
Şekil 4.5. Sıçan aortasında BMY 7378 varlığında ($10^{-7}M$, $10^{-5}M$) varlığında noradrenalin yanıtları	44
Şekil 4.6. Sıçan vas deferensinde tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında noradrenalin yanıtları	44
Şekil 4.7. Sıçan vas deferensinde propranolol (10^{-6}) + desipramin (10^{-7}) ve tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında ve yokluğunda noradrenalin yanıtları	45
Şekil 4.8. Sıçan vas deferensinde propranolol (10^{-6}) + desipramin (10^{-7}) varlığında ve yokluğunda noradrenalin yanıtları	45
Şekil 4.9. Sıçan vas deferensinde WB4101 ($10^{-8}M$, $10^{-7}M$) varlığında noradrenalin yanıtları	46
Şekil 4.10. Sıçan vas deferensinde tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında KCl yanıtları	46
Şekil 4.11. Sıçan dalağında tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında KCl yanıtları	47
Şekil 4.12. Sıçan dalağında tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında NA yanıtları	47

Şekil 4.13. Sıçan dalağında kloroetilklonidin(CEC) ($10^{-6}M$, $10^{-4}M$) varlığında noradrenalin yanıtları	48
Şekil 4.14. Sıçan dalağında prazosin ($10^{-7}M$, $10^{-5}M$) varlığında tastromin yanıtları	48
Şekil 4.15. Sıçan ilumunda tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında Ach yanıtları	49
Şekil 4.16. Sıçan ileumunda tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında KCl yanıtları	49
Şekil 4.17. Sıçanlarda tastrominin meydana getirdiği kan basıncı değişimi	50

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 4.1. Agonistlerin sıçan aorta, vas deferens, dalak ve ileumundaki afinite konstantları (pD2 değerleri \pm SEM, n: deney sayısı)	51
Tablo 4.2. Tastromin'in çeşitli agonistlere karşı sıçan aorta, vas deferens, dalak ve ileumundaki inhibitör etkisi için afinite konstantları (\pm SEM, n: 5)	51
Tablo 4.3. Sıçan aortunda Propranolol (10^{-6}) + Desipramin (10^{-7}) varlığında ve yokluğunda NA agonist afinite konstantları	52
Tablo 4.4. IUPHAR'ın reseptör sınıflandırmasına göre deney organı olarak seçilen orgablarda alt reseptörlere spesifik antagonistlerin etkilerine ilişkin afinite konstantları	52
Tablo 4.5. Sıçan vas deferensinde Propranolol (10^{-6})+Desipramin (10^{-7}) varlığında ve yokluğunda NA agonist afinite konstantları	52
Tablo 4.6. Sıçan dalağında kontraktıl tastromin yanıtlarına karşı prazosinin antagonistik etkisine ilişkin afinite konstantı (pD' ₂ \pm SEM, n:5)	53
Tablo 4.7. Tastrominin farelerde akut toksisite sonuçları	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ach	: Asetilkolin
NA	: Noradrenalin
IP₃	: İnositol trifosfat
DAG	: Diaçilgliserolü
ATP	: Adenozin trifosfat
TH	: Tirozin Hidroksilaz,
DO	: Dopadekarboksilaz,
DBH	: Dopamin β -hidroksilaz
FNMT	: Feniletanolamin N-metiltransferaz
MAO	: Monoaminoksidaz
KOMT	: Katekol-O-metiltransferaz
CEC	: Kloroetilklonidin
pD₂ =	Agonist afinite konstantı
pD'₂ =	Non-kompetitif antagonist afinite konstantı
pA₂ =	Kompetitif antagonist afinite konstantı

GİRİŞ VE AMAÇ

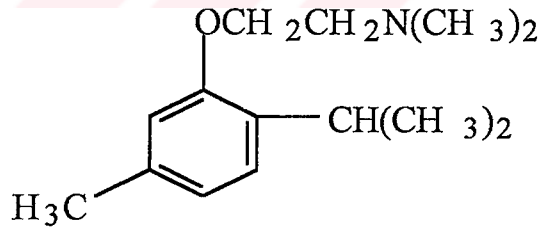
Kalp-damar hastalıkları günümüzün en yaygın sağlık problemlerinden birisidir. Çeşitli bileşikler kalp-damar hastalıklarının tedavisi için sentezlenmekte ve ilaç haline getirilmektedir. Her geçen gün kalp-damar hastalıklarının tedavisi için yeni maddeler sentezlenmekte ve geliştirilmeye çalışılmaktadır. Ayrıca kullanımdan kalkmış bazı kimyasal maddeler ve ilaçlar günümüzdeki gelişmelerin ışığında tekrar değerlendirmeye alınmaktadır (reevaluation). Yeniden değerlendirme çalışması, kullanımdan kalkan ilaçların yeniden kazanılmasına imkan vermekte ve yapı-etki ilişkileri ile yeni ilaçların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Örneğin bir uyku ilacı olan Talidomid teratojenik etkisi nedeniyle 1960'lı yıllarda piyasadan çekilmiştir, ancak 1990'ların sonlarına doğru lepra komplikasyonlarının tedavisinde önemli bir yeri olduğu gerçekleştirilen 'reevaluation' çalışmalarıyla anlaşılmıştır (Medical Science Bulletin). Tez konusu olan tastromin de geçen zaman içerisinde kullanımı ortadan kalkmış bir maddedir.

Kullanımda olduğu yıllarda yapılan çalışmalarda tastrominin kan basıncını düşüren bir bileşik olduğu düşünülmüştür. Tastrominin bu etkiyi alfa-adrenerjik reseptörleri etkileyerek sempatotik etki ortaya çıkaran ve bu yolla kan basıncını düşüren bir bileşiktir. Tastrominin ilk incelendiği yıllarda alfa-adrenerjik reseptörler hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıydı. Son on yıl içinde alfa-adrenerjik reseptörlerin klasifikasyonu ve farmakolojisi hakkında büyük gelişmeler olmuş ve alt reseptör klasifikasyonu genişlemiştir (Vargas and Gorman 1995, Graham 1996, IUPHAR 1998). Ancak tastrominin bu klasifikasyondaki durumu belirsizdir.

Bu çalışmada ile tastrominin çağdaş alfa-adrenerjik reseptör klasifikasyonundaki yeri belirlenmeye çalışılacak ve yeniden bir değerlendirme potansiyeli doğacaktır. Belirtilen amaç doğrultusunda alt reseptör klasifikasyonunda kullanılan maddeler (WB4101, CEC, BMY 7378 vb.) test edilecektir. Etkiler bulunduktan sonra kantitatif doz-etki ilişkisi kurularak, daha ileri bir karakterizasyon sağlanmaya çalışılacaktır. Bu çalışma ilaç geliştirme aşamasının ilk basamağını oluşturacaktır.

1.1 Tastrominle Önceden Yapılmış Çalışmalar

Tastromin (N, N-dimetil-2(2-isopropil-5-metilfenoksi)etilamin), ilk kez Japon araştırmacılar tarafından sentezlenmiş ve ergotamin benzeri etkili olduğu bulunmuştur (Okazaki, 1932). *In vivo* çalışmalarda, tavşanlarda adrenalinin dalak kastırıcı etkisini antagonize ettiği (Bun-ichi 1936), uterus kontraksiyonunda etkili olduğu (Kuroda and Koyoma, 1951), *in vitro* kobay ileumunda antispazmodik ve antihistaminik etkileri (Reinhard et al, 1951) görülmüştür. Santral sinir sistemi üzerindeki etkileri (Buzas et al, 1960) ve santral depresan etkileriyle birlikte sempatolitik etkileri *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir (Credner, 1960; Credner and Graebner, 1967). Credner tarafından yapılan çalışmada, tastrominden çok türevleri üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmada; kan basıncı üzerindeki etkileri bildiren bulgular belirtilirken çalışılan türevler arasında tastromin gösterilmemiştir. Farelerde LD₅₀ değeri 600mg/kg subkutan (s.c.) olduğu bildirilmektedir. Son olarak Aydın ve arkadaşları tarafından bir çalışma yapılmıştır. Ancak bu çalışmada da detaya inilmemiştir (Aydın et al, 1995). Merck İndex'in eski baskılarında yer almış (Merck Index, 1983) fakat sonraki Merck İndexlerde yer almadığı görülmüştür (Merck Index, 1989).



TASTROMİN

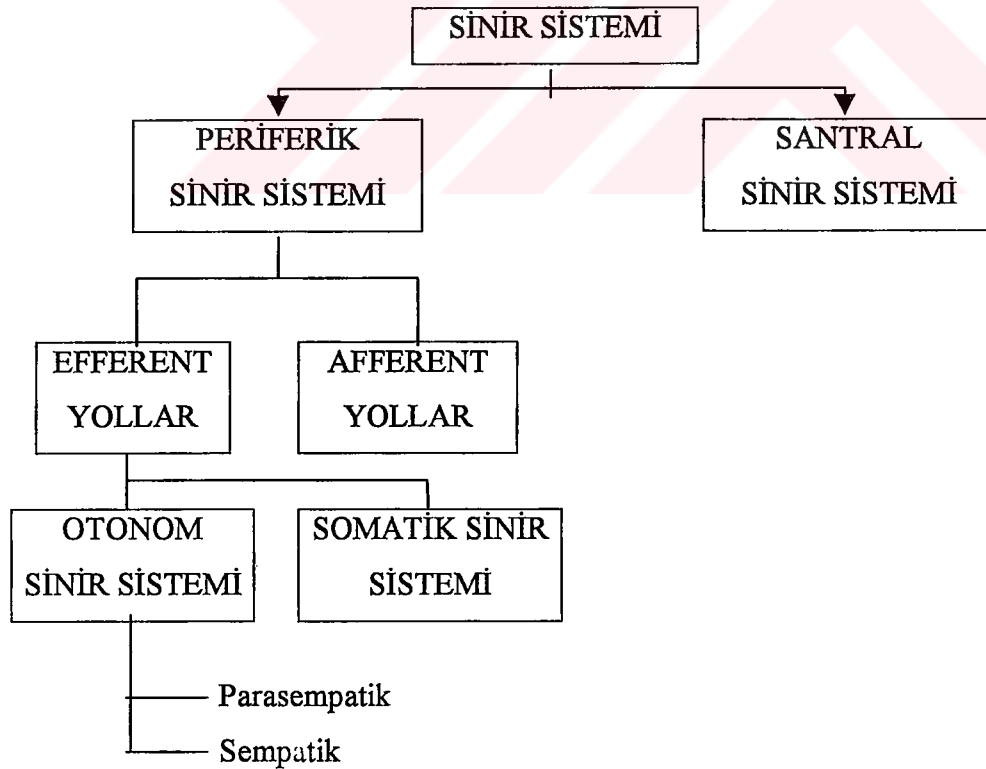
2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Otonom Sinir Sistemi ve Adrenerjik Sistem

Sinir sistemi, organizmadaki bütün organların ve fizyolojik olayların düzenini ve birbiriyle uyum içerisinde çalışmasını sağlar. Sinir sistemi esas olarak iki anatomik bölüme ayrılmıştır. Birinci bölüm beyin ve omuriliğin oluşturduğu santral sinir sistemi, ikinci bölüm beyin ve omuriliğin dışında bulunan ve santral sinir sistemine giren ve çıkan tüm nöronlardan oluşan periferik sinir sistemidir. Bu sınıflandırma şekil 1’de gösterilmektedir.

Periferik sinir sistemi de, uyarıları beyin ve omurilikten periferik dokulara taşıyan afferent nöronlar ile periferden santral sinir sistemine bilgi taşıyan efferent nöronlardan oluşur. Periferik sinir sisteminin efferent bölümü, somatik ve otonomik sinir sistemi olarak iki fonksiyonel alt gruba ayrılabilir. Somatik sistem, iskelet kaslarının kasılması gibi istemli fonksiyonları sağlar.

Otonom sinir sistemi fonksiyonları, bilinç düzeyine ulaşmadan vücudun günlük ihtiyaçlarını düzenler.



Şekil 2.1. Sinir Sistemi Sınıflandırması (Mycek, *et al.*, 1998)

2.1.1. Parasempatik Sinir Sistemi

Parasempatik sistemin birinci sıra nöronları, sempatik bölümün aksine santral sinir sisteminde tek bir yerde kesintisiz bir şekilde toplanmamışlardır. Mezensefelon, bulbus (medulla oblongata) ve omuriliğin sakral kısmı olmak üzere üç ayrı yerde bulunurlar. Parasempatik sistemin kraniyal bölümünden çıkan birinci sıra aksonlar, baş-boyun bölgesindeki organların (göz, tükürük bezleri ve mukozaların salgı bezleri gibi), göğüs ve karın boşluğundaki organların (kalp, bronşlar ve mide-barsak kanalı ve ekleri gibi) çalışmasını düzenler. Bu aksonlar, anılan organların yanında veya dokusu içinde bulunan parasempatik gangliyonlarda sonlanır (Kayaalp, 1998, Goodman and Gillman's 1996).

Parasempatik gangliyon oluşturan parasempatik ikinci sıra nöronların aksonları genellikle çok kısıdırlar ve yanında veya içinde buldukları organların efektör hücreleri ile kavşak yaparlar. Parasempatik gangliyonların çoğu innerve ettikleri organın üzerinde veya dokusu içinde yaygın bir pleksus yaparlar. Örneğin mide ve barsakların düz kaslarını innerve eden parasempatik gangliyonlar esas olarak, bu yapıların longitudinal ve sirküler düz kas tabakaları arasında yerleşmiş olan miyenterik pleksustan ibarettir (Kayaalp, 1998, Ganong, 1998).

Sempatik ve parasempatik sinir sistemi çoğunlukla birbirini dengeleyecek şekilde çalışırlar. Parasempatik sistem dinlenme ve sindirim durumlarında baskındır. Sempatik sistemden farklı olarak parasempatik sistem her bir organ sistemini ayrı ayrı uyaraabilecek şekilde aktive olabilmektedir. Böylece; parasempatik liflerin ayrı ayrı aktivasyonu, sistemin mide veya göz gibi spesifik organları ayrı ayrı etkileyerek çalışmasını sağlamaktadır (Mycek *et al.*, 1998).

2.1.1.1. Parasempatik Sistemin Sinaps, Kavşak ve Nörotransmitterleri

Otonom sinir sisteminde hem sempatik hem de parasempatik gangliyonlardaki sinaptik aşırımdan sorumlu reseptörler nikotinik tipteki kolinerjik reseptörlerdir ve impuls aşırımından sorumlu nörotransmitter asetilkolindir (Ach). Parasempatik sistemde efektör hücrelerdeki kolinerjik reseptörler muskarinik tiptedir. Bu reseptörler, muskarin alkaloidi tarafından aktive edilirler ama nikotinik reseptörler muskarinden etkilenmezler.

Nörotransmitter: Ach, kolinerjik nöronların terminal düğümlerindeki küçük veziküller içinde yüksek yoğunlukta bulunur. Otonom sinir lifleri salıverdıkları nörotransmitterin kimyasal yapısına göre iki gruba ayrılabilirler. İletiyi Ach sağlıyorsa nöron kolinerjik olarak adlandırılır. Ach hem sempatik hem de parasempatik sinirlerin gangliyonlarında iletiyi sağlar. Ayrıca adrenal medullada nörotransmitter Ach'dir. Parasempatik sisteminin postgangliyonik sinirleri ile efektör hücreler arasındaki iletiye Ach sağlar (Mycek et al, 1998, Ganong, 1999).

Ach, kolinerjik sinir uçlarından kolinin enzimatik asetilasyonu ile sentezlenir. Bu olayı **kolin asetiltransferaz** enzimi katalize eder. Asetil kaynağı, sinir ucundaki mitokondirilerde sentezlenen asetilkoenzim A'dır. Kolin ise sinaps aralığında yıkılan Ach'den oluşan, diyetle alınan ve vücutta yıkılan fosfolipidlerden elde edilir. Aktif transport suretiyle sinir ucuna alınır. Ach eliminasyonu, sinaps veya kavşak aralığında bol miktarda bulunan **asetilkolinesteraz** enzimi tarafından hidroliz edilerek asetik asit ve koline dönüştürülerek gerçekleştirilir (Ganong, 1999; Kayaalp, 1998).



2.1.2.2. Parasempatik Sistem Reseptörleri ve Altipleri

Kolinerjik Reseptörler; Kolinerjik reseptörler farmakolojik özellikleri esas alınarak iki ana tipe ayrılırlar. Ach'in otonom sinir sistemi ile ilgili nöronlar ve efektör hücreler üzerindeki etkisine, birbirinden çok farklı yapıda reseptörler olan nikotinik ve muskarinik reseptörler aracılık ederler. Amanita muscaria adlı mantardan elde edilen muskarin, otonom gangliyonlar üzerinde az bir etkiye sahip olmasına rağmen düz kaslar ve salgı bezlerinde Ach'nin uyarıcı etkisini taklit eder. Bu nedenle Ach'in bu etkilerine aracılık eden reseptörlere **muskarinik reseptörler** denir. Atropin Ach'nin bu etkilerini bloke eder.

Sempatik gangliyonlarda az miktarda Ach postgangliyonik nöronları uyarırken fazla miktardaki Ach pregangliyonik nöronlardan postgangliyonik nöronlara impuls aşırımını bloke eder. Atropin ile değişmeyen bu etkiler nikotin tarafından taklit edilir. Ach'nin bu etkilerine nikotinic etkiler ve bu etkilere aracılık eden reseptörlere de **nikotinic reseptörler** denir.

Nikotinic reseptörler yapıcı ligandla açılıp kapanan katyon kanallarıdır. Muskarinic reseptörler ise otonom sinir sistemi ile ilişkili α ve β adrenerjik reseptörler gibi G proteini (GTP bağlayan düzenleyici protein) ile kenetli reseptörler süperailisine aittir ve yapıcı 7 transmembranal segmentli bir proteindir (Ganong, 1999, Kayaalp, 1998).

Nikotinic Reseptörler ve Alt Tipleri: Nikotinic tipteki kolinerjik reseptörlerin yapısı ilk olarak Electrophorus ve Torpedo türü elektrik balıklarının elektrik organından saflaştırılarak elde edilmesi sonucunda detaylı bir şekilde incelenmiştir. Sonrasında çizgili kaslardaki, otonom gangliyonlardaki ve santral sinir sistemi nöronlarındaki nikotinic reseptör tiplerinin yapısı aydınlatılmış, alt birimlerinin sentezini düzenleyen genlerin cDNA'sı yapılmış ve alt-birimler klonlanmıştır (Kayaalp, 1998).

Nikotinic reseptör proteini 5 alt birimden meydana gelen pentamerik bir yapıya sahiptir. Bu 5 alt birim hücre dışında geniş, hücre zarı içine girdikçe daralan bir kanal çevresinde hemen hemen simetrik yerleşirler. Bu kanal bir katyon kanalıdır. Aslında Na^+ , Ca^{2+} ve K^+ u geçirmekle beraber Ach ile aktive edilip açıldığında Na^+ kanalı gibi çalışır ve Na^+ hücre içine girişi depolarizasyona yol açan bir potansiyel meydana getirir. Reseptörün yerine ve tipine göre içerdiği alt-birim türleri değişkenlik gösterir. Ör: Gangliyonik nikotinic reseptörler α_3 ve β_4 alt birimlerinden oluşan bir pentamerdir.

Çizgili kasların nöromusküler kavşaklardaki nikotinic reseptörlerin ve otonomik gangliyonlarla adrenal medullanın kromafin hücrelerindeki nikotinic reseptörlerin belirli blokör ilaçlara karşı duyarlılığının farklı olmasına bakarak; nikotinic reseptörlerin çizgili kas tipi ve gangliyon tipi nikotinic reseptörler olmak üzere iki alttipi belirlenmiştir. Sonra santral sinir sistemi nöronlarında nöronal reseptörler ve α_7 nöronal reseptörler tanımlanmıştır (Kayaalp, 1998, Ganong, 1998).

Muskarinik Reseptörler ve Alt Tipleri: Periferde Ach salınımı ya iyonotropik nikotinik reseptörlerin yada metabotropik muskarinik reseptörlerin aktivasyonuna neden olur. Memeli santral sinir sistemi nöronlarında hem nikotinik hem de muskarinik reseptör alttipleri mevcuttur. Muskarinik reseptörler, diğer etkilerinin yanısıra periferde düz kas kasılmasına, glandular sekresyona, kardiak atım hızı ve kasılma gücünün modülasyonuna aracılık ederler. Santral sinir sisteminde motor kontrol, sıcaklık düzenlenmesi, kardiyovasküler regülasyon ve bellek fonksiyonlarında muskarinik reseptörlerin rol oynadığına dair kanıtlar vardır. Alzheimer, Parkinson, astım hastalıkları idrar kesesi, kalp ve barsak motilite bozuklukları ile analjezi gibi fizyopatolojik durumlar için selektif maddeler ile yapılan ilaç geliştirme çalışmaları, vücudun farklı bölümlerindeki muskarinik reseptörlerin sınıflandırma çalışmalarını hızlandırmıştır. Barlow ve arkadaşları (1976) ileal ve atrial muskarinik reseptörlerin farmakolojik özelliklerinde önemli farklılıklar göstermişlerdir. Ayrıca, peptik ülser tedavisinde pirenzepinin kullanılması muskarinik reseptör alttiplerinin araştırılmasında önemli rol oynamıştır (Caulfield and Birovall, 1998, Eglen *et al.*, 1996).

Moleküler klonlama teknikleriyle beş farklı gende beş tip muskarinik reseptör klonlanmıştır. Selektif antikorların kullanımı, muskarinik reseptör alttip proteinlerinin lokalizasyonuna izin vermiştir. Muskarinik reseptör alttipleri M_1 , M_2 , M_3 , M_4 ve M_5 olarak adlandırılmıştır. Bütün muskarinik reseptörler G proteinleri aracılığıyla etki eden yedi transmembranal tipte reseptörlerdir.

Muskarinik reseptör alttiplerinin cDNA'ları belirlenmiş ve farmakolojik olarak M_1 , M_2 , M_3 ve M_4 muskarinik reseptörler tanımlanmıştır. Ancak M_5 gen ürününün farmakolojik olarak tanımlanmış reseptörlerle arasındaki ilişki açıklanmayı beklemektedir (Ganong, 1999, Caulfield and Birovall, 1998; Goodman and Gillman's, 1996).

M_1 reseptörler, gangliyonlar ve çeşitli salgı bezlerinde, beyinde öğrenme ve bellekle ilgili kolinerjik yolakların ucundaki sinapsların postsinaptik membranında, sempatik ve parasempatik gangliyon hücrelerinde ve ayrıca mide-barsak kanalı duvarında bulunurlar. Sempatik ve Parasempatik gangliyon hücrelerinde de gangliyonik aşırımı sağlayan yavaş depolarizasyondan sorumludurlar. Pirenzepin ve Telenzepin selektif antagonistleriyken, selektif

agonisti yoktur. Arekolin, izoarekolin, oksotremorin, McNA-343 ve RS86 parsiyel agonisttirler (Kayaalp, 1998, Caulfield and Birovall., 1998).

M₂ reseptörler, dominant olarak miyokarda ve düz kas hücrelerinde bulunurlar. Ayrıca atrial kas, sinus düğümü, iletim sisteminde ve bütün muskarinik reseptör alttipleri gibi beyinde yer alır. Nöroefektör kavşaklardaki kolinerjik ve adrenerjik sinir uçlarında bulunan adrenalin ve noradrenalinin (NA) salınımını inhibe eden presinaptik reseptörlerde birçok yerde M₂ reseptörlerinin özelliklerini gösterirler. Otonomik gangliyonlarda kolinerjik uçlardan Ach salıverilmesini frenleyen presinaptik otoreseptrler de M₂ reseptörlere benzer. Kalpteki parasempatik kolinerjik uçların otoreseptrü M₁ reseptörlerdir. Selektif antagonistleri tripitramindir, selektif agonistleri ise yoktur. (Kayaalp, 1998; IUPHAR 1998)

M₃ reseptörler, farklı düz kaslarda oldukları ileri sürülmektedir. Zamifenasin ve darifenasin gibi maddelerle yapılan çalışmalarda M₃ muskarinik reseptörlerin varlığı trakeada, ileum ve mesane düz kası gibi çeşitli dokularda belirlenmiştir. Ekzokrin salgı bezi hücrelerinde bulunurlar. Fakat beyin nöronlarındakilerin fonksiyonları halen bilinmemektedir. Selektif antagonisti darifenasindir. Selektif agonisti ise yoktur. (Kayaalp O., 1998, Caulfield and Birovall, 1998)

M₄ reseptörlerin, tavşan anakoksigeus kasında histaminle kasılmış kasta muskarinik agonistlerle gevşetilmesine aracılık ettiği gösterilmiştir. Muskarinik agonistler bu gevşemeyi inhibe eder. Otonomik gangliyonlarda ve önbeyinde bulunmuştur. Selektif agonisti yoktur. Antagonisti ise PD102807 ve MT3'dür. (Gross *et al*, 1997, Kayaalp, 1998, IUPHAR, 1998)

M₅ reseptörler, beyinde ve periferde mRNA'ları ve M₅ proteinin varlığına dair kanıtlar olmasına rağmen M₅ reseptörlerin bulunduğu dokularda göstermek mümkün olmamıştır. M₅ reseptörünün karakterizasyonu hala tamamlanmamıştır. Henüz selektif bir agonist veya antagonist bildirilmemiştir (Kayaalp, 1998, IUPHAR 1998).

Transdüksiyon Mekanizmaları; Kolinerjik muskarinik reseptörler G proteini aracılığı ile etki gösteren serpentin tip reseptörlerdir. G proteinleri aracılığı ile adenilil siklaz, K⁺ kanalları veya fosfolipaz C ile eşleşirler. M₁, M₃ ve

M₅ alttipleri G_{q/11} tipi G proteinleriyle kenetlenirler. G_{q/11} tip G proteinler inositol trifosfat (inositol-1,4,5-trifosfat=IP3) ve diaçilgliserolü (DAG) aktive ederek etki oluştururlar. IP3, endoplazmik retikulumdaki Ca²⁺ depolarından intraselüler Ca²⁺ salınımını aktive ederek bu reseptörlerin sekresyon ve düz kasların kasılma cevabına aracılık ederler. DAG ise proteinkinaz-C'yi aktive eder.

M₂ ve M₄ reseptörler farklı bir G proteine, Gi ve Go kenetlenirler. Bu grup G proteinler, belirli hücre tiplerinde voltaja-bağlı Ca²⁺ kanallarını baskılayarak ve reseptör-işletimli K⁺ kanallarını aktive ederek ve adenil siklazı inhibe ederek etkiye aracılık ederler.

M₂ reseptörlerin aktivasyonu düz kaslarda K⁺ kondüktansını artırarak yada voltaja-bağlı Ca²⁺ kanallarını inhibe ederek ve adenil siklazı inhibe ederek inhibisyona neden olur (Goodman & Gillman's, 1996, Caulfield and Birovall, 1998, Kayaalp, 1998).

2.1.2. Sempatik Sinir Sistemi

2.1.2.1. Sempatik Sistem Sinaps ve Kavşakları

Adrenerjik sistem olarak da adlandırılan sempatik sistem, nöronal ve endokrin olmak üzere iki bölümden oluşur. Bu nedenle adrenerjik sisteme, **sempatoadrenal sistem** de denir.

Sempatik sistemin birinci sıra nöronları, omurilikte birinci torasik segmentten lumbar 2. veya 3. segmente kadar olan segmentlerin lateral boynuzunda bulunur. Bu nöronların ön kökten çıkan aksonları spinal sinir hizasında ondan ayrılarak paravertebral veya prevertebral sempatik gangliyonlara giderek orada gangliyon hücreleri ile sinaps yaparak sonlanır. Gangliyon hücreleri sempatik sistemin ikinci sıra nöronlarının somasını oluşturur. Sempatik gangliyonlardan çıkan ikinci sıra nöron aksonları hedef organlar ve yapılardaki efektör hücrelerde **nöroefektör kavşak** yaparak sonlanırlar.

Sempatik sinir sisteminde, birinci sıra nöronların aksonları (pregangliyonik aksonlar) kısa, ikinci sıra nöronların aksonları (postgangliyonik aksonlar) uzundur. Terminal gangliyonlar bir istisna oluştururlar, bu gangliyonlar

pelviste ürogenital sistem organlarının yakınında veya dokusu içerisinde yerleşmişlerdir.

Sempatik sistemin endokrin bölümünü ise adrenal medulla oluşturmaktadır. Sekresyonu sempatik pregangliyonik sinir lifleri tarafından kontrol edilen endokrin bir salgı bezi fonksiyonu gösteren adrenal medulla, embriyolojik yönden ve innervasyonu bakımından sempatik gangliyonlara benzemektedir. Adrenal medullanın fonksiyonel hücre olan kromafin hücreleri, paranöron sayılırlar ve nöronlar gibi elektriksel olarak uyarılırlar, fonksiyon yönünden ise endokrin hücrelerdir. Bu hücrelerde kromafin granüller içinde adrenalin ve noradrenalin (NA), ATP (adenozin trifosfat), kromograninler, enkefalinlerle kompleks yapmış bir şekilde içerirler. Kromafin hücrelerinin içerdiği katekolaminin % 80'i adrenalin ve % 19'u NA'ken, küçük miktarlarda dopamin ve dopaminin NA'ne dönüşümünü sağlayan dopamin β -hidroksilaz gibi maddeler de içerirler (Kayaalp, 1998 ; Ganong, 1999, Vander, 1994).

2.1.2.2. Sempatik Sistem Nörotansmitterleri ve Salınımı

Sempatik ve parasempatik sinir sisteminin presinaptik aksonlarından salınan nörotransmitter asetilkolindir. Sempatik sistemin nörofektör kavşaklarında ise impuls aşırımını sağlayan nörotransmitter **noradrenalin**'dir. NA, nörofektör kavşaklarda, kavşak sonrası membran üzerinde yerleşmiş olan adrenerjik reseptörleri aktive ederek impuls aşırımını sağlar. Adrenerjik reseptörlerin α ve β olmak üzere iki tipi, ayrıca onların da çeşitli alttipleri vardır.

Kalp, damar gibi bazı yapıların noradrenerjik sinir uçlarında NA yanısıra ko-transmitter olarak nöropeptid-Y'de bulunmaktadır. Diğer bazı yapılarda (vas deferens ve bazı damarlar vb.) noradrenerjik sinir uçlarından fonksiyonel bir ko-transmitter olan ATP salınır. ATP, noradrenerjik sinir uçlarında NA depolanmasında da rol almaktadır.

NA, adrenalin ve dopamin, hepsi katekol halkası ve bir amin grubu içerirler ve bu nedenle katekolaminler olarak adlandırılırlar. NA, santral ve periferik sinir sisteminde önemli rol oynar ve yaygın olarak yer alır. Buna karşılık adrenalin, sinir sisteminde yaygın bir şekilde yer almaz. Fakat adrenal medulladan

salınan esas hormon adrenalindir (Goodman & Gillman's 1996, Kayaalp, 1998, Vander *et al.*, 1994).

NA'nin tirozinden sentezlendiğini 1939 da Blaschko ileri sürmüştür. NA'nin biyosentez basamakları şu şekildedir:



TH: Tirozin Hidroksilaz, **DO:** Dopadekarboksilaz,
DBH: Dopamin β -hidroksilaz

NA sentezinde tirozinin, tirozin hidroksilaz enzimi tarafından hidroksilasyonu hız kısıtlayıcı basamaktır. Sentezin kısa süreli kontrolü oluşan NA tarafından yapılır. NA nin sitoplazmada konsantrasyonunun artması enzimin inhibisyonuna neden olur ve sentezi yavaşlatır.

NA, adrenerjik sinir uçlarında özel veziküller içinde depolanır. Bu veziküllerin bir kısmı küçük bir kısmı büyük veziküllerdir. Küçük veziküllerin sayısı daha fazladır ve NA daha çok bu veziküller içerisinde depolanır. Dört molekül NA, bir molekül ATP ile kompleks yapmaktadır. Fonksiyonu bilinmeyen kromogranin A adlı protein ile de ilişkilidirler. Adrenerjik sinir uçlarındaki büyük veziküllerde NA yanında nöropeptid Y ve diğer peptidlerde içerdiği bazı sinirlerde gösterilmiştir.

Adrenal medullada ve diğer bazı yerlerde bulunan kromafin hücrelerde de NA sentezlenir. Bu hücrelerde, adrenerjik sinir uçlarından farklı olarak NA'ni, adrenaline çeviren feniletanolamin N-metiltransferaz (FNMT) enzimi bulunur ve sentezlenen NA, adrenaline dönüştürülür. Adrenal medullada sentezlenen NA ve adrenal hormon görevi yaparlar (Ganong, 1999; Kayaalp, 1998).

Katekolaminler, otonomik sinirler ve adrenal medulla hücrelerinden ekzositozla salınırlar. Sinir ucunun depolarizasyonu, voltaja bağımlı N tipi Ca^{2+} kanallarını açarak ekstraselüler Ca^{2+} iyonu salıverilmeden sorumludur. Ca^{2+} iyonunun sinir ucuna girmesi ve aktif noktalarda konsantrasyonunun hızla ve

geçici bir süre artması bir dizi özgül proteinlerin, kinazlarla fosforilasyon sonucu kaskad şeklinde etkileşmeye yol açar ve ard arda gelişen, yavaşma, hazırlama, Ca^{2+} bağlanması, füzyon ve porus oluşumu olmak üzere bir dizi olayı meydana getirir.

Sinaptik aralığa salınan NA'nin etkisinin sona erdirilmesinde en önemli mekanizma sinir ucu tarafından geri alınmasıdır (re-uptake). NA'nin uptake'i, adrenerjik sinir ucundan yapılan nöronal uptake ve diğer hücreler tarafından yapılan ekstrasöronal uptake olmak üzere iki şekilde olmaktadır.

NA'in, sinaptik aralığa salındıktan sonra postsinaptik reseptörlere ve presinaptik reseptörlere bağlanır. Presinaptik reseptörler yada otoreseptörler nörotransmitter salınımını inhibe ederler. Adrenerjik otoreseptörler α_2 tipindedir ve NA salınımını inhibe ederler.

Nöronal uptake bir aktif transport olayıdır. Bu olayı sitoplazma membranına yerleşmiş olan NA transportörü yapar. Burada NA geri alınımı adrenaline göre daha yüksektir.

Ekstrasöronal uptake ise bir çeşit kolaylaştırılmış difüzyon ile gerçekleşir. Bu tip geri alımda adrenaline ve izoproteranole olan afinite, NA'e olandan daha fazladır.

NA'nin yıkımı, sinapslar düzeyinde **monoaminoksidaz (MAO)** ve **katekol-O-metiltransferaz (KOMT)** adlı iki enzim tarafından gerçekleştirilir. MAO, noradrenalinin adrenerjik sinir ucunda yıkılmasından, KOMT ise ekstraselüler sıvıda ve efektör hücrelerdeki yıkılmasından sorumludur. (Ganong, 1999; Kayaalp, 1998; Goodman&Gillman's, 1996).

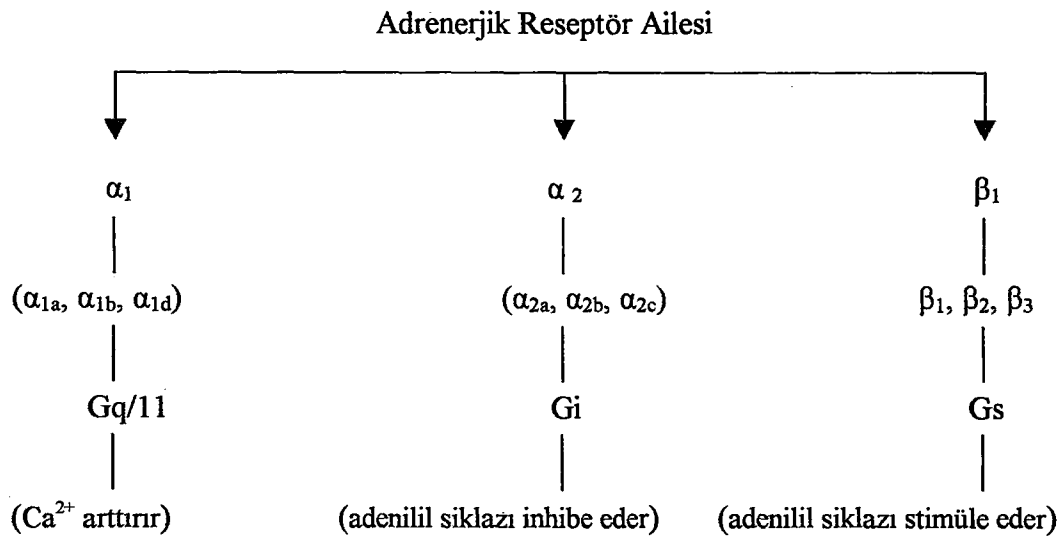
2.1.2.3. Sempatik Sistem Reseptörleri ve Altıpları

Adrenerjik reseptörler, adrenaline ve NA endojen agonistlerine cevap veren, 7 transmembranal segmentli ve G proteini ile kenetli reseptör süperailisine ait hücre membran reseptörleridir. Adrenerjik reseptör ailesi, izole dokularda yapılan farmakolojik çalışmalarla belirlendiği gibi α ve β -adrenerjik reseptörler olmak üzere iki ana tipe ayrılır (Ahlquist, 1948, Docherty, 1998).

Bu sınıflandırma α - ve β -adrenerjik reseptörlerin çeşitli agonistlere olan afinitesine bakılarak ilk kez 1948'de Ahlquist tarafından yapılmıştır. 1974'e kadar

adrenerjik reseptör sınıflandırmasında önemli bir gelişme olmamıştır. Fakat Brown ve Gillespie (1957)'nin α -adrenerjik reseptör antagonisti dibenamin ve fenoksibenzaminin kedi dalağında nörotransmitter salınımını arttırdığını gösterdikleri çalışma ve 1934'de Bacq ve Frederico tarafından yapılan benzer gözlemler bu konudaki ilk çalışmalardır. Bu bulgular, nöronal NA taşıyıcısının blokajına bağlı NA salınımının potansiyeline göre açıklandı, fakat Starke ve arkadaşları (1971); α -adrenoseptör antagonisti fentolaminin, uptake blokajından farklı bir yolla NA salınımının stimülasyonunu arttırdığını gösterdi. α - adrenoseptör agonisti ksilazin (Heise *et al.*, 1971) ve klonidinin bulunmasından sonra adrenerjik sinir terminallerinden stimülasyon sonucu NA salınımını azalttığı bulunmuştur. Bu α - agonist ve antagonistlerin etkilerine sinir terminallerinde yer alan α -adrenoseptörlerin aracılık ettiği açıktır ve bunlar presinaptik reseptörler olarak adlandırıldılar. Pre- ve postsinaptik adrenoseptörler arasında farmakolojik karakteristik farklar olduğu açıktır (Starke *et al.*, 1972, Docherty, 1998; Langer, 1999).

Adrenerjik reseptörler farmakolojileri, yapıları ve sinyal mekanizmaları açısından üç ana gruba ayrılabilirler. Herbir grubun üç veya daha fazla alttipi vardır ve G proteinine kenetli reseptör ailesinin üyeleridirler (Bylund *et al.*;1994). Sınıflandırma şekil 2'de özetlenmiştir (Zhong, and Minneman, 1999).



Şekil 2. 2. Adrenerjik reseptörlerin şematik sınıflandırması

Ahlquist'in, adrenerjik reseptörleri α ve β olarak sınıflandırmasından sonra elde edilen esas kanıt parsiyel agonist dikloroizoprenalinin β -adrenerjik reseptörlerin aracılık ettiği cevapları antagonize ettiğinin gösterilmesidir. Lands ve çalışma arkadaşlarının çalışmalarıyla 1967'de β adrenoseptörlerin iki alt tipi olduğu sonucuna ulaşıldı. β_1 -adrenoseptörler, kalp ve adipoz dokuda dominant olarak bulunur, NA ve adrenaline eşit miktarda duyarlıdır. Oysa β_2 -adrenoseptörler vasküler, uterus ve bronşiyal düz kasların gevşemesinden sorumludur ve NA'ne, adrenalinden daha az duyarlıdır (Powell and Slater, 1957., Moran and Perkins, 1958, Bylund *et al.*, 1994).

Daha sonra β -adrenoseptörler, fonksiyon çalışmaları, reseptör bağlama ve genetik teknikler kullanılarak sınıflandırıldılar. Böylece β -adrenerjik reseptör ailesi β_1 , β_2 ve atipik β_3 adrenerjik reseptörler olarak üç gruba ayrılmıştır (Strosberg and Pietri-Rouxel, 1996). İlave olarak, kardiyak dokuda putative, atipik olarak sınıflandırılan β_4 - adrenerjik reseptör alttipi tanımlanmıştır (Kauman, 1997).

α -Adrenerjik reseptör alttipleri; Katekolaminlerin farklı etkilerini ve bunlarla ilgili semptomimetik ajanları anlamak, farklı tipteki adrenerjik reseptörlerin özelliklerini anlamakla mümkündür. Bu reseptörlerin özelliklerinin ve kontrol ettikleri biyokimyasal ve fizyolojik yolların bilinmesi, katekolaminlerin çeşitli organ sistemlerine olan değişik ve birbirinden farklı etkilerinin anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır (Goodman & Gillman's, 1996, Starke *et al.*, 1974).

α -Adrenerjik reseptörler, Ahlquist'in 1948'de adrenerjik reseptörleri ilk olarak α -ve β -adrenerjik reseptörler olmak üzere iki alt tipe ayrılmıştır. Bu anatomik sınıflandırma α -adrenerjik reseptörlerin farmakolojik farklılıklarının tanımlanmasına neden olmuştur. Farmakolojik olarak farklı α_1 -adrenoseptör alttipleri için ilk güçlü kanıt [3 H]-prazosin ile sıçan beyin membranında yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Morrow and Creese, 1986).

Morrow and Creese (1986), iki farklı α - adrenerjik reseptör alttipini [3 H]-prazosinle işaretleyerek, WB4101 ve fentolamin için yüksek afinite gösteren bölgeleri α_{1A} ve diğer bölgeleri α_{1B} olarak isimlendirdiler. Kloroetilklonidine

duyarlı olmayan bölgelerin, WB4101 için yüksek afinite gösteren bölgelerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Selektiviteleri WB4101'den yüksek olan α_{1A} selektif antagonistler belirlendi ve bunlar α_{1A} ve α_{1B} -adrenerjik reseptör alttiplerinin varlığını kanıtlamıştır (Minneman *et al.*, 1988, Gros *et al.*, 1988, Boer *et al.*, 1989, Zhong and Minneman, 1999).

Gelişen radyoligand bağlama ve moleküler klonlama teknikleri sayesinde en az üç α_1 -adrenerjik reseptör alttipi bulunduğu belirlenmiştir. Daha önce belirtildiği gibi, α_1 -adrenerjik reseptör alttipi özellikle WB4101 ve prazosinin afiniteleri ve CEC'nin (kloroetilklonidin) α_{1B} 'yi inaktive edip α_{1A} 'yı etmemesi temel alınarak α_{1A} ve α_{1B} olarak ayrılmıştır (Docherty, 1998). Bu sınıflandırma altında sıçan vas deferensindeki kasılmalara α_{1A} 'nın, sıçan dalağındaki kasılma cevaplarına ise α_{1B} 'nin aracılık ettiği belirlendi (Han, *et al.*, 1987).

α_1 -Adrenerjik reseptör alttiplerinden ilk olarak α_{1B} alttipi hamster düz kas hücre kültüründen klonlanmıştır (Cotecchia *et al.*, 1988). Daha sonra klonlananlar sıçan α_{1a} (Lomasney *et al.*, 1991), siğir α_{1c} (Schwinn *et al.*, 1990) ve sıçan α_{1d} (Perez *et al.*, 1991) dir. Ancak α_{1a} ve α_{1d} klonlarının %99.8 aynı tip olduğu gösterilmiştir. Şimdi α_{1a}/α_{1d} klonlarının yeni α_1 - adrenerjik reseptör alttipi α_{1D} olduğu açıktır ve α_{1c} 'nin α_{1A} olduğu açıkça gösterilmiştir. Bu reseptör klonları IUPHAR tarafından fonksiyonel olanlar ile karşılaştırarak gruplanması suretiyle tekrar isimlendirilmiştir (Docherty, 1998; Hieble and Ruffolo, 1996).

Selektif α_{1D} -antagonisti BMY 7378 tanımlanmıştır ve sıçan aortasında yüksek afiniteye sahip olduğu gösterilmiştir (Saussy *et al.*, 1994; Kenny *et al.*, 1995). α_{1d} -klonuna 100 kat daha duyarlı olan BMY 7378 kullanılarak α_{1d} -klonu, α_{1a} ve α_{1b} ile karşılaştırılmıştır. BMY 7378'in sıçan aortasında kompetitif bir antagonizmaya sahip olduğu gösterilirken, sıçan vas deferensinin epididimal kısmıyla, dalak ve insan prostatında yapılan çalışmalarda daha düşük afinite gösterdiği belirlenmiştir (Fagura *et al.*, 1997; Burt, *et al.*, 1995; Marshall *et al.*, 1995).

BMY 7378, damarlardaki α_1 -adrenerjik reseptör karakterizasyonu için önemli bir maddedir. Marshall ve Hussain (1997), sıçan torasik aorta, mesenterik ve pulmoner arterde BMY 7378 ve diğer antagonistlerin afinitelerini

değerlendirmişlerdir ve BMY 7378 en yüksek afiniteyi aortada göstermiştir. Değişik agonistlerin ve antagonistlerin α_1 -adrenoseptörlere afiniteleri Tablo-1 ve 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. 1. α_1 -Adrenerjik reseptörlerin agonistlere afiniteleri (Langer, 1999)

MADDELER (Agonistler)	pKi Değerleri		
	α_{1a}	α_{1b}	α_{1d}
		adrenerjik reseptör	
(-)Noradrenalin	6.00	6.15	7.36
Methoxamine	5.22	4.01	4.92
Oxymetazoline	8.17	6.49	6.40

Tablo 2. 2. α_1 -Adrenerjik reseptörlerin antagonistlere afiniteleri (Langer, 1999)

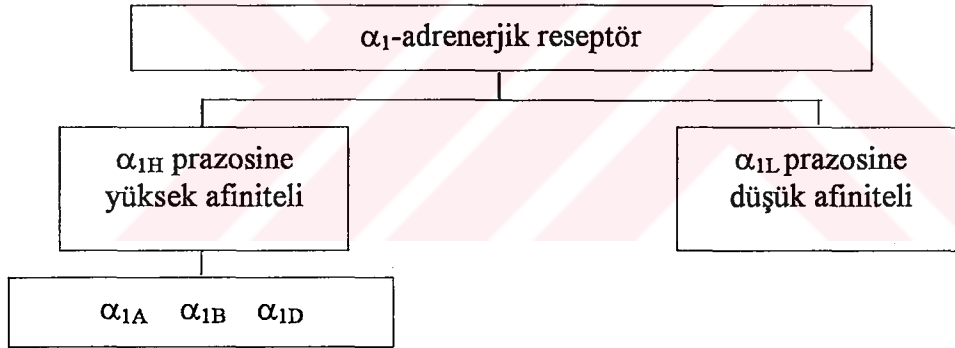
MADDELER (Antagonistler)	pKi Değerleri		
	α_{1a}	α_{1b}	α_{1d}
Alfuzosin	8.42	8.93	8.58
Prazosin	9.77	9.60	10.18
5-Methilurapidil	9.05	7.41	8.00
(+)Niguldipin	9.13	6.66	7.40
KMP 3213	10.44	7.68	8.70
Tamsulosin	10.50	9.20	10.00
BMY 7378	6.60	7.20	9.40

En yeni fonksiyonel α_1 -adrenerjik reseptör sınıflandırmalarından biri prazosin için düşük veya yüksek afinite göstermelerine göre yapılan α_{1H} ve α_{1L} dir (Flavahan and Vanhoutte, 1986). Muramatsu ve arkadaşları (1990) bu sınıflandırmayı daha ileri götürerek, kan damarlarında prazosine, WB4101'e ve HV723'e olan afinitelerini temel alarak α_{1H} , α_{1N} ve α_{1L} olarak üç alt gruba ayırmışlardır. α_{1N} , prazosine düşük afinite gösterip HV723'e afinite gösteren bir diğer gruptur. α_{1H} -adrenerjik reseptörleri prazosin için yüksek afiniteye sahiptirler

ve α_{1A} , α_{1B} ve α_{1D} alt sınıflarıyla eşleştikleri görülmektedir (Muramatsu, *et al.*, 1995).

Bu sınıflandırmanın ışığında ve prazosine düşük afinite esas alınarak, tavşan aortunda, mezenterik ve karotid arterlerde, kobay aortunda, insan prostatında, sıçan anokoksigeus kasında, tavşan mesane boynunda, tavşan ciltaltı rezistans arterlerinde ve küçük mezenterik arterlerde α_{1L} -adrenerjik reseptörlerinin bulunduğu bildirilmiştir. Fakat şimdiye kadar gen yapısı belirlenememiştir. Sıçan vas deferensinde, hem endojen hem ekzojen NA kasılmalarına aracılık eden α_{1A} 'ya ilaveten α_{1L} bulunduğu rapor edilmiştir (Ford et al., 1994; Docherty, 1998; IUPHAR 1998).

α_1 -Adrenerjik reseptör alt sınıflandırması yeni bilgilerle tekrar yapıldı. Prazosine yüksek afinite gösteren α_{1H} , klonlanıp-tanımlanmış ve farmakolojileri iyi bilinenler (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) ve prazosine düşük afinite gösteren, henüz klonlanmamış olan α_{1L} -adrenoseptör alttipidir (Langer, 1999).



Şekil 2.3 Bir diğer α_1 -adrenerjik reseptör alt sınıflandırması

α_1 -Adrenerjik reseptör agonist ve antagonistleri; α_1 -Adrenerjik reseptör altipleri için ilaçların (drug) afinite ve selektiviteleri, tanımlanmış olan rekombinant alttiplerde radyoligand bağlanma yöntemi için kompetitif olarak belirlenmiştir. α_1 -Adrenerjik reseptör selektif antagonisti prazosin prototipi olan antagonistlerin çoğu bilinen üç α_1 -adrenerjik reseptör altipleri arasında ya az yada hiç selektivite göstermezler. Ancak çeşitli ilaçların, değişik derecelerdeki selektiviteleri belirlenmiştir.

α_{1A} -Adrenerjik reseptör selektif antagonistlerindeki gelişmeler oldukça başarılıdır. İlk α_{1A} -adrenerjik reseptör antagonisti olarak WB4101 belirlenmiştir (Zhong&Minneman,1999, Morrow and Creese, 1986). Bunu takiben 5-metilurapidil (Gross *et al.*, 1988) ve (+)-niguldipine (Boer *et al.*, 1989) selektif α_{1A} -adrenerjik reseptör antagonistleri olarak belirlenmiştir. α_{1A} -Adrenerjik reseptörler için belitilen en son selektif antagonistler; KMD 3213, (+) Niguldipine, SNAP 5089, RS17053 ve SNAP 5272'dir (TIPS-2000 Receptor & Ion Channel nomenclature supplement). Bu antagonistlerden 5-metilurapidil serotonin 5-HT_{1A} reseptör, niguldipin ise bir dihidropiridin Ca²⁺ kanal antagonistidir.

SNAP 5089, α_{1A} -adrenerjik reseptör yüksek selektivite gösterirken voltaja bağlı Ca²⁺ kanallarına düşük afinite gösterir. Bu ilaçlar genellikle α_{1B} ve α_{1D} alttiplerine oranla düşük afinite gösterirler. Bu α_{1A} -adrenerjik reseptör antagonistlerinin benign prostatik hipertrofinin tedavisinde önemli rolleri olabilir. Orta dereceli α_{1A} -adrenerjik reseptör selektif antagonisti olan tamsulosin bu amaçla kullanıma sunulmuştur (Wetzel *et al.*, 1995, Foglar *et al.*, 1995, Nagarathnam *et al.*, 1998, Zhong&Minneman, 1999).

α_{1B} ve α_{1A} -adrenerjik reseptör için selektif antagonistlerin bulunması daha güç olmuştur. CEC, α_{1B} -adrenerjik reseptör selektif alkilleyici ajan olarak belirlenmiştir (Han *et al.*,1987). CEC, α_{1B} alttipine α_{1A} 'dan daha fazla afinite gösterir. Ancak α_{1D} alttipine ise benzer etki gösterdiği için non-selektif olarak adlandırılmıştır (Robinson and Hudson 1998). TIPS-2000 Receptor & Ion channel nomenclature supplement'ta α_{1B} alttipi için AH11110A adlı madde selektif antagonist olarak belirtilmektedir.

α_{1B} için orta dereceli kompetitif spiperon ve siklazosin gibi bazı antagonistler rapor edilmiştir. Ancak, bu maddeler altsınıflandırma için çok az ipucu vermektedir (Hancock, 1996, Zhong&Minneman, 1999).

Ayrıca, serotonin 5HT_{1A} reseptör parsiyel agonisti BMY 7378 α_{1A} -adrenerjik reseptör alttipi için selektif antagonist olduğu gösterilmiştir. Bu madde α_{1D} alttipine α_{1A} ve α_{1B} 'den 100 kez daha fazla afinite göstermektedir. Ayrıca bu ilaç α_{1D} alttipinin fonksiyonel rollerinin açıklanmasında önemli rol oynamıştır

(Goetz *et al.*,1995, Piascik *et al.*,1995). Ayrıca, α_{1D} -adrenerjik reseptör için SKF105854 de selektif bir antagonist olarak bildirilmektedir (Ruffolo, *et al.*, 1995).

Agonistlerin afinitelerinin ve selektivitelerinin radyoligand bağlama ve fonksiyonel çalışmalarla belirlenmesi antagonistlere göre zor olmuştur. Oksimetazolin, yapılan radyoligand bağlanma çalışmalarında α_{1A} 'ya α_{1B} ve α_{1D} 'den daha fazla afinite göstermiştir (Minneman *et al.*, 1988, Hancock, 1996).

Oksimetazolin ve metoksamin, α_{1A} 'ya α_{1B} 'den daha fazla selektivite göstermiştir. Oksimetazolin ve sirazolinin rekombinant α_{1A} -adrenerjik reseptör alttipinde selektivite gösterdiği bilinmektedir (Horie *et al.*, 1995 a, b). Diğer bildirilen α_{1A} -adrenerjik reseptör selektif agonistleri, SDZ NVI 085 (Hancock, 1996) ve A61603 (Knepper *et al.*, 1995) dir.

Çalışmalar NA ve adrenalinin her üç α_{1A} -adrenerjik reseptör alttipini benzer potansiyelde aktive etmektedir. Fakat yapay agonistler alttürler arasında önemli selektivite göstermiştir (Zhong & Minneman, 1999).

α_1 -Adrenerjik reseptörlerin sinyal iletim mekanizmaları;
 α_1 -Adrenerjik reseptör stimülasyonu en azından dört efektör sistemin regulasyonuna neden olur. Bu sinyal iletim mekanizmalarının ilki G proteinleridir. α_1 -Adrenerjik reseptörler G proteinlerinin $G_{q/11}$ familyasına bağlanarak fosfolipaz-C aracılığı ile IP_3 ve DAG oluşumunu aktive ederler.

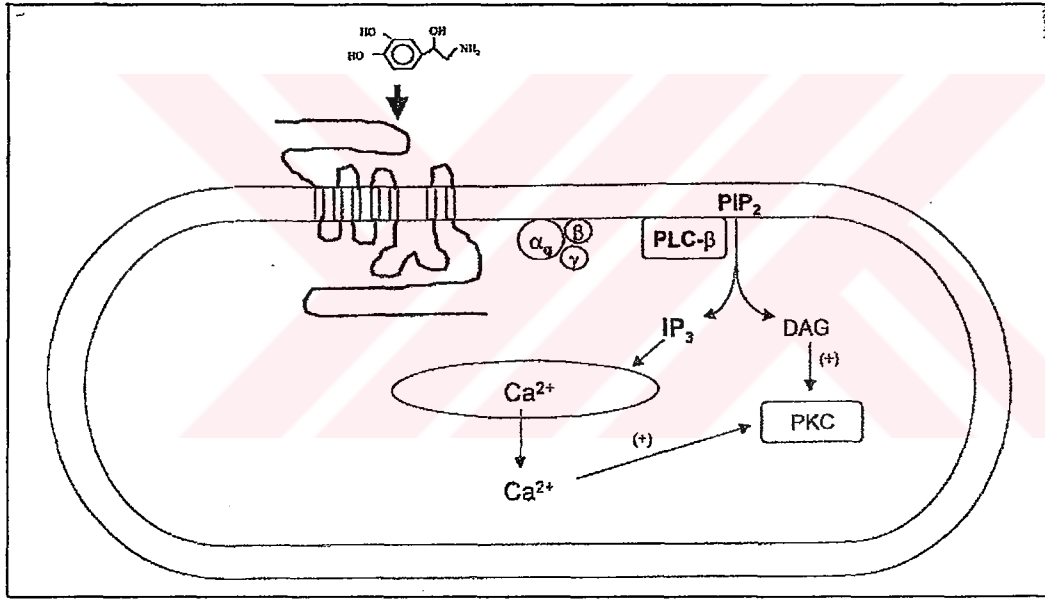
α_1 -Adrenerjik reseptörlerin kullandığı diğer ikinci haberci sistemler ise Ca^{2+} girişi (influx), arakidonik asid salınımı ve fosfolipaz-D aktivasyonudur. (Goodman&Gillman's, 1996, Zhong&Minneman, 1999).

α_1 -Adrenerjik reseptörlerin cevaplarına G proteinleri ($G_{q/11}$) aracılık eder. Bütün alttipler fosfolipaz-C ile bağlanır. Fosfolipaz-C nin aktivasyonu hücre membranına bağlı polifosfoinozidlerin hidrolizi sonucu inozitol 1, 4, 5-trifosfat (IP_3) ve diaçilgliserol (DAG) ikinci habercilerin oluşumuna yol açar.

$G_{q/11}$ familyası dört α -alt ünitesi içerir. Çoğu hücrede bir arada bulunan α_q ve α_{11} alt üniteleri ile daha sınırlı dağılım gösteren α_{14} ve α_{16} alt üniteleridir. Üç α_1 -adrenerjik reseptör alt tiplerinin hepsi α_q ve α_{11} üzerinden fosfolipaz-C ile

bağlanabilir. Sadece α_{1A} ve α_{1B} alttipleri α_{14} ile birleşir ve sadece α_{1B} adrenerjik reseptör alt tipi α_{16} ile eşleşir (Wu *et al.*, 1992).

Ayrıca her üç α_1 -adrenerjik reseptör alttipi G_q ve G_{11} ile kenetlenirler (Wise *et al.*, 1995). DAG, potent bir proteinkinaz-C aktivatörüdür, IP_3 bir spesifik reseptör aracılığıyla intraselüler depolardan Ca^{2+} salınımını stimüle eder. Düz kasların pek çoğunda intraselüler Ca^{2+} konsantrasyonunun artması, miyozin hafif zincir kinaza bağlı kalmodilin gibi Ca^{2+} duyarlı kinazların aktivasyonunu sağlar. Gerilimin gelişmesiyle bağlantılı olarak miyozin hafif zincirin fosforilasyonunun sonucunda kasılmaya sonuçlanır (Goodman&Gillman's, 1996).



Şekil 2. 4. α_1 -Adrenerjik reseptörlerin sinyal iletim mekanizmaları

IP₃: İnositol trifosfat, **DAG**: Diaçilgliserolü, **PLC**: Fosfolipaz-C, **PKC**: Proteinkinaz-C, **PIP₂**: Fosfoinositol-2-fosfat

Fosfolipaz-C, IP_3 ve DAG'ü oluşturduktan sonra IP_3 endoplazmik retikuluma sızar ve buradan Ca^{2+} 'un sitoplazma içerisine salınmasını tetikler. DAG ise proteinkinaz-C'yi aktive eder, proteinkinaz ise iyon kanalları, pompalar ve iyon-değişim proteinleri (Ca^{2+} -ATPaz) gibi membran proteinlerindeki

pekçok substratı fosforile ederek hücre cevabını oluşturmaktır. Bu etkiler, muhtemelen çeşitli iyon değişimlerini düzenlemektedir. Bu bilgilerden yola çıkılarak, Ca^{2+} kanallarını dihidropridinlerle bloke ederek yada ekstraselüler Ca^{2+} 'un hücre içine girişini engelleyerek, izole vasküler düz kaslarda veya hepatositlerdeki Ca^{2+} girişine α_{1A} 'nın aracılık ettiği kasılma cevabının inhibe edildiği bulundu (Minneman, 1988; Goodman&Gillman's, 1996).

Bu çalışmalar esas alınarak α_1 -adrenerjik reseptörlerin voltaja bağlı Ca^{2+} kanalları aracılığıyla fosfolipaz-C/IP₃ mekanizması üzerinden cevaplarını oluşturduğu ileri sürülmüştür (Minneman, 1988).

Çok çeşitli sinyal yolaklarının α_1 -adrenerjik reseptörler tarafından aktive edildiği bilinmektedir. Daha öncede belirtildiği gibi bunlar Ca^{2+} girişi, arakidonik asit salınımı ve fosfolipaz-D aktivasyonudur. Belirli α_1 -adrenerjik reseptör alt tiplerinin farmakolojik olarak varlığının kabul edilmesinden sonra 1987 Han *et al.* α_{1A} alt türünün düz kastaki voltaja-bağlı Ca^{2+} kanalına selektif olarak bağlandığını ileri sürdü. Ancak daha sonraki çalışmalar bu tür cevapların sadece tek bir α_1 -adrenerjik reseptör alt tipine özgü olamayacağını gösterdi. α_1 -adrenerjik reseptör aktivasyonunu takiben Ca^{2+} girişindeki mekanizmaları halen açıklanamamıştır (Zhong&Minneman, 1999).

Diğer sinyal yolaklarında α_1 -adrenerjik reseptörler tarafından aktive edildiği gösterilmiştir. Bunlardan fosfolipaz-A₂'nin α_1 -adrenerjik reseptör stimülasyonu, bioaktif prostaglandinler ve lökotrienlerin yolağında siklooksijenaz ve lipoksijenaz aracılığı ile metabolize edilen serbest arakidonatın salınımına neden olduğu memeli COS-hücre kültüründe gösterilmiştir (Zhong&Minneman, 1999, Perez *et al.*, 1993).

α_1 -Adrenerjik reseptör stimülasyonu, fosfolipaz-D'nin aktivasyonu sonucu arakidonik asit salınımı sıçan kuyruk arterinde (Gu *et al.*, 1992) ve sıçan fibroblastlarında (Ruan *et al.*, 1998) ve ayrıca cAMP üretimine öncülük edebileceği gösterilmiştir (Ruan *et al.*, 1998, Perez *et al.*, 1993).

Fosfolipaz-D, fosfatidilkolini hidrolize eder ve bunun sonucunda fosfatidik asit oluşur. Fosfatidik asit intraselüler depolardan Ca^{2+} salınımına neden olan bir ikinci haberci gibi davranmasına rağmen diaçilgliserol tarafından metabolize edilir. Son çalışmalar fosfolipaz-D'nin, ADP-ribozilleici faktör için efektör

olduğunu ve membrandan iyon giriş-çıkışında (trafficking) rol oynayabileceği gösterilmiştir (Goodman&Gillman's, 1996).

α_2 -Adrenerjik reseptörler ve alttipleri; Adrenerjik reseptörlerin en çok incelenen bir diğer grubu α_2 -adrenerjik reseptörlerdir. İlk α -adrenerjik reseptör sınıflandırılması bir seri agonist ve antagonistin presinaptik ve postsinaptik α -adrenerjik reseptörler üzerine farklı etkilerinin olması α -adrenerjik reseptör altı sınıflandırmasının α_1 -postsinaptik ve α_2 -presinaptik olarak yapılmasına yol açmıştır (Langer, 1974, Docherty, 1998). α_2 -Adrenerjik reseptörler santral ve periferik sinir sisteminde inhibitör rol oynadıkları pre ve postsinaptik nöronlarda yer alırlar (French, 1995). α_2 -adrenerjik reseptörler moleküler klonlama ve radyoligand bağlanma yöntemleriyle α_{2A} , α_{2B} ve α_{2C} alttiplerine ayrılmıştır (Lorenz *et al.*, 1990, Bylund, 1992).

Sıçan α_{2D} -adrenerjik reseptörü, insan α_{2A} -adrenerjik reseptör ile ortolog türdür. Bu iki reseptörün birbirinden farklı olmadığı kabul edildi (Lanier *et al.*, 1991, Harrison *et al.*, 1991, Simmoneaux *et al.*, 1991). α_{2B} -Adrenerjik reseptör, oksimetazoline düşük afinite göstermiştir ve insandan klonlanmıştır (Weinshank, *et al.*, 1990).

Daha yakın bir zamanda , üçüncü α_2 -adrenerjik reseptör alttipi olan α_{2C} -adrenerjik reseptörünün varlığı ileri sürüldü (Bylund, 1988). Bu alttip OK (keseli sıçan) hücre kültürlerinde belirlendi (Murphy and Bylund, 1988) ve insan retinoblastoma Y₇₉ hücre kültürlerinde benzer farmakolojik karakteristikler bulunmuştur (Gleason and Hieble, 1992).

α_{2C} -Adrenerjik reseptör alttipi insan böbreğinden klonlanmıştır (Regan, *et al.*, 1988). Bu alttip, α_{2B} -alttipi gibi prazosine ve ARC239, spiroksatine oranla yüksek afinite gösterirken oksimetazoline düşük afinite göstermesiyle farmakolojik olarak α_{2B} 'den ayrılır. Ancak rauwolsine daha yüksek afinite gösterir.

Dördüncü alttip olarak ileri sürülen α_{2D} -adrenerjik reseptör ile ortolog olduğu anlaşılan, sığır pincal, sıçan submaksillar bezinde ve sıçan pankreatik ada hücre tümörlerinden hazırlanan RINm5F hücrelerinde bulunmuştur. Bu alttip [³H]

rauwoisine diğer alttiplerden daha düşük, α_{2A} gibi prazosin, sproksatrine ve ARC2397a da düşük afinite göstermektedir (Simonneaux *et al.*, 1991, Michel *et al.*, 1989).

Sonra, α_2 -adrenerjik reseptör'lerin postsinaptik olarak da konumlandığına dair kanıtlar bulunmaya başlandı ve α_2 -adrenerjik reseptörlerin vasküler düz kaslarda vazonstriktör aracılık ettiği gösterildi (Drew and Whiting, 1979, Docherty and McGrath, 1980).

α_1 -adrenerjik reseptör selektif antagonisti olan prazosinin farklı afiniteleri temel alınarak yapılan radyoligonal bağlanma çalışmaları ilk olarak iki farklı α_2 -adrenerjik reseptör alttipinin varlığını ortaya koymuştur. İnsan platelet hücre reseptörlerinde prozasine düşük afinite gösteren α_{2A} ve prazosine yüksek afinite gösteren yenidoğan sıçan akciğerinde α_{2B} -alttipi belirlendi. (Chemng, *et al.*, 1982 Ruffolo *et al.*, 1991).

α_{2A} -alttipi insan trombositleri dışında HT29-hücre kültürlerinde, α_{2B} -alttipinde neonatal (yenidoğan) sıçan akciğeri dışında NG108-hücre kültürlerinde gösterilmiştir (Bylund, 1988, Bylund, *et al.*, 1988, Remaury and Paris, 1992, Bylund, *et al.*, 1994). α_{2D} -adrenerjik reseptör alttipi rattan klonlanmıştır (Lanier, *et al.*, 1991, IUPHAR).

α_2 -Adrenerjik reseptör-agonist ve antagonistleri; α_2 -adrenerjik reseptör alttipleri arasında aganist ve antagonistlere duyarlılık farkı vardır. Bundan yararlanarak alttipleri prazosine olan duyarlılık eksikliğine göre altsınıflandırmaya gidilmiştir (Hieble and Ruffolo *et al.*, 1996).

α_2 -Adrenerjik reseptör alttiplerine Adrenalin, NA'den daha fazla ya da eşit etkinlik gösterir. Oksimetazolin α_2 'lere diğer alttiplere göre daha selektiftir. α_2 için diğer selektif agonistler; α -metilnoradrenalin, klonidin, UK14304, deksmedetomidin ve guanfasin olarak belirtilmiştir (IUPHAR, Kayaalp, 1988) Antagonisti olarak ise BRL444408 ve BRL48962 belirtilmiştir (Beely, *et al.*, 1995, Young, *et al.*, 1989).

α_{2A} -Adrenerjik reseptörün yohimbine olan afinitesi karakteristiktir (Robinson and Hudson, 1998).

α_{2B} -Adrenerjik reseptör alttipi, prazosine α_{2AD} alttipinden daha yüksek afinite göstermiştir. Selektif bir agonisti olmamakla birlikte, α -metil-noradrenalin, klonidin ve UK14304 agonistik etkilidir.

α_{2B} için selektif antagonist imiloksandır (IUPAR 1998, Kayaalp,1998, MICHEL, *et al.*, 1990). Ayrıca antagonist ARC239 da selektivite göstermektedir (Ho, *et al.*;1997; Bylund, *et al.*, 1988).

α_{2C} -Adrenerjik reseptör alttipi prazosin için yüksek, oksimetazolin için ise düşük afinite gösterir. Radyoligand bağlanma çalışmalarında antagonist MK912, α_{2C} -adrenerjik reseptör alttipine parsiyel selektivite göstermiştir (Uhlen, *et al.*, 1992, Uhlen, *et al.*, 1997).

Rauwolsin, α_{2C} -adrenerjik reseptör alttipine diğerlerinden 10-20 kat daha fazla selektivite gösterir. Selektif agonisti yoktur (Robinson and Hudson, 1998; Kayaalp, 1998; TIPS Nomenclature 2000).

Bu ligandlar, α_2 -adrenerjik reseptör alttiplerinin bir dokuda var olup olmadığını belirlemek için radyoligand bağlanma çalışmalarında kullanılabilmesine rağmen, selektiviteleri bu reseptörlerin fonksiyonu ve karakterizasyonunu belirlemek için yeterli değildir (Robinson and Hudson, 1998).

α_2 -Adrenerjik reseptörlerin sinyal iletim mekanizmaları; α_2 -adrenerjik reseptör de α_1 -adrenerjik reseptörler gibi G proteiniyle kenetlenen reseptör ailesine aittir. Onların fonksiyonlarına Gi/Go'nun dahil olduğu G proteinleri aracılık eder. Bütün alttipler adenilat siklaza negatif bağlanırlar. Adenilat siklaz hücre içerisinde siklik-AMP'yi (cAMP) etkiler. cAMP (siklik adenosin 3', 5' monofosfat), adenilat siklazın etkisiyle ATP'den üretilir ve fosfodiesteraz enzimi aracılığı ile inaktif olan 5'-AMP'a çevrilir. cAMP, proteinkinaz-C gibi proteinlerin fosforilasyonunu katalize eden, bunların yerlerini değiştirerek aktivitelerinde değişiklik yapan proteinkinaz-A'yı aktive eder.

Stimülatör bir reseptöre uygun ligand bağlandığında G_s proteininin α alt birimi adenilat siklazı uyarır, inhibitör bir reseptöre uygun ligand bağlandığında G_i 'nin α altbirimi adenilat siklazı inhibe eder (Robinson and Hudson, 1998; Ganong, 1999).

Bütün alttıpler adenilat siklazı inhibe ederek cAMP üretimini azaltarak inhibisyon oluştururlar. Ayrıca α_2 -adrenerjik reseptörlerin Ca^{2+} girişini uyarması, K^+ kanallarının aktivasyonu, fosfolipaz-A₂ ve Na^+/H^+ alış-verişiyle (exchange) ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır (Katzung, 1997; Robinson and Hudson, 1998).

α_2 -Adrenerjik reseptörler, G-proteine bağlı çalışan K^+ kanallarını aktive ederek membran hiperpolarizasyonuna neden olur. Bazı durumlarda (miyenterik plexustaki kolinerjik nöronlar gibi) bu Ca^{2+} a bağlı olabilir, oysa diğer durumlarda (atrial miyositlerdeki muskarinik asetilkolin reseptörleri gibi) Ca^{2+} bağlı değildir ve doğrudan G-proteini aracılığıyla K^+ kanallarına bağlı reseptörlerle kenetlenir.

α_2 -adrenerjik reseptörler G_0 proteinleri aracılığıyla voltaja-bağlı Ca^{2+} kanallarını inhibe edebilmektedir.

Diğer ikinci haberci sistemler, α_2 -adrenerjik reseptörlerin aktive ettiği Na^+/H^+ alış-verişinin (exchange) hızlandırılması, fosfolipaz-C-B₂ aktivitesinin uyarılması ve arakidonik asid mobilizasyonu, polifosfoinozid fosforilasyonunun hızlandırılması ve intraselüler Ca^{2+} 'un artırılmasıdır (Goodman and Gillman's, 1996).

α_2 -adrenerjik reseptörler pre- ve postsinaptik olmak üzere anatomik olarak sınıflandırılmışlardır (Docherty, 1988). Presnaptik α_2 -adrenerjik reseptörler ya Ca^{2+} kanallarını (N veya P/Q) inhibe ederek, ya presnaptik K^+ kanallarını aktive ederek ya da doğrudan vezikül salan aparatusun komponentlerini modüle ederek presnaptik inhibisyon oluştururlar (Miller, 1988).

Postsinaptik α_2 -adrenerjik reseptörlerin aracılık ettiği kasılmalara ise hücre içinde Ca^{2+} akışının (influx) artması, muhtemelen voltaja bağlı Ca^{2+} kanalları aktive olur ve pertusis toksine duyarlı G proteinleri aracılık etmektedir. α_1 -adrenerjik reseptörlerin aksine α_2 -adrenerjik reseptörler fosfolipaz-C ile kenetlenmezler bunun yerine bazı hücrelerde fosfolipaz-A₂ ile kenetlenebilirler (Parkinson et al., 1995; Docherty, 1988).

α_1 ve α_2 -Adrenerjik reseptörlerin dağılımı; α_1 ve α_2 -adrenerjik reseptörler santral ve periferel sinir sisteminde yer alırlar. Her ikisinin de hem

presnaptik hem de postsnaptik membranda yer aldıkları bilinmektedir (Kayaalp, 1990; Docherty, 1998).

α_1 -Adrenerjik reseptörler santral sinir sisteminde büyük çoğunlukla uyarıcı (eksitator) bir role aracılık ettikleri postsinaptik bölgede yer alırlar. α_1 -adrenerjik reseptör alttiplerinin klonlanmasını takiben, mRNA çalışmaları, α_1 -adrenerjik reseptör mRNA'larının hipokampus ve kortekste olduğunu göstermektedir. (Bylund, 1992)

Periferik α_1 -adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu ile kasılan non-vasküler ve vasküler düz kasların her ikisinde de bulunurlar. Prostat, üreter ve mesane boynundaki düz kas kasılmalarından sorumludurlar (Robinson and Hudson, 1998; Docherty, 1998).

α_{1A} -Adrenerjik reseptörlerin, beyin, prostat, vas deferens, kalp ve kan damarlarında dağılım gösterdiği ve bu dokularda düz kas ve miyokardial kasılmalara aracılık ettikleri bilinmektedir (IUPHAR). Sıçan karaciğerinde çoğunlukla (predominantly) α_{1A} alttipi görülürken, insan karaciğerinde α_{1B} -adrenerjik reseptör alttipi bulunmaktadır (Zhong and Minneman 1999; Rokosh, *et al.*, 1994; Price, *et al.*, 1994).

α_{1B} -Adrenerjik reseptör alttipi sıçan dalak ve karaciğerinin yanı sıra böbrek, beyin, kalp ve kan damarlarında yer almaktadır. Bu dokulardaki düz kas kasılmasından sorumludur. Ayrıca fare dalağında (Yu and Han, 1994), tavşan karpus kavernosum ve tavşan cilt direnç arterinde (Noble, *et al.*, 1997, Yang and Endoh, 1997) ve insan prostatında α_{1A} alttipiyle beraber görülmektedir (Tehg, *et al.*, 1994; Zhong and Minneman, 1999, IUPHAR, 1998).

α_{1D} -Adrenerjik reseptör alttipi ise sıçan aortasında, beyinde ve diğer büyük damar yataklarında bulunmakta ve düz kas kasılmalarına aracılık etmektedir (Zhong and Minneman, 1999; IUPHAR, 1988).

Sıçan mezenterik arter ve pulmoner arterde de α_{1D} 'ler çoğunlukta (Hussain and Marshall, 1997), sıçan renal arterinde α_{1A} 'larla birlikte ve karotid arterinde (Villalobos-Molina; *et al.*, 1997, Villalobos-Molina and Barra, 1996) tavşan aortasında ve ventrikülünde de bulunmaktadır (Fagura *et al.*, 1997; Yang and Endoh, 1997)

α_2 -adrenerjik reseptörler, santral ve preferik sinir sisteminde inhibitör rol oynadıkları pre- ve postsinaptik nöronlarda yer alırlar. Farklı reseptörlerin anatomik yerlerine göre rollerini belirlemek için yapılan fonksiyonel çalışmalar, selektif agonist ve antagonistlerin ve ayrıca DSP-4 toksini gibi maddelerle presinaptik sinir terminallerinin yok edildiği lezyonlama deneyleri kullanılarak başarılmıştır (French, 1995, Heal *et al.*, 1995).

Bu reseptörler, santral sinir sisteminde nonadrenerjik sinir terminallerindeki otoreseptörler ve diğer sinir terminallerinde bulunan heteroreseptörler aracılığıyla nörotransmiter salınımının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Bu reseptörlerin NA ve serotonin salınımının düzenlenmesindeki önemi, depresyon tedavisinde kullanılan idazoksan gibi α_2 -antagonistlerin araştırılıp-geliştirilmesi ile sonuçlanmıştır (Robinson and Hudson, 1998).

α_{2A} -adrenerjik reseptör alttipi insan trombositlerinde (prazosine düşük afinite) α_{2B} -alttipi ise yenidoğan (neonatal) sıçan akciğerinde (prazosine yüksek afinite gösterir) belirlenmiştir (Bylund *et al.*, 1994).

Trombositlerin yanı sıra α_{2A} -alttipi, insan beyinde, omuriliğinde ve adipoz dokusunda yer alırken , sıçan beyinde, dalağında, aortasında ve böbreklerinde de bulunmaktadır (Van der Graaf, *et al.*, 1996, IUPHAR).

α_{2A} -adrenerjik reseptörlerin santral hipotansiyona aracılık ettiği, α_{2B} -adrenerjik reseptörlerin ise periferik basınç cevabına aracılık ettiği “knock-out fareler” kullanılarak gösterilmiştir (MacMillan, *et al.*, 1996; Link, *et al.*, 1996).

Non-mutant farelerde, α_2 -adrenerjik reseptör agonisti deksmedetomidin α_2 -alttipinden yoksun mutant farelerde antinosisseptif (Stone *et al.*, 1997), sedatif ve hipotermik etkilere yol açan, fakat α_{2B} ve α_{2C} knock-out farelerde deksmedetomidinin etkilerinden nispeten etkilenmemiştir (Hunter *et al.*, 1997, Docherty, 1998).

α_{2A} -mutant farelerde, morfinin analjezik etkisi azalmıştır (Stone *et al.*, 1997). α_{2C} -adrenerjik reseptörün hipotermik etkiye aracılık edebileceği belirtilmektedir (Sallinen, J. *et al.* 1997)

Vasküler düz kasların kontraksiyonu, adipoz dokusunda bulunan α_2 -adrenerjik reseptörler üzerinden oluşan lipoliz inhibisyonu ve sempatik

gangliyonlarda hiperpolarizasyonu, α_2 -adrenerjik reseptörlerin periferik etkilerindedir (Robinson and Hudson, 1998).

β -Adrenerjik Reseptörler ve Altıpleri; Lands ve arkadaşları 1967 'de bir seri endojen ve sentetik agonistlerin etki güçlerini temel alarak β -adrenerjik reseptörleri β_1 ve β_2 olmak üzere iki alt gruba ayırdılar (Bylund *et al.*, 1994). Kuşlara ait β -adrenerjik reseptörler üzerinde yapılan çalışmalar özellikle hindi eritrositlerinde, memeli β -adrenerjik reseptörleri ile karşılaştırıldığında benzerliklerin yanı sıra önemli farklılıklar da göstermektedir. Yıllarca toplanan kanıtlar, bilinen ve kullanılan β -antagonistlere duyarlı bir β -adrenerjik reseptör alttipinin varlığını göstermektedir. "Atipik β -adrenerjik reseptör" olarak adlandırılan bu reseptör, selektif agonistlerin belirlenmesiyle β_3 -adrenerjik reseptör olarak tanımlanmıştır (Neve, *et al.*, 1986; Bylund et al, 1994).

β_1 -ve β_2 -adrenerjik reseptörlerin arasındaki birincil fark katekolaminlere gösterdikleri etki kuvvetleridir. β_1 -adrenerjik reseptörler NA ve adrenaline eşit etki gücü gösterirken, β_2 -adrenerjik reseptörler adrenaline NA'ye göre 100 kat daha fazla selektivite gösterirler. Bunların aksine NA, β_3 -alttipine adrenalinden daha fazla etki gösterir. Sentetik bir katokolamin olan izoprenaline bütün beta-adrenerjik reseptörlere etkilidir (Katzung, 1998, Bylund et al. 1994).

İlk iki alttipin belirlenmesini takiben, alttıplere selektif maddeler geliştirilmiştir. β_1 -adrenerjik reseptörlerin selektif antagonistleri; metoprolol, praktolol, atenolol, betaksolol, CGP20712A ve β_2 -adrenerjik reseptörlerin selektif antagonistleri butoksamin ve ICI118551, β_2 -adrenerjik reseptörler için selektif sentetik agonistleri (Ör; Terbutalin, salbutamol, salmeterol, zinterol) bulunmuştur Fakat β_1 -adrenerjik reseptör agonistleri (Ör; denopamin, RO 363, ksamoterol) daha sonra belirlenmiştir. β_3 -adrenerjik reseptörler için de selektif agonist (Ör; BRL 37344, CGP 12177) ve antagonistler (SR59230A) belirlenmiştir (IUPHAR, Katzung 1998, *et al.*, 1994)

Farmakolojik kanıtlar, çeşitli türlerin kardiyak dokusunda dördüncü bir β -adrenerjik reseptörün varlığını işaret etmektedir. β_4 -adrenerjik reseptör olarak adlandırılan bu reseptör, adrenaline ve NA'ne düşük afinite gösterirken bupranolol

ve CGP20712a gibi antagonistler tarafından bloke edilmektedir (Kaumann, 1997; Sarsero, *et al.*, 1998; Gallitzky, *et al.*, 1997)

β -Adrenerjik Reseptör Agonist ve Antagonistleri; β_1 -adrenerjik reseptör'ün selektif agonistleri denopamin ve ksameteroldür. Selektif antagonistleri ise atenolol, bisoprolol, betaxolol, praktolol ve CGP20712A'dır (IUPHAR-98, Bylund *et al.*, 1994, IUPHAR-73).

β_2 -adrenerjik reseptör için selektif agonistler, terbutalin, salbutamol, salmeterol, formoterol ve fenoterol olarak bildirilmektedir. Selektif antagonisti ICI118551'dir (IUPHAR-98, TIPS Nomenclature 2000).

β_3 -adrenerjik reseptör için belirtilen selektif agonistler BRL 37344, CGP12177, CL316243, selektif antagonisti ise SR59230A'dır.

β_4 -adrenerjik reseptör için belirlenen selektif agonist ve antagonistler yoktur. Ancak NA ve adrenaline düşük afinite gösterirken, β -adrenerjik reseptöre antagonistleri, bupranolol ve CGP20712A ile bloke olurlar (Kaumann, 1997; Sarsero *et al.*, 1998).

β -Adrenerjik Reseptörlerin Sinyal İletim Mekanizmaları; β -adrenerjik reseptörler, alfa adrenerjik reseptörler gibi G proteinlerine ve hücre içi ikinci haberci sistemlere bağlıdırlar. Bütün β -adrenerjik reseptörler G_s tipi G proteinleri aracılığı ile adenilat siklaza bağlanmakta ve ATP 'nin cAMP dönüşümünü arttırmaktadır (Bylund *et al.* 1994, Katzung, 1998). β -adrenerjik reseptörler için esas ikinci haberci cAMP dir. Reseptörün uyarılmasıyla artan cAMP, cAMP 'ye bağlı proteinkinazları aktive eder ve onların fosforilasyonu sonucu çok sayıda hücre içi proteinin fonksiyonu düzenlenir. Örneğin, pek çok türde karaciğerde yer alan beta adrenerjik reseptörler cAMP sentezini arttırarak glikojen fosforilazın aktivasyonunda rol alan olayların tetiklenmesine aracılık etmektedir.

Ayrıca beta adrenerjik reseptörler stimulan G-proteini (G_s) aracılığı ile iskelet ve kalp kası plazma membranlarında voltaja bağlı Ca^{2+} kanallarını etkilemektedir. Kalpte, beta adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu hücre membranından Ca^{2+} akışını arttırır ve hücre içerisinde birikir.

β_2 ve β_3 -adrenerjik reseptör uyarımı sonucu adenilat siklaz aktive olur ve cAMP oluşumu artar (Katzung 1998, Goodman and Gillman's 1996, Bylund *et al.*, 1994).

β -Adrenerjik Reseptörlerin Lokalizasyon ve Fonksiyonları; β_1 ve β_2 -adrenerjik reseptörlerin in situ hibridizasyon yöntemleri kullanılarak santral sinir sisteminde farklı örneklerde dağılıma (pattern) sahip olduğu belirlenmiştir (Nicholas, *et al.*, 1996).

β_1 -adrenerjik reseptörler büyük oranda striatum da bulunurlar ve Huntington koresinde bu reseptörlerin çok sayıda selektif bir şekilde azalamaları araştırılmaktadır (Robinson and Hudson, 1998; Waeber *et al.*, 1991).

β -adrenerjik reseptörler hücre yüzeyinde uyarıldıktan sonra Gs aracılığı ile cAMP'nin oluşumunu tetikleyerek sitoplazmada cAMP birikimine neden olurlar. cAMP ikinci ulak olarak sitoplazmadaki proteinkinaz A'nın aktivasyonunu sağlar. Proteinkinaz-A ise hücre tipine göre farklı substratlara sahiptir ve farklı olaylara neden olur.

β_1 -adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu kalbin atım gücünü ve hızını artırır. Proteinkinaz-A miyokarda fosforilaz kinazı aktive ederek inaktif fosforilaz-b'yi aktif fosforilaz-a'ya dönüştürür. β_1 -adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu sonucu renin salınımı uyarılır, koroner arterler ve gastrointestinal düz kaslarda gevşeme görülür (Bylund *et al.* 1994; Robinson and Hudson, 1998; Kayaalp 1990).

β_2 -adrenerjik reseptör ise solunum yolları, uterus ve pekçok damarda olmak üzere düz kaslarda gevşeme cevabına aracılık etmektedir. Ayrıca sempatik sinir terminallerinden NA salınımını düzenleyen β -adrenerjik reseptörler de β_2 -adrenerjik reseptörlerin karakteristik özelliklerini göstermektedir (Bylund *et al.*, 1994; Robinson and Hudson, 1998).

Atipik β_3 -adrenerjik reseptörler yaygın bir şekilde (predominantly) yağ dokusunda yer alırlar. β_3 -adrenerjik reseptör, beyaz yağ dokusunda lipolize ve kahverengi yağ dokusunda termojenezise neden olmaktadır. Yağ dokusu hücrelerinde proteinkinaz-A, lipazı fosforile ederek aktive olmasına neden olur. Bunların yanısıra β_3 -adrenerjik reseptör, pankreasın endokrin hücrelerinden insülin salınımını uyardığına, iskelet kaslarında glikojen sentezini arttırdığına ait

kanıtlar bulunmaktadır. Bu özelliklerinden faydalanılarak β_3 -adrenerjik reseptör agonistleri obezite tedavisinde kullanılabilir (Kaumann, 1997; Kayaalp, 1998; Bylund *et al.*, 1994; Robinson and Hudson, 1998).

β_4 -adrenerjik reseptör alttipinin varlığı ise kalpte miyokard ve sinoatriyal düğümde gösterilmiştir (Kayaalp 1998). İnsan yağ dokusu hücrelerinde β_4 -adrenerjik reseptörler, CGP12177'nin lipolitik etkilerine aracılık eder. Oysa sıçan yağ dokusunda β_3 -ve β_4 -adrenerjik reseptör tipleri bir arada bulunur (Gallitzky, *et al.*, 1997).



3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

İzole organ bayosu (Ugo Basil, Italy, cat.4050)

Kaydedici (Ugo Basil, Gemini, Italy, cat. 7070)

İzometrik transducer (Ugo Basil, Italy,)

İzotonik transducer (Ugo Basil, Italy)

Kan Basıncı Transducer (Ugo Basil, Italy, cat. 7016)

Su banyosu

Kronometre

Cerrahi Malzemeler

NaCl (Merck)

NaHCO₃ (Merck)

MgSO₄.7H₂O (Merck)

KH₂PO₄ (Merck)

KCL (Merck)

CaCl (Merck)

Glukoz (Merck)

Tastromin (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya

A.B.D.'da sentezlenmiştir)

Noradrenalin (Sigma)

Prazosin (Sigma)

Propranolol (Sigma)

Desipramin (Sigma)

WB4101 (Sigma)

Kloroetilklonidin (Sigma)

BMY 7378 (Tocris)

Üretan (Sigma)

Serum Fizyolojik

Heparin

3.2. YÖNTEM

3.2.1. İn vitro Deneyler

3.2.1.1. İzole Organ Banyosu Deneyleri:

Erkek albino sıçanlar servikal dislokasyon ile öldürüldükten sonra, aorta, vas deferens, dalak ve ileum izole edilerek 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 O₂ ile gazlandırılmış Krebs-Henseleit fizyolojik çözeltisi (NaCl 112mM, KCL 5.9, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 25, NaPO₄ 1.2mM) içine konuldu. Bir grup aorta ve vas deferens deneylerinde literatürde belirtildiği gibi Krebs çözeltisi içerisine 10⁻⁶M propranolol ve 10⁻⁷M desipramin ilave edildi ve deneyler bu maddelerin varlığında tekrarlandı.

Sıçan Aorta

Albino sıçanlardan torasik aorta alındı. 3-5mm uzunluğunda alınan sıçan izole aorta endotelinden arındırmak için hassas bir şekil de sürterek temizlendi. Daha sonra izole organ banyosunda 1g gerilim uygulanarak izometrik transducera bağlandı. Organ asıldıktan sonra bir saat süresince inkübasyona bırakıldı. Bu süre içinde organ 15 dakikada bir yıkandı. Aort endotelinin tamamen temizlendiğinden emin olmak için doku 10µM NA ile kastırılıp ortama 10µM asetilkolin verildi. Daha sonra organ yıkandı. Banyo sıvısı 15 dakikada bir değiştirildi. Deneylerde kontrol olarak NA ve KCl doz-cevap eğrileri alındı. Tastrominin üç farklı dozda (10⁻⁵, 5x10⁻⁵, 10⁻⁴M) kullanıldı. Bu tastromin dozlarının varlığında NA ve KCl cevapları alındı. α_{1D}-adrenerjik reseptör antagonisti BMY 7378, literatürde belirtilen 10⁻⁵ ve 10⁻⁷M konsantrasyonlarda kullanıldı. BMY 7378 organa verildikten 30 dakika sonra NA doz cevapları alındı (Aboud, et al., 1993, Fagura, et al., 1997).

Vas deferens

Erkek albino sıçanlardan bütün (whole) vas deferens alınıp 0.5g gerilim altında izotonik olarak asıldı. Kontrol olarak NA ve KCl kullanıldı. Tastrominin yukarıda belirtilen dozları varlığında NA ve KCl cevapları yinelendi. α_{1A}-

adrenerjik reseptör antagonisti olduğu bilinen WB4101 kullanıldı. Literatürde belirtilen 10^{-8} ve 10^{-7} M dozlar kullanıldı. Belirtilen WB4101 dozları uygulandıktan 30 dakika sonra NA doz-cevabı tekrarlandı (Burt, *et al.*, 1995, Aboud, *et al.*, 1993).

Dalak

Sıçanlardan izole edilen dalaktan longitudinal bir parça alınarak 0.8-1g gerilim altında izometrik transducera bağlı banyoya asıldı.

Organ parçaları asıldıktan sonra 15 dakika ara ile yıkanarak bir saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, deneylere ve seçilen organa uygun olarak belirlenen alfa adrenerjik reseptör agonisti NA ve bir diğer kontrol olarak KCl ile doz-cevap eğrisi çıkarıldı. Her madde uygulamasından sonra organ parçaları yıkanıp 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra aynı doz cevap eğrileri tastromin varlığında alındı. Deneyler tastrominin üç değişik dozuyla tekrarlandı.

α_{1B} -adrenerjik reseptör antagonisti olduğu bilinen CEC 10^{-6} ve 10^{-4} M dozlarda kullanıldı. Literatüre göre organ CEC'ne 40 dakika süresince maruz bırakıldıktan sonra NA doz-cevabı alındı. Ayrıca tastrominin dalak üzerindeki kastırıcı etkileri nedeniyle tastromin doz-cevap eğrisi (5×10^{-6} , 10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} M tastromin dozları kullanılarak) çıkarıldı (Burt, *et al.*, 1995, Eltze, 1996).

İleum

Sıçan ileum çalışmalarında alınan parça 1g gerilim altında izotonik olarak asıldı. Kontrol olarak Ach ve KCl cevapları alındı. Bu cevaplar tastrominin daha önce belirtilen üç dozu varlığında tekrarlandı.

3.2.2. İn vivo Deneyler

3.2.2.1. Kan Basıncı Deneyleri:

Her iki cinsten albino sıçanlar alınıp %20'lik üretan ile anesteziye edildiler. Anesteziye edilen deney hayvanlarının carotid arter ve jugular venleri PE-100 polietilen kateter aracılığıyla kanüle edildi. Arter basıncı transducer aracılığı ile kaydediciye aktararak kağıda yazdırıldı. Operasyon tamamlandıktan sonra en az bir saat deney hayvanının stabilizasyonu için beklendi. Operasyon

başlangıcında koagülasyonu önlemek amacıyla %0.9 NaCl içerisinde 100iu/L heparin intravenöz olarak uygulandı. Stabilizasyon süresi tamamlanınca önce tastrominin üç değişik dozu (1.25×10^{-3} , 1.25×10^{-2} ve 6.25×10^{-2} mg/kg) verilerek hayvanın kan basıncındaki değişimler yazıcıya kaydedildi (The Staff of Edinburgh).

3.2.2.2. Analjezi Deneyleri

Analjezi testi için albino 25-30g ağırlığında fareler kullanıldı. Daha önceden tanımlanmış yöntemler esas alınarak yapıldı. Farelerde önce , 'tail-flick' sonra 'tail-immersion' testi uygulandı (D'Amour, *et al*, 1941, Scmauss, *et al*, 1984, Aydın, S., *et al*, 1998)

Bu test için beş hayvandan oluşan gruplar hazırlandı. İlk önce gruba 0.1ml %0.9'luk serum fizyolojik verildi ve kontrol değerleri alındı. Daha sonra tastrominin 100, 200 ve 400mg/kg'lık dozları 0.1ml olarak hayvanlara enjekte edildi. Enjeksiyonlardan 20 dakika sonra önce 'tail-flick' testi ardından da 'tail-immersion' testi uygulandı. 'Tail-flick' testinde bir damar pensu (Bull clamp) aracılığı ile basınç uygulanarak hayvanların ağrı oluşumuna cevap verme süreleri ölçüldü. 'Tail-immersion' testinde ise farelerin kuyrukları 52°C sıcaklıktaki suya sokuldu ve reaksiyon zamanları ölçüldü.

3.2.2.3. Akut Toksikite Deneyleri

Akut toksisite deneyleri için her bir grupta üçer adet Swiss albino fareden oluşan üç ayrı grup kullanıldı. Tastrominin üç ayrı dozu farelere 0.1ml olarak enjekte edildi ve hayvanlar 48 saat gözlem altında tutuldu.

Birinci gruba; 100mg/kg, ikinci gruba 200mg/kg, üçüncü gruba 400mg/kg tastromin intraperitoneal olarak enjekte edildikere ve literatüre uygun olarak değerlendirildi (Lorke, 1983, Scales, M.D.C., 1992).

3.2.3. İstatistik ve Veri Analizi

Hayvanlardan elde edilen tüm değerler, tek tek deneysel verilerin aritmetik ortalamasıdır. Ayrıca bu ortalamanın standart hatası hesaplanmış ve bu grafiklerde hata barı olarak ve tablolarda \pm değer biçiminde gösterilmiştir. Her bir

deneyde kullanılan hayvan sayısı “n” olarak belirtilmiştir. Kontroller ve test maddesi uygulanan hayvanlar arasında görülen farklılıklar Student t-testi ve varyans analizi uygulanarak istatistiksel açıdan karşılaştırılmıştır. Farklı dozlara karşı alınan yanıtların doza bağımlılık derecelerini saptamak için lineer regresyon analizi uygulanmıştır. Agonist afinite konstantı (pD_2) nonkompetitif antagonist afinite konstantı(pD'_2)ve kompetitif antagonist afinite konstantı (pA_2) aşağıda verilen formüllere göre hesaplandı (Ariens and Van Rossum, 1957; Arunlakshana and Schild, 1959). Schild eğimi ise artan sağa kaymalar kaybolup maksimumlar düştüğü için hesaplanamadı.

Agonist afinite konstantı:

$$pD_2 = -\log [EC_{50}]$$

EC_{50} : Maksimum yanıtın %50'sini herhangi bir dokuda ortaya çıkaran agonist molar derişimi. Bu değer regresyon doğrusundan hesaplanarak deneysel olarak bulundu.

Non-kompetitif antagonist afinite konstantı:

$$pD'_2 = pD'_x + \text{Log} \left[\frac{E_{Am}}{E_{ABm}} - 1 \right]$$

pD'_x : Agonist maksimum yanıtlarında %50'ye yakın düşme oluşturan antagonist molar konsantrasyonunun (-) logaritması. Bu değer deneysel olarak bulundu.

E_{Am} : Agonist kontrol maksimum yanıtı (mm yada % olarak)

E_{ABm} : Belli bir konsantrasyonda antagonist varlığında agonist ile elde edilen maksimum yanıt.

Kompetitif antagonist afinite konstantı:

$$pA_2 = pA_x + \log \left[\frac{C_{Am}}{C_{ABm}} - 1 \right]$$

pA_x : Agonistin çift birim olan bir dozunun etkisini tek birimdeki etkisine düşürmek için gerekli antagonist molar konsantrasyonunun (-) logaritmasıdır. Bu deneysel olarak bulundu.

C_{Am} : Ortamda antagonist yokken maksimum yanıtı veren agonist molar konsantrasyonudur.

C_{Abm} : Ortamda pA_x 'i belirleyen konsantrasyonda antagonist varken maksimum yanıtı veren agonist molar derişimidir.

Deney sonuçları ve elde edilen tüm verilerin istatistik analizi için IBM bilgisayarda işletilen ve BASIC programlama dilinde yazılmış bir hesaplama programı kullanıldı. Tezde kullanılan grafikler Excel programında çizildi.



4. BULGULAR

4.1 İn vitro Deneyler

4.1.1. İzole Organ Banyosu Deneyleri

4.1.1.1. Aorta Deneyleri

Sıçan aortunda agonist olarak NA ve KCl kullanıldı ve bu agonistlere karşı doza bağımlı kontraktıl yanıtlar elde edildi. Her iki agonist için hesaplanmış olan agonist afinite konstantları tablo 4.1’de verilmiştir. Sıçan torasik aortası üzerinde yapılan deneylerde tastrominin NA ve KCl doz-cevaplarını etkilediği gözlemlendi (Şekil 4.1 ve 4.2). Bu inhibisyonlara ilişkin antagonist afinite konstantları tablo 4.2’de verilmiştir. Normal Krebs kullanılarak yapılan deneylerle propranolol ve desipramin ilave edilmiş Krebs çözeltisi ile yapılan deneyler arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (Şekil 4.3). Her iki deneysel durum için agonist (NA) afinite konstantları şekil 4.3’de yer almaktadır. 10^{-5} - 10^{-4} M konsantrasyon aralığında tastrominin aortadaki NA ve cevapları üzerindeki etkisi doza bağımlı bir şekilde ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.1 ve 4.2). Propranolol ve desipramin ilave edilmiş Krebs ortamında tastrominin NA karşı antagonistik etkisi değişkenlik göstermemektedir (Şekil 4.4). Spesifik α_{1D} -adrenerjik reseptör antagonisti BMY 7378 gibi, tastromin de sıçan aortu NA yanıtlarını inhibe etmektedir (Şekil 4.5). Ancak tastromin ve BMY 7378’in eşit konsantrasyonlarda NA yanıtları üzerindeki inhibitör etki şiddeti aynı gözükmemektedir (Şekil 4.1, 4.5 ve Tablo 4.4). Üstelik BMY 7378 NA eğrisini paralel bir biçimde sağa kaydırmaktadır (Şekil 4.5). Tastrominin 10^{-5} M konsantrasyonda gösterdiği etki BMY 7378’in 10^{-7} M ’da gösterdiği etkiye kısmen benzemektedir (Şekil 4.1 ve 4.5). Tastromin 10^{-4} M konsantrasyonda ise NA cevaplarını (propranolol+desipramin varlığında ve yokluğunda) oldukça düşürmektedir (Şekil 4.1 ve 4.4). Ancak tastrominin özellikle NA cevapları üzerine yaptığı etki grafiklerde de görüldüğü gibi non-kompetitif bir etki olarak değerlendirilebilir.

4.1.1.2. Vas deferens Deneyleri

Sıçan vas deferensinde agonist olarak NA ve KCl kullanıldı ve bu agonistlere karşı doza bağımlı kontraktıl yanıtlar elde edildi. Her iki agonist için hesaplanmış olan agonist afinite konstantları tablo 4.1'de verilmiştir. Albino sıçanlardan alınan izole vas deferens üzerinde de NA ve tastrominin aortada uygulanan dozları kullanıldı. Vas deferensde, tastromini 10^{-5} M dozda NA doz-cevabını sağa kaydırılmaktadır. Tastrominin sıçan vas deferensinde 5×10^{-5} ve 10^{-4} M konsantrasyonlardaki etkisinin ise non-kompetitif olduğunu düşündürmektedir (Şekil 4.6). Bu farmakolojik etkileşimler için antagonist afinite konstantları tablo 4.1'de görülmektedir. Propranolol ve desipramin varlığında alınan NA yanıtlarında tastrominin yüksek dozlarındaki non-kompetitif etki daha belirgin olarak görülmektedir (Şekil 4.7). Propranolol+desipramin varlığında sıçan vas deferensindeki kontraktıl NA yanıtlarının önemli düzeyde değişmediği anlaşılmaktadır (Şekil 4.8). Her iki deneysel durum için agonist afinite konstantları tablo 4.5'de verilmiştir.

α_{1A} -adrenerjik reseptör antagonisti WB4101'in 10^{-8} ve 10^{-7} M dozlarının varlığında da NA doz-cevapları alındı (Şekil 4.9). 10^{-8} M WB4101 varlığında NA doz-yanıt eğrisini sağa kaydırılmaktadır. Bu açıdan bakıldığında tastrominin 10^{-5} M konsantrasyonu ile, WB4101'in 10^{-8} M konsantrasyonu benzerlik göstermektedir (Şekil 4.6). WB4101'in sıçan vas deferensindeki bu inhibitör etkisine ilişkin afinite konstantları tablo 4.4'de yer almaktadır.

Vas deferensde, tastromin varlığında KCl cevapları da doza bağımlı olarak belirgin bir şekilde azaltılmaktadır (Şekil 4.10). Bu etkileşime ait antagonist afinite konstantı tablo 4.10'da gösterilmiştir.

4.1.1.3. Dalak Deneyleri

Sıçan dalağında agonist olarak NA ve KCl kullanıldı ve bu agonistlere karşı doza bağımlı kontraktıl yanıtlar elde edildi. Her iki agonist için hesaplanmış olan agonist afinite konstantları tablo 4.1'de verilmiştir. Dalakta tastromin varlığında NA ve KCl yanıtları alındı. Tastromin doza bağımlı olarak KCl cevaplarını yüksek oranda azaltırken (Şekil 4.11), NA yanıtlarını ancak en yüksek dozunda

azaltmaktadır (Şekil 4.12). Bu inhibisyonlara ait antagonist afinite konstantları tablo 4.2’de verilmiştir.

Tastromin varlığında KCl cevaplarının non-kompetitif olarak etkilendiği görüldü (Şekil 4.11). NA doz-yanıt eğrisi ise 10^{-5} ve 5×10^{-5} M konsantrasyondaki tastromin dozları varlığında sağa kayma gösterirken, 10^{-4} M tastromin varlığında non-kompetitif antagonizma gözlemlendi (Şekil 4.12).

α_{1B} -adrenerjik reseptör antagonisti olarak bilinen CEC varlığında da NA yanıtları alındı. CEC 10^{-6} ve 10^{-4} M konsantrasyonlarda kullanıldı. 10^{-6} M konsantrasyonda CEC, NA yanıtlarını çok az etkilerken 10^{-4} M konsantrasyon non-kompetitif olarak antagonize etmektedir (Şekil 4.13). Bu inhibisyona ait afinite konstantları tablo 4.4’de belirtilmektedir. Tastrominin 10^{-4} M konsantrasyondaki inhibitör etki kalıbının, 10^{-4} M CEC inhibisyon kalıbına benzediği görülmektedir (Şekil 4.12).

Ayrıca tastrominin bu organa uygulanması sırasında, organda kontraksiyona neden olduğu belirlendi. Buradan hareketle tastrominin beş değişik konsantrasyonuyla doz-cevap eğrisi çıkarıldı. Bu doz-cevap eğrileri prazosin varlığında tekrarlandı (Şekil 4.14). Tastrominin bu organdaki agonist afinite konstantı tablo 4.1’de prazosinin tastromin yanıtlarına karşı antagonistik etkisine ilişkin afinitekonstantı tablo 4.6’da görülmektedir.

4.1.1.4. İleum Deneyleleri

Sıçan ileumunda agonist olarak Ach ve KCl kullanıldı ve bu agonistlere karşı doza bağımlı kontraktıl yanıtlar elde edildi. Her iki agonist için hesaplanmış olan agonist afinite konstantları tablo 4.1’de verilmiştir. Sıçanlardan alınan izole ileum üzerinde denenen tastromin dozları gevşemeye neden olmaktadır. Diğer organlarda kullanılan 10^{-5} , 5×10^{-5} ve 10^{-4} M tastromin dozları varlığında Ach cevapları alındı. Bütün tastromin dozlarında, Ach cevaplarının belirgin bir şekilde düştüğü belirlendi (Şekil 4.15). Bu inhibisyona ilişkin afinite konstantı tablo 4.2’de verilmiştir.

Bu deneyleler KCl içinde tekrarlandı. Şekil 4.16’da görüldüğü gibi KCl cevaplarını non-kompetitif olarak etkilediği sonucuna varılabilir (Tablo 4.2).

4.2. İn vivo Deneyler

4.2.1. Kan Basıncı Deneyleri

Dişi ve erkek sıçanlarda yapılan kan basıncı deneylerinde tastrominin 1.25×10^{-3} , 1.25×10^{-2} ve 6.25×10^{-2} mg/kg, dozları denendi. Daha yüksek dozlarda hayvanlar kan basınçlarının düşmesi sonucu öldüler. Denediğimiz dozlarda ise kan basıncında doza bağlı bir düşüş gözlemlendi (Şekil 4.17). Deney hayvanına propranolol (1mg/kg) verildikten sonra alınan sonuçlarda bir farklılık görülmedi.

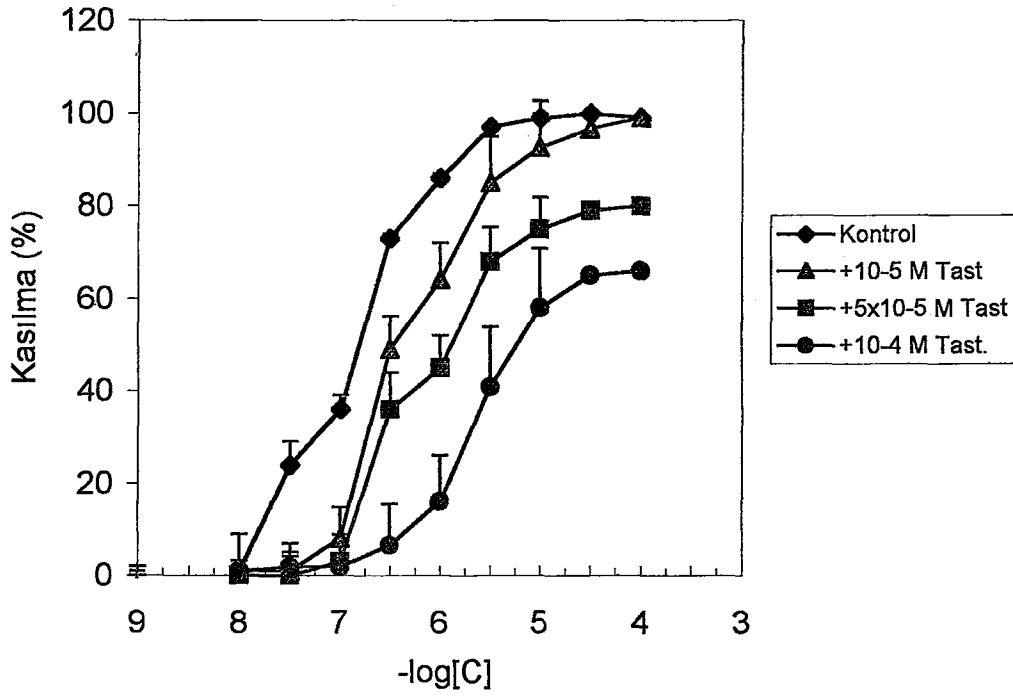
4.2.2. Analjezi Deneyleri

Albino fareler kullanılarak yapılan analjezi deneyleri tastrominin 100, 200 ve 400mg/kg'lık dozlarında denendi. Bütün tastromin dozlarında hayvanlarda aşırı derece tansiyon düşüklüğü, taşikardi ve halsizlik görüldü. Bu nedenle hayvanlar acıyı hissetmelerine rağmen dönüp damar pensini ısıramadılar. Sadece 100mg/kg'lık hayvanlarda reaksiyon alabildik ama bu cevaplarda anlamlı değildi.

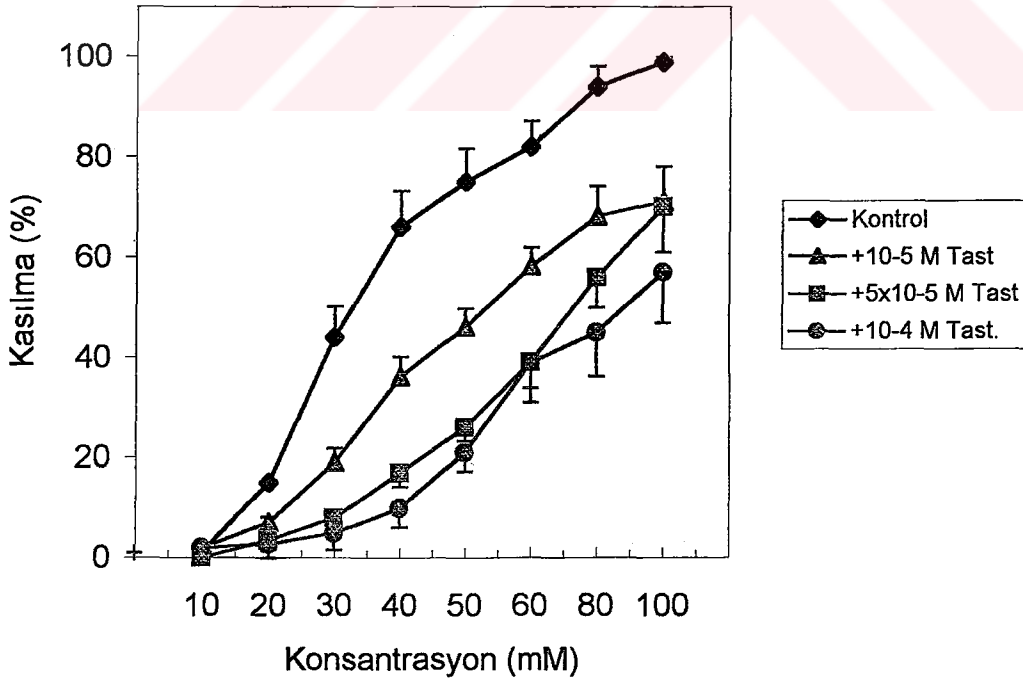
4.2.3. Akut Toksisite

Farelerde, tastrominin 100, 200 ve 400mg/kg'lık dozların akut toksisiteyi denendi. Bu deneylerde de bütün dozlarda hayvanlarda tansiyon düşüklüğü, taşikardi ve halsizlik görüldü. 400mg/kg grubundaki bütün hayvanlar öldü. 100 ve 200mg/kg doz denenen gruplarda ise sadece 1'er hayvan öldü. LD₅₀ değeri 210mg/kg olarak bulundu (Tablo 4.7).

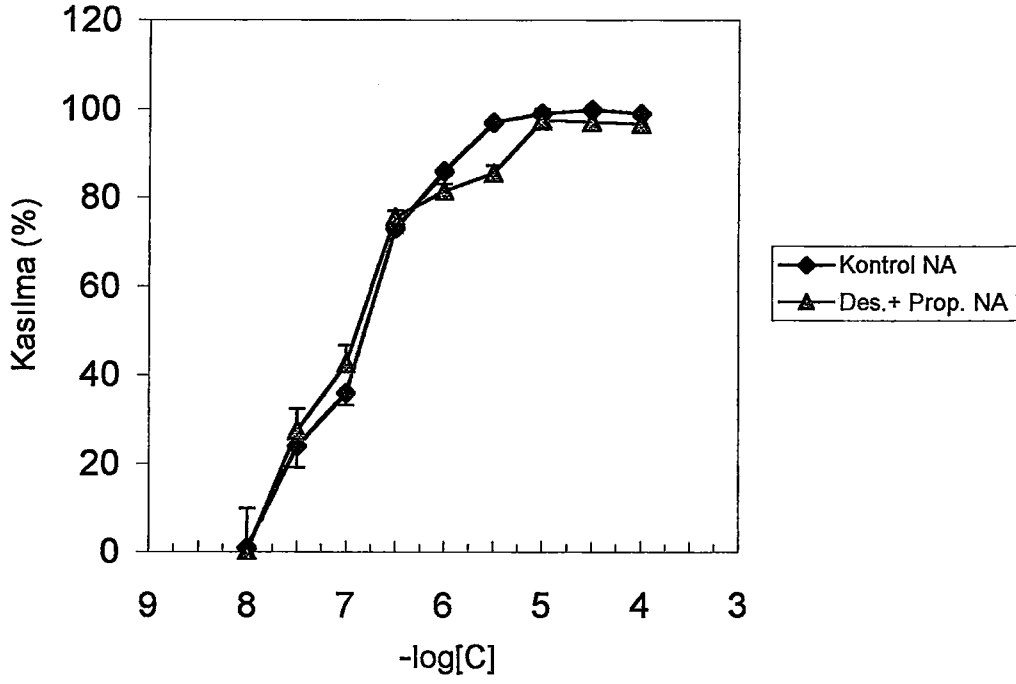
ŞEKİLLER VE TABLOLAR



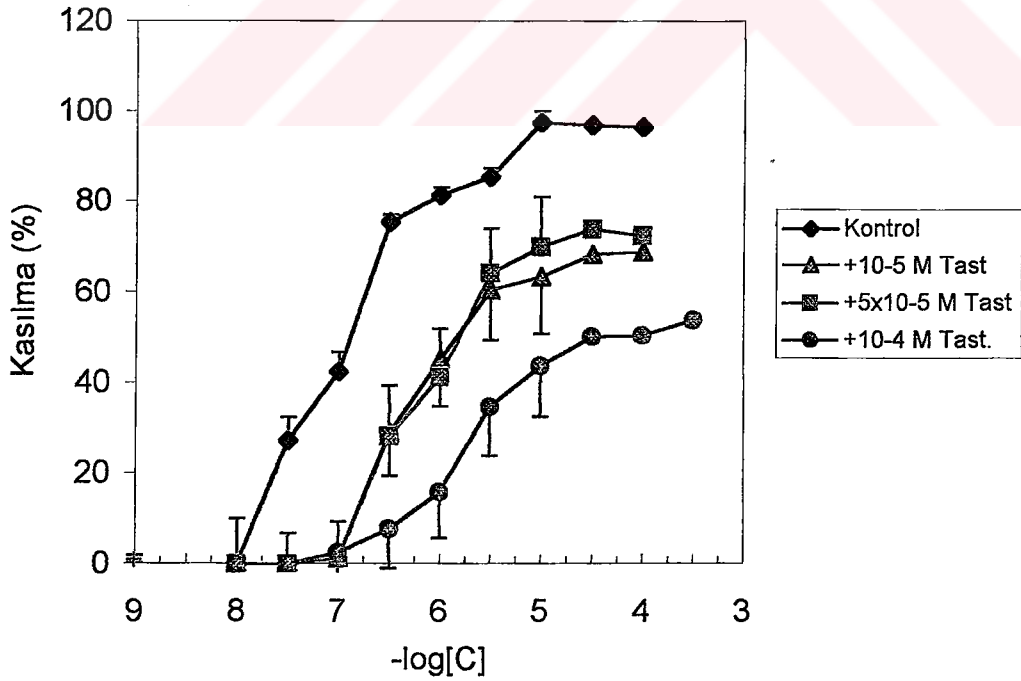
Şekil 4.1 Sıçan aortasında tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında noradrenalin yanıtları (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)



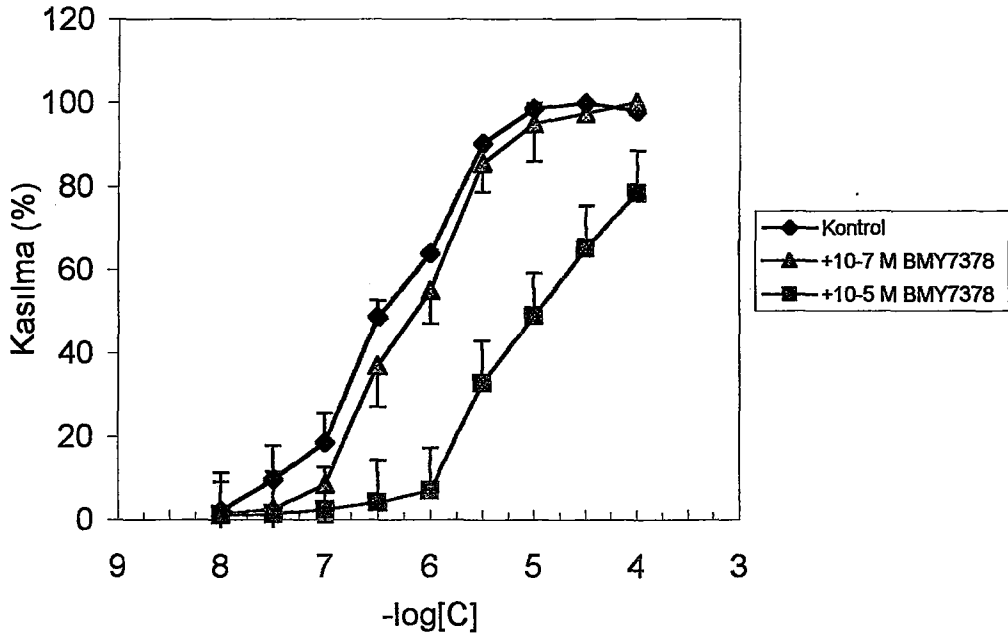
Şekil 4.2 Sıçan aortasında tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında KCl yanıtları (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)



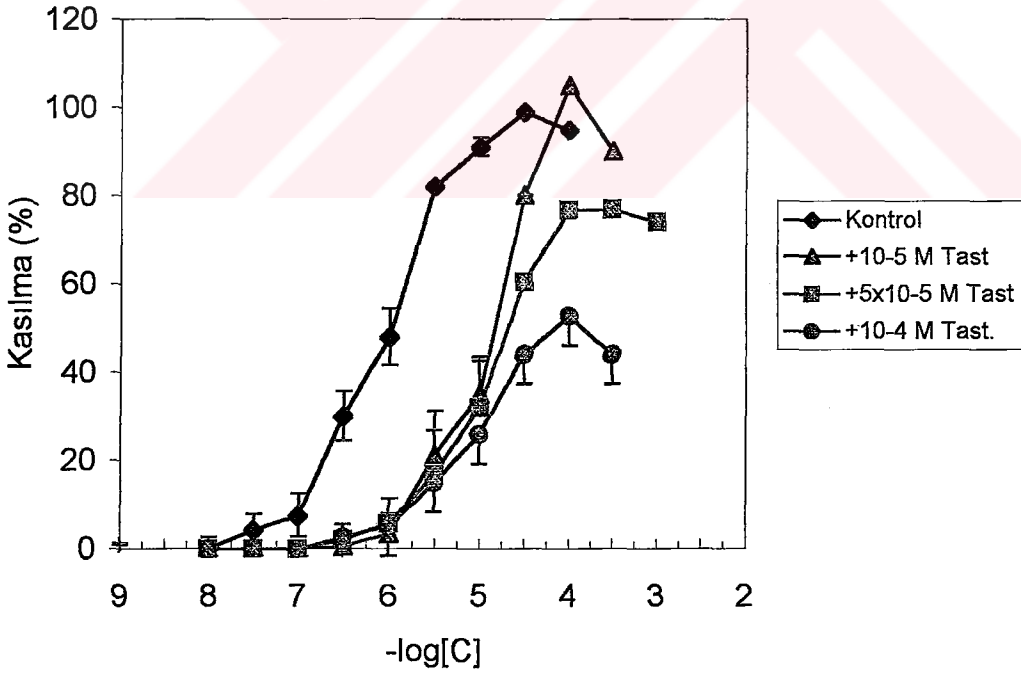
Şekil 4.3 Sığan aortasında propranolol (10^{-6}) + desipramin (10^{-7}) varlığında ve yokluğunda noradrenalin yanıtı (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)



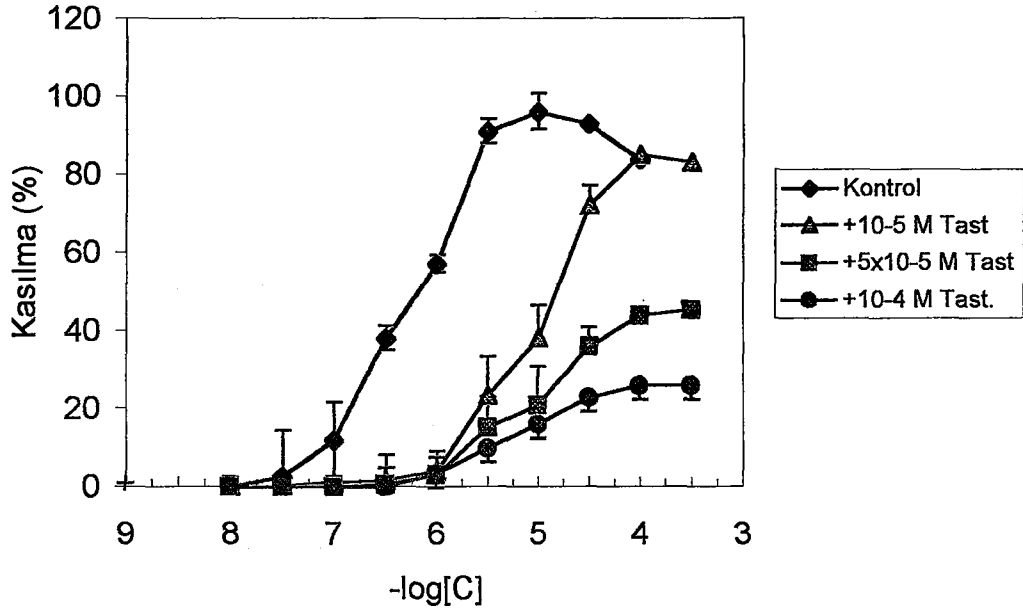
Şekil 4.4 Sığan aortasında propranolol (10^{-6}) + desipramin (10^{-7}) ve tastromin (10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 10^{-4} M) varlığında ve yokluğunda noradrenalin yanıtı (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)



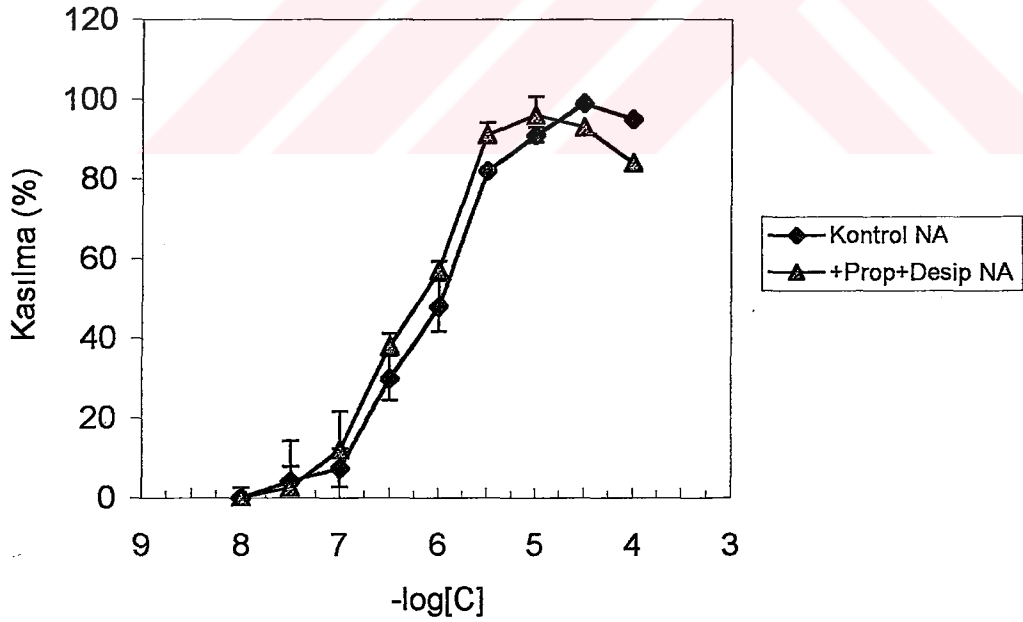
Şekil 4.5 Sıçan aortasında BMY 7378 varlığında ($10^{-7}M$, $10^{-5}M$) varlığında noradrenalin yanıtları (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)



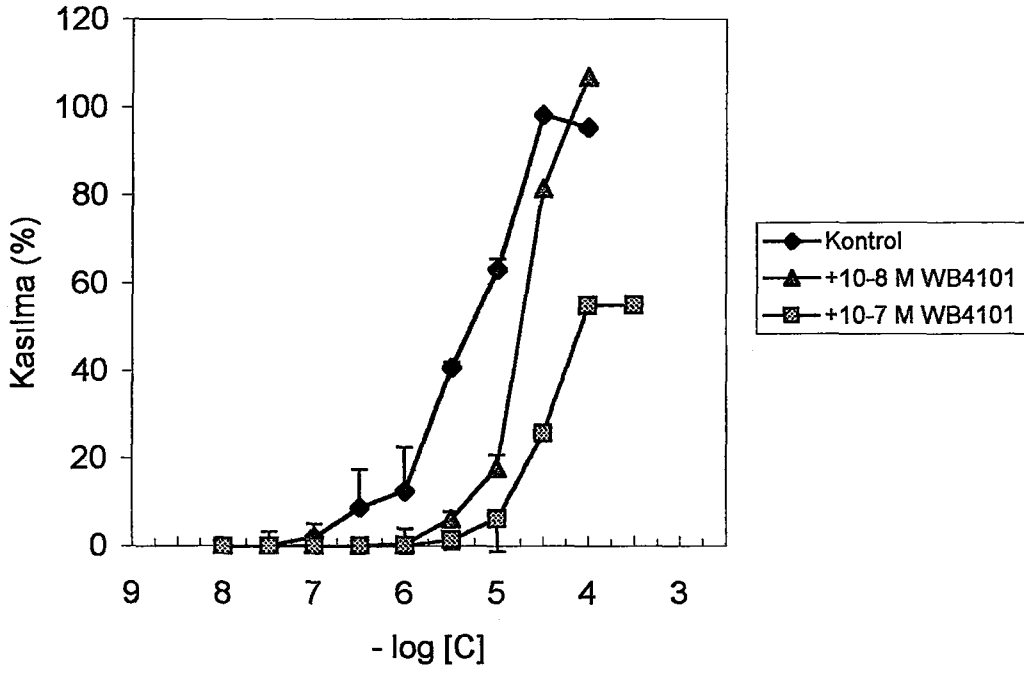
Şekil 4.6 Sıçan vas deferensinde tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında noradrenalin yanıtları (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)



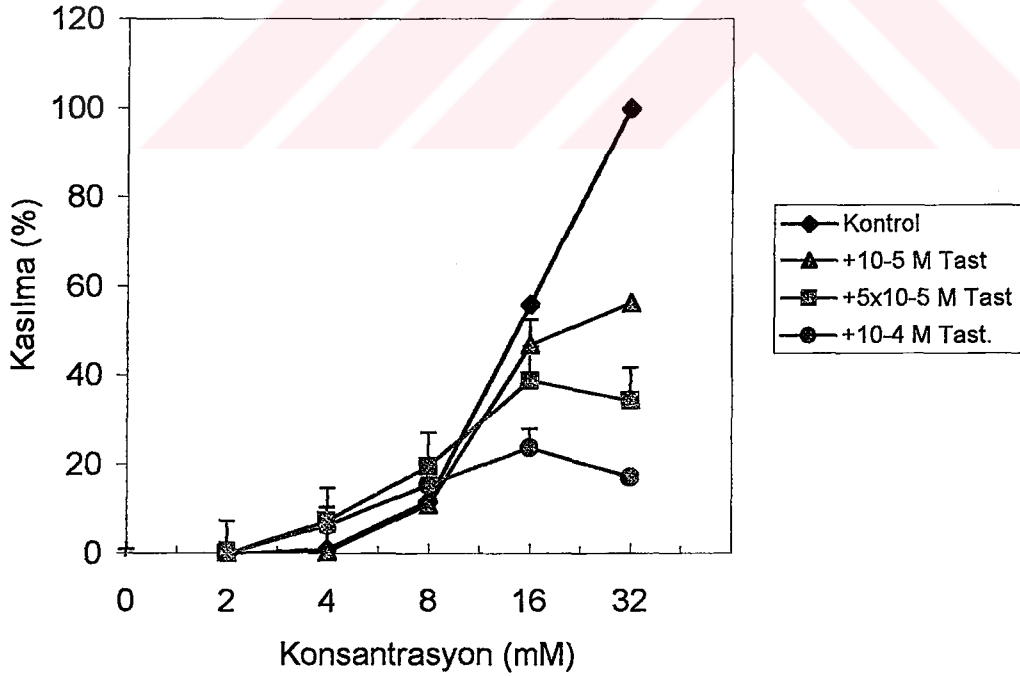
Şekil 4.7 Sıçan vas deferensinde propranolol (10^{-6}) + desipramin (10^{-7}) ve tastromin (10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 10^{-4} M) varlığında ve yokluğunda noradrenalin yanıtları (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)



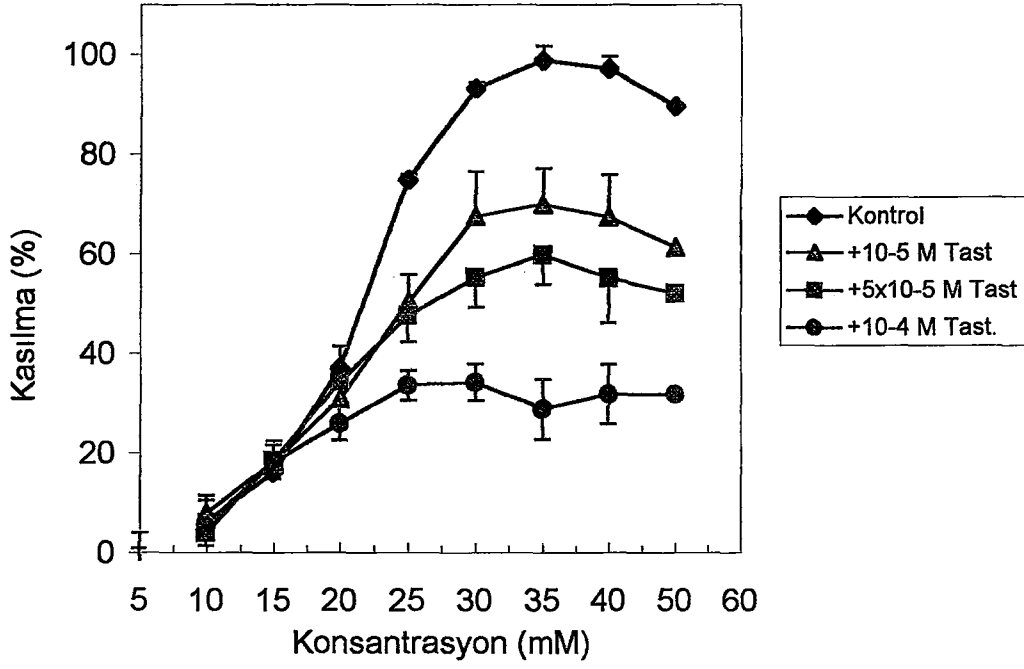
Şekil 4.8 Sıçan vas deferensinde propranolol (10^{-6}) + desipramin (10^{-7}) varlığında ve yokluğunda noradrenalin yanıtları (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)



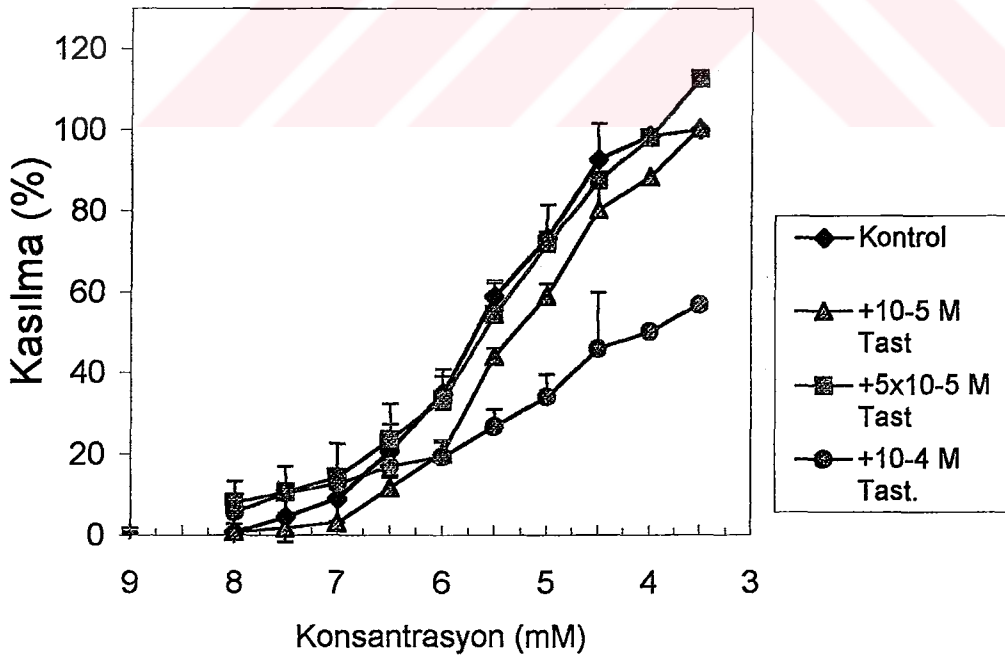
Şekil 4.9 Sıçan vas deferensinde WB4101 ($10^{-8}M$, $10^{-7}M$) varlığında noradrenalin yanıtları (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)



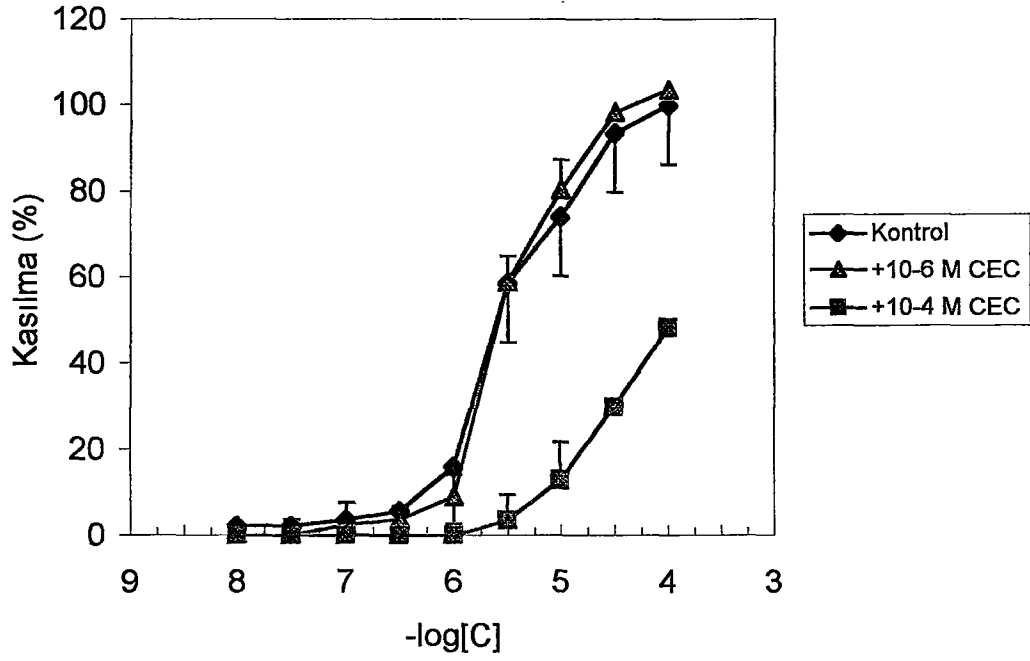
Şekil 4.10 Sıçan vas deferensinde tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında KCl yanıtları (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)



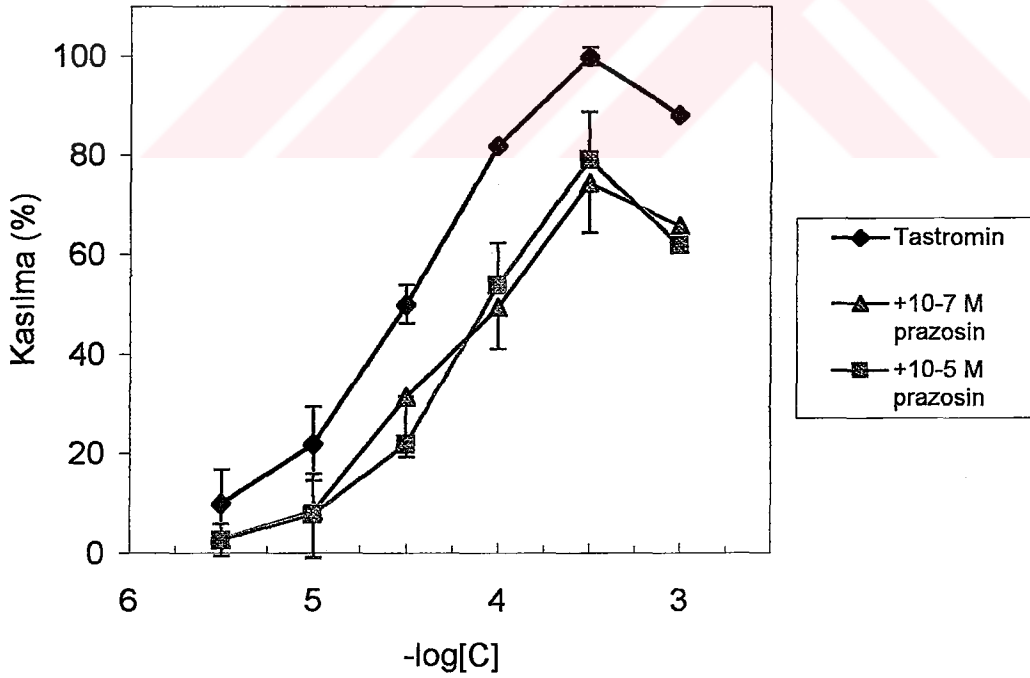
Şekil 4.11 Sıçan dalağında tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında KCl yanıtları (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)



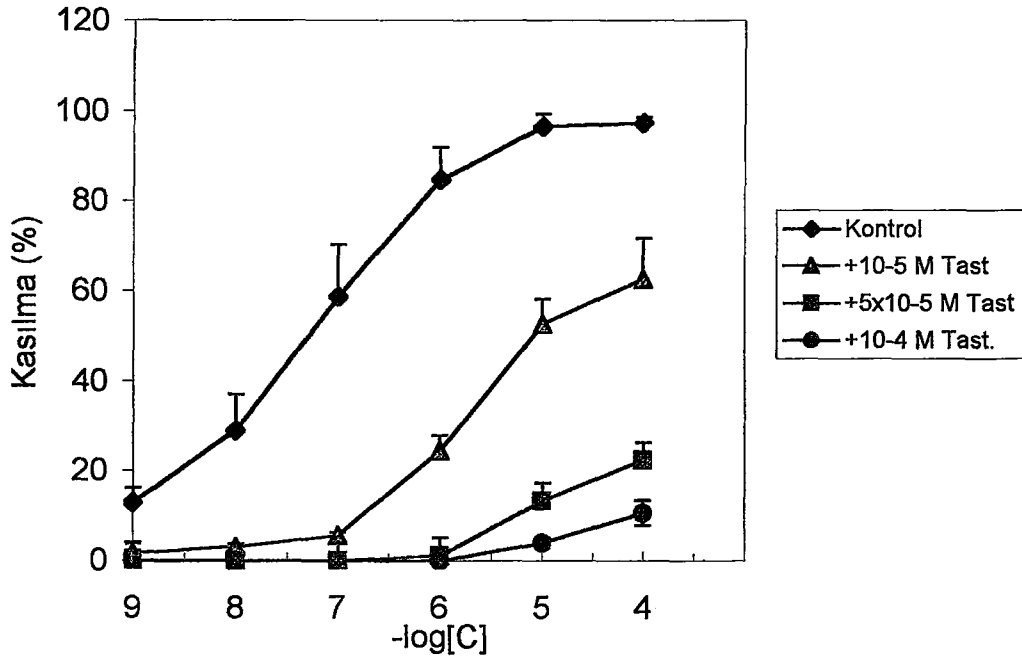
Şekil 4.12 Sıçan dalağında tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında NA yanıtları (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)



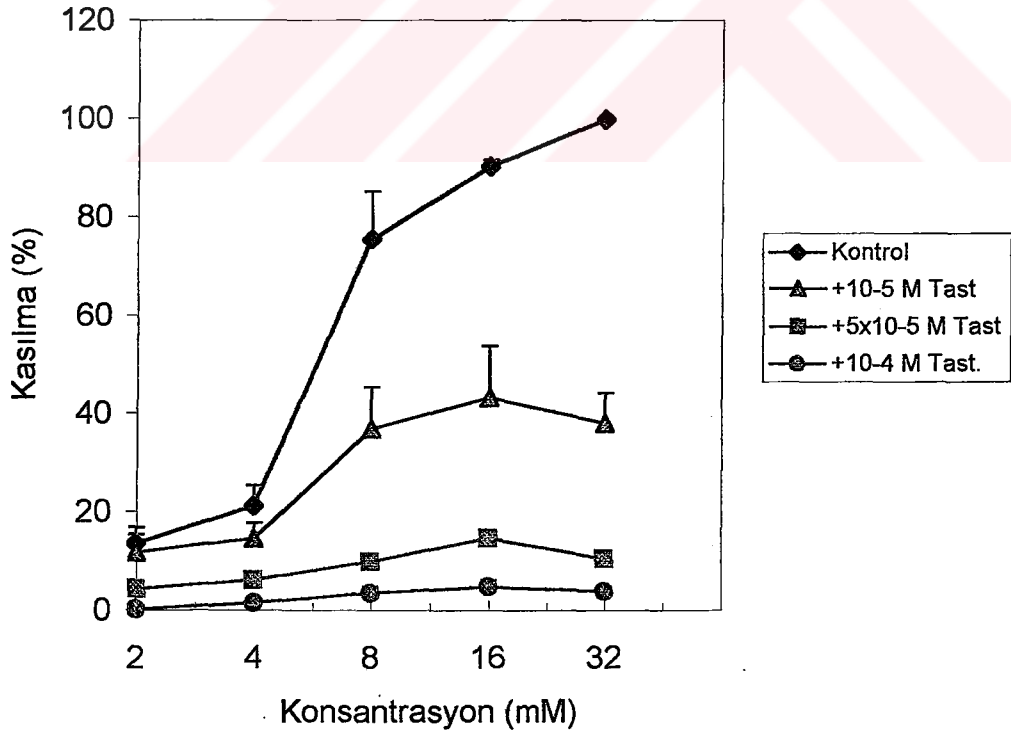
Şekil 4.13 Sıçan dalağında kloroetilklonidin(CEC) ($10^{-6}M$, $10^{-4}M$) varlığında noradrenalin yanıtları (Düsey barlar standart hatayı göstermektedir)



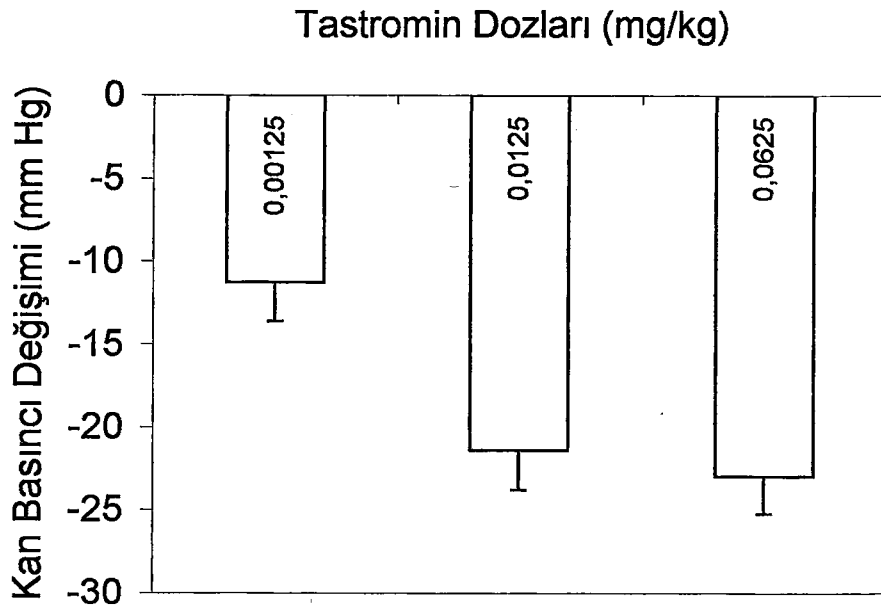
Şekil 4.14 Sıçan dalağında prazosin($10^{-7}M$, $10^{-5}M$) varlığında tasmomin yanıtları (Düsey barlar standart hatayı göstermektedir)



Şekil 4.15 Sıçan ilumunda tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında Ach yanıtları (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)



Şekil 4.16 Sıçan ileumunda tastromin ($10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$) varlığında KCl yanıtları (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)



Şekil 4.17 Sıçanlarda tastrominin meydana getirdiği kan basıncı değişimi (Düşey barlar standart hatayı göstermektedir)

Tablo 4.1 Agonistlerin sıçan aorta, vas deferens, dalak ve ileumundaki afinite konstantları (pD_2 değerleri \pm SEM, n: deney sayısı)

Deney Grubu	NA	KCl	Ach	Tastromin
Aorta	6.72 \pm 0.11 n:5	1.49 \pm 0.03 n:5	-	-
Vas deferens	5.91 \pm 0.10 n:5	1.87 \pm 0.03 n:5	-	-
Dalak	5.60 \pm 0.19 n:6	1.70 \pm 0.01 n:5	-	4.48 \pm 0.10 n: 5
İleum	-	2.20 \pm 0.05 n:5	7.35 \pm 0.29 n:5	-

Tablo 4.2 Tastromin'in çeşitli agonistlere karşı sıçan aorta, vas deferens, dalak ve ileumundaki inhibitör etkisi için afinite konstantları (\pm SEM, n: 5)

Deney Grubu (pD'_2)	NA	KCl	Ach
Aorta	$pD'_2=3.71\pm0.29$	$pD'_2=3.86\pm0.19$	-
Vas deferens	$pA_2=5.00$ $pD'_2=3.98\pm0.15$	$pD'_2=4.87\pm0.10$	-
Dalak	$pD'_2=3.98\pm0.15$	$pD'_2=4.11\pm0.11$	-
İleum	-	$pD'_2=5.21\pm0.11$	$pD'_2=4.90\pm0.22$

Tablo 4.3 Sıçan aortunda Propranolol (10^{-6}) + Desipramin (10^{-7}) varlığında ve yokluğunda NA agonist afinite konstantları

Deney Grubu	pD_2
Kontrol	6.72 ± 0.11
Desipramin+Propranolol	6.81 ± 0.23

Tablo 4.4 IUPHAR'ın reseptör sınıflandırmasına göre deney organı olarak seçilen organlarda alt reseptörlere spesifik antagonistlerin etkilerine ilişkin afinite konstantları

Organ/Antagonist	Afinite Konstantı
Aorta/BMY 7378	$pA_2=6.27$
Vas deferens/WB4101	$pA_2=8.00$ $pD'_2=6.87 \pm 0.14$
Dalak/CEC	$pD'_2=4.03 \pm 0.16$

Tablo 4.5 Sıçan vas deferensinde Propranolol (10^{-6})+Desipramin (10^{-7}) varlığında ve yokluğunda NA agonist afinite konstantları

Deney Grubu	pD_2
Kontrol	5.91 ± 0.10
Desipramin+Propranolol	6.13 ± 0.12

Tablo 4.6 Sıçan dalağında kontraktıl tastromin yanıtlarına karşı prazosinin antagonistik etkisine ilişkin afinite konstantı($pD_2 \pm SEM$, n:5)

Deney (pD'_2)	Tastromin
Dalak	6.54 \pm 0.23

Tablo 4.7 Tastrominin farelerde akut toksisite sonuçları

Grup	n	Süre (saat)	Dozlar(mg/kg)	Mortalite
1	3	48	100	1
2	3	48	200	1
3	3	48	400	3

5. TARTIŞMA

Eski yıllarda ilaç olarak geliştirmek amacıyla incelenen bir madde olan tastromin günümüzde herhangi bir terapötik kullanıma sahip değildir. Geçmişte bu madde sempatik (adrenerjik) sistem üzerine etkileri nedeniyle araştırılmış bu maddenin son yıllarda değişen adrenerjik reseptör bilgileri ışığında farmakolojik yönden araştırılması bu tez kapsamında amaçlanmıştır. Bu tür bir değerlendirme farmakoloji açısından yeni değildir. Geçmişte uyku ilacı olarak kullanılıp mutajenik ve teratojenik etkileri nedeniyle terapötik kullanımına son verilen talidomidin de bu tarz bir farmakolojik incelemesi yapılmış ve birazda tesadüf eseri yeni bir terapötik kullanım alanı bulunmuştur.

Talidomidin uzun yıllar sonra immünomodülatör özellikleri saptanmış ve lepra komplikasyonlarının tedavisi amacı ile terapötik kullanımı gündeme gelmiştir (Medical Science Bulletin).

Farmakolojik bir değerlendirme (reevaluation) çalışması olan bu tez kapsamında tastrominin çeşitli izole organlardaki etkileri ile bazı in vivo deney sistemlerindeki aktiviteleri ele alınmıştır. İzole organların seçiminde organların α_1 -adrenerjik reseptör baskınlığı göz önüne alınmıştır. Şöyleki; sıçan aortu α_{1D} -adrenerjik reseptör (Aboud, *et al.*, 1993), vas deferens α_{1A} -adrenerjik reseptör (Burt, *et al.*, 1995) ve dalak α_{1B} -adrenerjik reseptör (Burt, *et al.*, 1995) bakımından zengin dokular olduğu için bu çalışmada kullanılmıştır.

Tastromin'in adrenerjik reseptörler üzerindeki etkisinin spesifitesini belirlemek için; KCl'de tıpkı NA gibi bu dokularda agonist olarak kullanılmıştır.

Bilindiği gibi, izole düz kas preparatlarında KCl ile oluşan kasılmalara herhangi bir reseptör aracılık etmemekte, ancak bu kasılmalar voltaj-işletimli Ca^{2+} kanallarının uyarılması ile hücre içine giren Ca^{2+} tarafından oluşturulmaktadır.

Bulgularımıza göre; tastromin spesifik bir adrenerjik reseptör blokeri gibi gözükmemektedir. Çünkü yukarıda belirtilen izole organların hiç birinde NA ile kompetitif bir etkileşim göstermemiştir. Yalnızca vas deferensde 10^{-5} M dozda NA doz yanıt eğrisini sağa kaydırmış ancak artan tastromin dozlarında bu kayma kaybolmuştur (Şekil 4.6). Bu noktadan hareketle tastrominin daha çok non-

spesifik bir etkiye sahip olduğunu ve çok büyük bir olasılıkla da bu non-spesifik etkinin hücre içi Ca^{2+} metabolizması ile ilişkisi olduğu anlaşılmaktadır.

Aslında α -adrenerjik blokörlerle Ca^{2+} girişi arasında sıkı bir bağlantı dikkat çekmektedir. Daha önce yapılmış bir çalışmada non-spesifik α -adrenerjik antagonistler olan tolazolin ve fentolaminin izole duedonum preparatında Ca^{2+} antagonistik etkileri saptanmıştır. .Bu nedenle tastrominin Ca^{2+} antagonistik etkisi sürpriz olarak kabul edilmemelidir.

NA'nin tüm bu izole organlarda α_1 -adrenerjik reseptörler aracılığı ile oluşturduğu etkilerde sinyal iletim mekanizmasından sorumlu ortak ana mekanizma hücre içi serbest Ca^{2+} konsantasyonlarının artmasıdır (Zhong and Minneman, 1999). Ancak tastrominin hücre içi Ca^{2+} metabolizması üzerindeki muhtemel etkisi yapılacak ilave deneylerle desteklenmelidir.

Tastromin'in ilginç bir özelliği de izole dalak preparatı ile yapılan deneyler sırasında ortaya çıkmıştır. Her ne kadar bu preparatta NA'e karşı antagonistik etkiler gösterdiyse de (Şekil 4.12) tek başına bu preparatta kontraktıl aktivite de göstermiştir (Şekil 4.14). Non-spesifik bir α -adrenerjik blokör olan (Langer, 1999, Kayaalp, 1998) prazosin bu kasılmaları antagonize etmektedir. İzole dalakta elde edilen bu bulguların tümü birlikte değerlendirildiğinde tastrominin α_{1B} -adrenerjik reseptörler üzerine (belirli düzeyde intrinsik) agonistik aktivite gösterdiği, yani parsiyel agonist gibi davrandığı anlaşılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar α -adrenerjik reseptörlerin nosiseptif/antinosiseptif etkilerde rol oynadığını ortaya koymuştur (Dickenson, and Besson, 1997). Bu noktadan hareketle çalışmamızda "tail-klip" ve "tail-immersion" yöntemleriyle tastrominin nosiseptif/antinosiseptif etkilerinin olup olmadığını araştırdık. Ancak, bu maddenin sözü edilen etkileri taşımadığını gördük. Bu deneyler sırasında daha başka santral ve refleksif etkilerin gözükmesi tastrominin ağrı ve analjezi mekanizmalarından daha farklı noktaları etkilediğini göstermektedir.

Bu denli non-spesifik ve nispeten toksisitesi yüksek bir maddenin oluşturduğu bu etkilerde şaşırtıcı değildir. Ayrıca, beklediğimiz gibi sıçanlarda kan basıncı üzerinde hipotansif etkiler görüldü.

Sonuç olarak, tastroinin deneysel farmakoloji açısından ilginç etkilerinin bulunmasına karşın, akut letal toksisitesinin de dūřuk olmaması nedeniyle terapötik açıdan yeni bir indikasyon alanının olamayacağını söyleyebiliriz.



6. KAYNAKLAR

ABOUD, R., SHAFII, M., DOCHERTY, J.R.: Investigation of the subtypes of alpha1-adrenoceptor mediating contractions of rat aorta, vas deferens and spleen. *Br. J. Pharmacol.*, **109**:80-87, 1993.

AHLQUIST, R.P.: A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* **153**: 586- 600, 1948

ARIENS, E.J., VAN ROSSUM, J.M.: pD_x, pA_x and pD'_x values in analysis of pharmacodynamics. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **110**: 275-299, 1957.

ARUNLAKSHANA, O., SCHILD, H.O.: pA, a new scale for the measurement of drug antagonism. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **14**: 48-58, 1959.

AYDIN, S., BEİS, R., ÖZTÜRK, Y., BAŞER, K.H.C.: Nepetalactone: A new opioid analgesic from *Nepeta caesarea* Boiss. *J. Pharm. Pharmacol.* **50**: 813-817, 1998

AYDIN, S.: Adrenerjik reseptörlere etkili bileşikler. *TBAM ve Eczacılık Fakültesi Aılış Yıldönümü Seminerleri Özet Kitabı*, s: 83-86, 1995.

BEELEY, L.J., BERGE, J.M., CHAPMAN, H., HIEBLE, P., KELLY, J., NASELKY, D.P., ROCKELL, C.M. AND YOUNG, P.N.: Synthesis of a selective alpha 2A adrenoceptor antagonist, BRL48962, and its characterization at cloned human alpha adrenoceptors. *Bioorganic Med. Chem. Chem.* **3**:1693-1698, 1995.

BOER, R., GRASSEGER, A., SCHUDT, C., GLOSSMANN, H.: (+)-Niguldipine binds with very high affinity to Ca²⁺ channels and to a subtype of alpha 1-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* **172**: 131-145, 1989.

BUN-ICHI, H.: The effect of adrenaline on the electrical state of the spleen.. *Arch. Exptl. Path. Pharmacol.* **181**: 367-75, 1936. *Chem. Abstr.*, **30**: 6823, 1936.

BURT, R.P., CHAPPLE, C.R. AND MARSHALL, I.: Evidence for a functional α_{1A} -(α_{1C}) adrenoceptor mediating contraction of rat vasdeferens and an α_{1B} -adrenoceptor mediating contraction of the rat spleen. *Br. J. Pharmacol.* **115**: 467-475, 1995

BUZAS, A., TESTE, J., FROSSARD, J.: Ethers of thymol and carvacrol. *Bull. Soc. Chim. France*, 839-49, 1959. *Chem. Abstr.*, **54**: 14167a, 1960.

BYLUND, D.B., EIKENBERG, D.C., HIEBLE, J.P., LANGER, S.Z., LEFKOWITZ, R.J., MINNEMAN, K.P., MOLINOFF, P.B., RUFFOLO, R.R.

JR. AND TRENDELENBURG, U.: IV. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* **46**: (2): 121-136, 1994.

BYLUND, D.B., RAY-PRENGER, C. AND MURPHY, J.J.: Alpha-2A and alpha-2B adrenergic receptor subtypes: antagonist binding in tissues and cell lines containing only one subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**: 600-607, 1988.

BYLUND, D.B.: Subtypes of α_1 and α_2 adrenergic receptors. *FASEB J.* **6**: 832-839, 1992.

BYLUND, D.B.: Subtypes of α_2 -adrenoceptors: Pharmacological and molecular biological evidence converge. *TIPS.* **9**: 356-61, 1988.

CAULFIELD, M.P., BIROSALL, N.J.M.: International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *J. Pharmacol. Rev.*, **50**(2): 279-90, 1998.

CHEUNG, Y.D., BARNETT, D.B., NAHORSKI, S.R.: [^3H] Rauwolscine [^3H] yohimbine binding to rat cerebral and human platelet membranes, possible heterogeneity α -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* **84**: 79-85, 1982.

COTECCHIA, S., SCHWINN, D.A., RANDALL, R.R., LEFKOWITZ, R.J., CARON, M.G. AND KOBILKA, B.K.: Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 -adrenergic receptor *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 7159-7163, 1988.

CREDNER, K., GRAEBNER, R.: Sympathikolytische Eigenschaften einiger Thymolather. *Arzn.-Forsch.*, **17**(3): 305-9, 1967.

CREDNER, K.: Untersuchungen über die zentral-dampfenden Eigenschaften einiger Thymolather. *Arzn.-Forsch.*, **10**: 170-74, 1960.

D'AMOUR, F.E., SMITH, D.L.: A method for determining loss of pain sensation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **72**: 74-79, 1941.

DICKENSON, A. AND BESSON, J.M.: The Pharmacology of Pain. *Handbook of Experimental Pharmacology* **130**, Chap.15, Springer, 1997.

DOCHERTY, J.R., MCGRATH, J.C.: A comparison of pre- and postjunctional potencies of several alpha-adrenoceptor agonists in the cardiovascular system and anococcygeus muscle of rats: evidence for two types of postjunctional alpha-adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **312**: 107-116, 1980.

DOCHERTY, J.R.: Subtypes of functional α_1 - and α_2 -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* **361**: 1-15, 1998.

- DREW G.M. AND WHITING S.B.: Evidence for two distinct types of postsynaptic α -adrenoceptor in vascular smooth muscle *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* **67**: 207-215, 1979.
- EGLIN, R.M., HEDGE, S.S. AND WATSON, N.: Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol. Rev.*, **48**(4): 531-565, 1996.
- ELTZE, M.: Functional evidence for an alpha 1B-adrenoceptor mediating contraction of the mouse spleen. *Eur. J. Pharmacol.*, **311**(2-3): 187-98, 1996.
- FAGURA, M.S., LYDFORD, S.J. & DOUGALL J.G.: Pharmacological classification of α_1 adrenoceptor mediating contractions of rabbit isolated ear artery: comparison with rat isolated thoracic aorta. *Br. J. Pharmacol.* **120**: 247-258, 1997.
- FLAVAHAN, N.A. AND VANHOUTTE, P.M.: α_1 Adrenoceptor subclassification in vascular smooth muscle. *TIPS*. **7**: 347-49, 1986.
- FOGLAR, R., SHIBATA, K., HORIE, K., HIROSAWA, A., TSUJIMOTO, G.: Use of recombinant alpha 1-adrenoceptors characterize subtype selectivity of drugs for the treatment of prostatic hypertrophy. *Eur. J. Pharmacol.* **288**: 201-207, 1995.
- FORD, A.P., WILLIAMS, T.J., BLUE, D.R., CLARKE, D.E.: Alpha 1-adrenoceptor classification: sharpening Occam's razor. *TIPS*, **15**: 167-170, 1994.
- FRENCH, N.: Alpha 2-adrenoceptors and I2 sites in the mammalian central nervous system. *Pharmacol. Ther.* **68**(2): 175-208, 1995.
- GALLITZKY, J., LANGIN, D., VERWAERDE, P., MONTASTRUC, J. L., LAFONTAN, M. AND BERLAN, M.: Lipolytic effects of conventional β_3 -adrenoceptor agonists and of CGP12177 in rat and human fat cells: preliminary pharmacological evidence for a putative β_4 -adrenoceptor. *Br. J. Pharmacol.* **122**: 1244-1250, 1997.
- GANONG, W. F.: Review Medical Physiology. 19th. Ed., Appleton&Lange, Stamford, Connecticut, 1999.
- GLEASON, M. M. AND HIEBLE, J. P.: The α_2 -adrenoceptors of the human retinoblastoma cell line (Y79) may represent an additional example of the α_{2C} -adrenoceptor. *Br. J. Pharmacol.* **107**: 222-225, 1992.
- GOETZ, A.S., KING, H. K., WARD, S. D. C., TRUE, T. A., RIMELE, T. J., SAUSSY, D. L.: BMY 7378 is a selective antagonist of the D subtype of α_1 -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* **272**, R5-R6, 1995.

GOODMAN AND GILMAN'S The Pharmacological Basis of Therapeutics (CD), McGraw-Hill Com. Inc. 1996.

GRAHAM, R.M., PEREZ, D.M., HWA J. AND PIASCIK, M.T.: Alpha-1 Receptor Subtypes-Molekular structure, Function and Signaling-. *Circ. Res.*, **78**: 737-749, 1996.

GROSS, G., HANFT, G., RUGEVICS, C.: 5-Methyl-urapidil discriminates between subtypes of the alpha 1-adrenoceptor. *Eur. J. Pharmacol.* **151**: 333-335, 1988.

GROSS et al.: Evidence for muscarinic M4 receptors mediating nonadrenergic noncholinergic relaxations in rabbit anococcygeus muscle. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **356**: 505-516, 1997.

GU, H., TRAJKOVIC, S., LABELLE, E.F.: Norepinephrine-induced phosphatidylcholine hydrolysis bay phospholipases D and C in rat tail artery. *Am. J. Physiol.* **262**: C1376-C1383, 1992.

HAN, C., ABEL, P.W., MINNEMAN, K.P.: Heterogeneity of alpha 1-adrenergic receptors revealed by chlorethyl clonidine. *Mol. Pharmacol.* **32**: 505-510, 1987a.

HAN, C., ABEL, P.W., MINNEMAN, K.P.: α_1 -Adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms increasing intracellular Ca^{+2} in smooth muscle. *Nature.* **329**: 333-335, 1987b.

HANCOCK, A.A.: α_1 -Adrenoceptor subtypes: a synopsis of their pharmacology and molecular biology. *Drug Development. Res.*, **39**: 54-107, 1996.

HARRISON, J.K., PEARSON, W.R., LYNCH, K.R.: Molecular characterization of α_1 -and α_2 -adrenoceptors. *TIPS.* **12**: 62-67, 1991.

HEAL, D.J., CHEETHAM, S.C., BUTLER, S.A., GOSDEN, J., PROW, M.R., BUCKETT, W.R.: Receptor binding and functional evidence suggest that postsynaptic alpha 2-adrenoceptors in rat brain are of the alpha 2D subtype. *Eur. J. Pharmacol.*, **277**: 215-21, 1995.

HEISE, A., KRONEBERG, G., SCHLOSSMAN, K.: α -Sympathicomimetische eigenschaften als ursache der blutdruckssteigernden und blutdruckenkennenden wirkung von BAY 1470. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **268**: 348-360, 1971.

HIEBLE, J.P. AND RUFFOLO, R.R, Jr.: Subclassification and nomenclature of α_1 -and α_2 -adrenoceptors. *Progses in Drug Res.* **47**: 81-130, 1996.

- HO, S. L., HONNER, V., DOCHERTY, J. R.: Investigation of the subtypes of α_2 -adrenoceptor mediating prejunctional inhibition in rat atrium and cerebral cortex. *Naunyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol.* **357**: 634-39, 1997.
- HORIE, K., ITOH, H., TSUJIMOTO, G.: Hamster alpha 1B-adrenergic receptor directly activates Gs in the transfected Chinese hamster ovary cells. *Mol. Pharmacol.* **48**:392-400, 1995a.
- HORIE, K., OBIKA, K., FOGAR, R., TSUJIMOTO, G.: Selectivity of the imidazoline alpha-adrenoceptor agonists (oxymetazoline and cirazoline) for human cloned alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.* **116**: 1611-1618, 1995b.
- HUSSAIN, M., MARSHALL, J.; Characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes mediating. *Br. J. Pharmacol.* **122**: 849-858, 1997.
- IUPHAR-The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification, 1998.
- KAUMAN, A. J.: Four B-adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *TIPS*, **18**(3): 70-76, 1997.
- KAYAALP O.: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, Cilt 2, 8.Baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara, 1998.
- KAYAALP, O.: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Cilt 2, 5. Baskı Feryal Matbaası, 1990.
- KENNY, B.A., CHALMERS, D.H., PHILPOTT, P.C. & NAYLOR, A.M.: Characterization of an α_{1D} -adrenoceptor mediating the contractile response of rat aorta to noradrenaline. *Br. J. Pharmacol.* **115**: 981-986, 1995.
- KNEPPER, S.M., BUCKNER, S.A., BRUNE, M.E., DEBERNARDIS, J.F., MEYER, M.D., HANCOCK, A.A.: A-61603, a potent alpha 1-adrenergic receptor agonist, selective for the alpha 1A receptor subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **274**: 97-103, 1995.
- KURODA, S., KOYOMA, S.: Compounds possessing uterus contracting action IV. Relationship between the chemical structure and uterine contracting action of phenoxyethylalkylamines. *J. Pharm. Soc. Japan*, **63**: 533-38, 1943. Chem.Abstr., **45**: 3351g, 1951.
- LANGER, S.Z.: Presynaptic refulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.* **23**: 1793-1800, 1974.
- LANGER, S.Z.: History and Nomenclature of α_1 -adrenoceptors. *Eur. Urol.*, **36** (suppl 1): 2-6, 1999.

LANGER, S.Z.: Presynaptic regulation of catecholamine release. *Br. J. Pharmacol.* **60**: 481-497, 1974.

LANIER, S. M., DOWNING, S., DUZIC, E. AND HOMEY, C. J.: Isolation of rat genomic clones encoding subtypes of the alpha-2 adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **266**: 10470-478, 1991.

LINK, R.E., DESAI, K., HEIN, L., STEVENS, M.E., CHRUSCINSKI, A., BERNSTEIN, D., BARSH, G.S., KOBILKA, B.K.: Cardiovascular regulation in mice locking alpha sub. 2-adrenergic receptor subtypes b and c. *Science*, **273**: 803-806, 1996.

LOMASNEY, J.W., COTECCHIA, S., LORENZ, W., LEUNG, W.Y., SCHWINN, D.A., YANG-FENG, T.L., BROWNSTEIN, M., LEFKOWITZ, R.J., CARON, M.G.: Molecular cloning and expression of the cDNA for the alpha 1A-adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome5. *J. Biol. Chem.* **266**: 6365-6369, 1991.

LORENZ, W., LOMASNEY, J.W., COLLINS, S., REGAN, J.W., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J.: Expression of three α_2 -adrenergic receptor subtypes in rat tissues: implications for α_2 -receptor classification. *Mol. Pharmacol.* **38**: 559-603, 1990.

LORKE, D.: A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.*, **54**: 275-287, 1983.

MACMILLAN, L. B., HEIN, L., SMITH, M. S., PIASCIK, M. T., LIMBIRD, L. E.: Central hypotensive effects of the alpha sub 2a-adrenergic subtype. *Science*, **273**: 801-803, 1996.

MARSHALL, I.; BURT, R. P. & CHAPPLE, C. R.: Noradrenaline contractions of human prostate mediated by alpha 1A-(alpha 1c)-adrenoceptor subtype *Br. J. Pharmacol.* **15**: 781-786, 1995.

MARSHALL, J. & HUSSAIN, M.B.: Characterization of α_1 adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.* **127**: 849-58, 1997.

Medical Science Bulletin, <http://pharminfo.com>

MERCK INDEX, 10th. Ed. p: 1304, Merck&co.Inc.Rahway N.J. USA., 1983

MERCK INDEX, 11th. Ed., Merck&co.Inc.Rahway N.J. USA., 1989

MICHEL, A.D., LOURY, D.N. AND WHITING, R.L.: Differences between the α_2 -adrenoceptor in rat submaxillary gland and the α_{2A} -and α_{2B} -adrenoceptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.* **98**: 890-897, 1989.

- MICHEL, A.D., LOURY, D.N. AND WHITING, R.L.: Assessment of imiloxan as a selective α_{2B} -adrenoceptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **99**:560-64, 1990
- MILLER, R.J.: Presynaptic receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**: 201-207, 1998.
- MINNEMAN, K.P.: Alpha1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell Ca^{2+} . *Pharmacol. Rev.* **40**:87-119,1988.
- MINNEMAN, K.P, HAN, C. AND ABEL, P.W.: Comparison of alpha1-adrenergic receptor subtypes distinguished by chloroethylclonidine and WB4101. *Mol. Pharmacol.* **33**: 509-514,1988.
- MORAN, N.C. AND PERKINS, M.E.: Adrenergic blockade of the mammalian heart by dichloro analogue of isoprenaline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **124**: 223-237, 1958.
- MORROW, A.L. AND CREESE, I.: Characterization of alpha-1 adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [3H]-WB4101 and [3H]-prazosin binding. *Mol. Pharmacol.* **29**: 321-330, 1986.
- MURAMATSU, I., OHMURA, T., KIGOSHI, S., HASHIMOTO, S. AND OSHITA, M.: Pharmacological subclassification of α_1 adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **99**: 197-201, 1990.
- MURAMATSU, I., OSHITA, M., OHMURA, T., KIGOSHI, S., AKINO, H., GOBARA, M., OKADA, K.: Pharmacological characterization of α_1 -adrenoceptors subtypes in the human prostate: functional and binding studies. *Br. J. Urol.* **74**: 572-578, 1995.
- MURPHY, T.J. AND BYLUND, D.B.: Characterization of alpha-2 adrenergic receptors in the OK cell, an opossum kidney cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244**: 571-578, 1988.
- MYCEK, M.J., HARVEY, R.A. AND CHAMPE, P.C., Çev.Edi. Prof. Dr. Şule Oktay, Çev. Dr. Pamir Atagündüz. *Farmakoloji*, Lippincott's Illustrated Review Serisi, 2. Baskı, Nobel Kitabevi, İstanbul, 1998.
- NAGARATHNAM, D., WETZEL, J.M., MIAO, S.W., MARZABADI, M.R., CHIU, G., WONG, W.C., HONG, X., FANG, J., FORRAY, C., BRANCHEK, T. A., HEYDORN, W.E., CHANG, R. S. L., BROTON, T., SCHORN, T. W., GLUCHOWSKI, C.: Design and synthesis of novel alpha-1a adrenoceptor-selective dihydropyridine antagonists for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J. Med. Chem.* **41**: 5320-5333, 1998.

- NEVE, K.A., MCGONIGLE, P. AND MOLINOFF, P.B.: Quantitative analysis of the selectivity of radioligands for subtypes of β -adrenergic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **238**: 46-53, 1986
- NICHOLAS, A.P., HÖKFELT, T. AND PIERIBONE, V.A.: The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *TIPS*, **17**:7, 245-55, 1996
- NOBLE, A.J., CHESS-WILLIAMS, R., COULDWELL, C., FURUKAWA, K., UCHYIUMA T., KORSTANJE, C., CHAPPLE, C.R.: The effects of tamsulosin, a high affinity antagonist at functional α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.* **120**: 231-238, 1997.
- OKAZAKI, T.: Pharmacological actions of thymol (dimethylamino) ethylether, especially its ergotamine-like action. *Japan J. Med. Sci.*, IV, *Pharmacol*, **6**, 133-136, 1932. *Chem. Abstr.*, **26**: 5345, 1932.
- PARKINSON, N.A.; HUGES, A.D.: The Mechanism of action of α_2 -adrenoceptors in human isolated subcutaneous resistance arteries. *Br. J. Pharmacol.* **115**: 1463-1468, 1995.
- PEREZ, D.M., DEYOUNG, M.P., GRAHAM, R.M.: Coupling of expressed α_{1B} and α_{1D} -adrenergic receptors to multiple signaling pathways is both G-protein and cell type specific. *Mol. Pharmacol.* **44**: 784-795, 1993
- PEREZ, D.M., PIASCÍK, M.T., GRAHAM, R.M.: Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha1D-adrenergic receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* **40**: 876-883, 1991
- PERRY, W.L.M.: *Pharmacological Experiments on Isolated Preparations*. Second Edition, University of Edinburgh, Edinburgh and London, 1970.
- PIASCÍK, M.T., GUARINO, R.D., SMITH, M.S., SOLTIS, E.E., SAUSSY, D.L., PEREZ, D.M.: The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**: 1583-1589, 1995.
- POWELL, C. E. AND SLATER, I. H.: Blocking of inhibitory adrenergic receptors by a dichloro analog of isoprenaline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **122**: 480-488, 1957.
- PRICE, D.T., LEFKOWITZ, R.J., CARON, M.G., BERKOWITZ, D., SCHWINN, D.A.: Localization of mRNA for three distinct alpha1-adrenergic receptors subtypes in human tissues: implications for human alpha adrenergic physiology. *Mol. Pharmacol.* **45**: 171-175, 1994
- REGAN, J.W., KOBILKA, T.S., YANG-FENG, T.L., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J. AND KOBILKA, B.K.: Cloning and expression of a

human kidney cDNA for α_2 -adrenergic receptor subtype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 6301-305, 1988.

REINHARD, J.F., KIMURA, E.T., SCUDI, J.Y.: Antispasmodik and local anesthetic activity of dimethylaminoethylsubstituted compounds. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **103**: 288-92, 1951.

REMAURY, A. AND PARIS, H.: The insulin-secreting cell line RIN m5F, expresses an alpha-2D adrenoceptor and nonadrenergic idazoxan-binding sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260**: 417-426, 1992.

ROBINSON, E. AND HUDSON, A.: Adrenoceptor Pharmacology. *TOCRIS* 1998.

ROKOSH, D.G., BAILEY, B.A., STEWART, A.F., KARNS, L.R., LONG, C. S., SIMPSON, P.C.: Distribution of alpha 1C-adrenergic receptors mRNA in adult rat tissues by RNase protection assay and comparison with alpha 1B and alpha 1D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**: 1177-1184, 1994.

RUAN, Y., KAN, H., PARMENTIER, J-H., FATIMA, S., ALLEN, L.F., MALIK, K.U.: Alpha-1A-adrenergic receptor stimulation with phenylephrine promotes arachidonic acid release by activation of phospholipase D in rat-1 fibroblasts: inhibition by protein kinase. *A. J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**: 575-585, 1998.

RUFFOLO, R.R., JR., BONGINELL, W., KU T., NASELSKY, D.P., HIEBLE, J.P.: Alpha-1 adrenoceptor: pharmacological classification and newer therapeutic applications. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **38**: 121-6, 1995.

RUFFOLO, R.R. Jr., NICHOLS, A.J., STADEL, J.M AND HIEBLE, J.P.: Structure and function of α -Adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* **43**(4): 475-505, 1991.

SALLINEN J., LINK R. E., HAAPALINNA, A., VIITAMAA T., KULATUNGA., M., SJÖHOLM B., MACDONALD, E., PELTO-HUIKKO M, LEINO T, BARSH, G.S., KOBILKA B.K., SCHEININ, M.: Genetic alteration of alpha 2C-adrenoceptor expression in mice: influence on locomotor, hypothermic, and neurochemical effects of dexmedetomidine, a subtype-nonspecific alpha 2-adrenoceptor agonist. *Mol. Pharmacol.*, **51**:36-46,1997.

SARSERO, D., MOLENAAR, P. AND KAUMANN, A.J.: Validity of (-)-[³H]-CGP 12177A as a radioligand for the 'putative beta4-adrenoceptor' in rat atrium. *Br. J. Pharmacol.* **123**: 371-380, 1998.

SAUSSY, D.L, GOETZ, A.S, KING, H.K&TRUE, T.A.: BMY 7378 is selective antagonist of α_{1D} -adrenoceptors(AR): further evidence that vascular

α_{1D} -AR are of the -subtype. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72(Suppl): P.13.1.008, 1994.

SCALES, M.D.C.: Implications of recommendations from the International Conference on Harmonization (ICH) for the safety evaluation of new medicines involving animal studies for the industry. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.*, 11: 5-12, 1992.

SCHWINN, D.A., LOMASNEY, J.W., LORENZ, W., SZKLUT, P.J., FREMEAU, R.T., Jr., YANG-FENG, T.L., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J., COTECCHIA, S.: Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype. *J. Biol. Chem.*, 265: 8183-8189, 1990.

SCMAUSS, C., YAKSH, T.L.: In vivo studies on spinal receptors systems mediating antinociception. II. Pharmacological profiles suggesting a differential association of mu, delta and kappa receptors with visceral chemical and cutaneous thermal stimuli in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228: 1-12, 1984.

SIMONNEAUX, V., EBADI, M. AND BYHIND, DB.: Identification and characterization of α_{2D} -adrenergic receptors in bovine pineal gland. *Mol. Pharmacol.* 40: 619-626, 1991.

STARKE K., MONTEL, H., SCHUMANN, J.J.: Influence of cocaine and phenoxybenamine on noradrenaline uptake and release. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.* 274: 18-45, 1971.

STARKE, K., MONTEL, H., GAYK, W. AND MERKER, R.: Comparison of the effects of clonidine on pre- and postsynaptic adrenoceptors in the rabbit pulmonary artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 285: 133-150, 1974.

STARKE, K., WAGNER, J., SCHUMANN, J.J.: Adrenergic neurone blockade with clonidine: comparison with guanethidine and local anesthetics. Influence of cocaine and phenoxybenamine on noradrenaline uptake and release. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 195: 291-308, 1972.

STONE, L.S., MACMILLAN, L.B., KITTO, K.E., LIMBIRD, L., WILCOX, G.L.: The alpha 2a adrenergic receptors mediates spinal analgesia evoked by alpha2 agonists and is necessary for spinal adrenergic-opioid synergic J. *Neurosci.* 17: 7175-7165, 1997.

STROSBERG, A.D. and PIETRI-ROUXEL, F.: Function and regulation all the beta 3-adrenoceptor. *TIPS.* 17: 373-81, 1996.

TENG, C.M., GUH, J.H., KO, F.N.: Functional Identification of α_1 -adrenoceptor subtypes in human prostate: comparison with those in rat vas deferens and spleen. *Eur. J. Pharmacol.* 265: 61-66, 1994.

The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification, Ed. Deborah Girdlestone, IUPHAR Media, London UK., 1998.

The Staff of the Department of Pharmacology University of Edinburgh and McLeod, L.J.: Pharmacological experiments on intact preparations. E. S. Livingstone, Edinburgh and London, 1970.

TIPS 2000 Receptor & Ion Channel Nomenclature Supplement.

UHLEN, S., LINDBLOM, J. JOHNSON, A., WIKBERG, J.E.: Autoradiographic studies of central alpha 2A- and alpha 2C-adrenoceptors in the rat using [³H]MK912 and subtype-selective drugs. *Brain. Res.* **770**: 261-6, 1997.

UHLEN, S., XIA, Y., CHHAJLANI, V., FELDER, C.C., WIKBERG, J.E.S.: [³H]MK912 binding delineates two α_2 -adrenoceptor subtypes in rat CNS, one of which is identical with the cloned pA2d α_2 -adrenoceptor. *Br. J. Pharmacol.* **106**: 986-995, 1992.

VAN DER GRAAF, P.H., SHANKLEY, N.P. AND BLACK, J.W.: Analysis of the activity of α_1 -adrenoceptor antagonists in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **118**: 299-310, 1996.

VANDER, A.J., SHERMAN, J.H., LUCIANO, D.S.: Human Physiology, 6th ed., McGraw-Hill, Inc., 1994

VARGAS, H.M. AND GORMAN, A.J.: Vascular Alpha-1 Adrenergic receptor Subtypes in The Regulation of Arterial Pressure. *Life Sciences*, **57**(25): 2291-2308, 1995.

VILLALOBOS-MOLINA, R.J. AND BARRA, M.: Alpha 1-adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes. *Eur. J. Pharmacol.*, **298**: 257-263, 1996.

VILLALOBOS-MOLINA; R., LOPEZ-GUERRERO, J.J., IBARRA, M.: Alpha 1D-and alpha 1A adrenoceptors mediate contraction in rat renal artery, *Eur. J. Pharmacol.*, **322**: 225-227, 1997.

WAEBER, C., RIGO, M., CHINAGLIA, G., PROBST, A., PALACIOS, J.M.: Beta adrenergic receptor subtypes in the basal ganglia of patients with Huntington's chorea and Parkinson's disease. *Synapse*, **8**:4, 270-80, 1991.

WEINSHANK, R.L., ZGOMBICK, J.M., MACCHI, M., ADHAM, N., LICHTBLAU, H., BRANCHEK, T.A. AND HARTIG, P.A.: Cloning, expression and pharmacological characterization of a human α_{2B} -adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* **38**: 681-688, 1990.

WETZEL, J.M., MIAO, S.W., FORRAY, C., BORDEN, L.A., BRANCHEK, T.A., GLUCHOWSKI, C.: Discovery of alpha1-adrenergic receptor antagonists based on the L-type Ca²⁺ channel antagonist nifedipine . *J. Med. Chem.* **38**: 1579-1581, 1995.

WISE, A., LEE, T.W., MACEWAN, D.J., MILLIGAN, G.: Degradation of G11 alpha/Gq alpha is accelerated by antagonist occupancy of alpha 1A/D, alpha 1B, and alpha 1C adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **270**: 17196-17203, 1995.

WU, D., KATZ, A., LEE, C.H., SIMON, M. I.: Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *J. Biol. Chem.* **267**: 25798-25802, 1992.

YANG, H.T., ENDOH, M.: Pharmacological evidence for α_{1D} -adrenoceptors in the rabbit ventricular myocardium: analysis with Bmy 7378. *Br. J. Pharmacol.*, **122**: 1541-1550, 1997.

YOUNG, P., BERGE, J., CHAPMAN, H., CAWTHORNE, M.A.: Novel α_2 -adrenoceptor antagonists show selectivity for α_{2A} -and α_{2B} -adrenoceptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* **24**: 745-752, 1989.

YU, G.S., HAN, C.: Role of α_{1A} -and α_{1B} -adrenoceptors in phenylephrine induced positive inotropic response in isolated rat left atrium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **24**: 745-752, 1994.

ZHONG, H. AND MINNEMAN, K.P.: α_1 - Adrenoceptor Subtypes. *Eur. J. Pharmacol.*, **375**: 261-76, 1999