

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

**İZOLE TAVŞAN MİDE FUNDUSUNDA
KOLİNERJİK AŞIRIM ÜZERİNE KANNABİNOİDLERİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Dr. NURAY İMİL DUYURAN

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. YUSUF SARIOĞLU

ANKARA
AĞUSTOS 2011

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

**İZOLE TAVŞAN MİDE FUNDUSUNDA
KOLİNERJİK AŞIRIM ÜZERİNE KANNABİNOİDLERİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Dr. NURAY İMİL DUYURAN

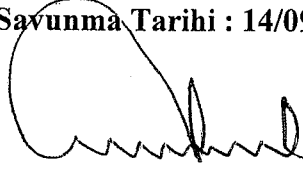
TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. YUSUF SARIOĞLU

ANKARA
AĞUSTOS 2011

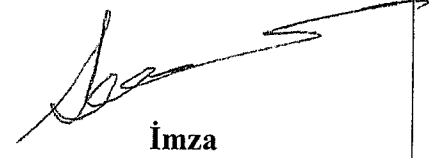
T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

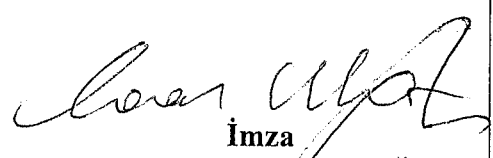
Tez Savunma Tarihi : 14/09/2011


İmza
Prof. Dr. Yusuf SARIOĞLU
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı


İmza
Prof. Dr. Sevim ERCAN
Gazi Üniversitesi


İmza
Prof. Dr. Aydan BABÜL
Gazi Üniversitesi


İmza
Prof. Dr. M.Kemal YILDIRIM
Cumhuriyet Üniversitesi


İmza
Prof. Dr. Canan ULUOĞLU
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller, Grafikler	iv
Semboller, Kısaltmalar	vi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mide Anatomisi ve Fizyolojisi	4
2.2. Kolinerjik Nörotransmisyon	8
2.3. Endokannabinoid Sistem	9
2.3.1. Kannabinoidlerin Santral Sinir Sistemindeki Etkileri	14
2.3.2. Kannabinoidlerin Periferdeki Etkileri	18
2.3.3. Kannabinoidlerin Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri	23
3.GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. İzole Tavşan Mide Fundus Preparatının Hazırlanması	26
3.2. Deney Protokolü	27
3.2.1. EAU Aracılı Kolinerjik Kasılma Yanıtların Tanımlaması	28
3.2.2. EAU Aracılı Kolinerjik Kasılma Yanıtları Üzerine Endokannabinoidlerin Etkileri ve Olası Etkilerine Kannabinoid Reseptörlerinin Katkılarının Araştırılması	28
3.2.3. EAU Aracılı Kolinerjik Kasılma Yanıtları Üzerine Kannabinoid Reseptör Antagonistlerinin Etkilerinin Araştırılması	29
3.2.4. Noradrenalinle Kastırılmış Dokularda Kannabinoid Reseptör Agonistlerinin Gevşetici Etkilerinin Araştırılması	30
3.3. Deneylerde Kullanılan Solüsyon ve Maddeler	30
3.4. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz	31

4.BULGULAR	32
4.1. EAU Aracılı Kolinerjik Kasılma Yanıtların Tanımlaması	32
4.2. EAU Aracılı Kolinerjik Kasılma Yanıtları Üzerine Endokannabinoidlerin Etkileri ve Olası Etkilerine Kannabinoid Reseptörlerinin Katkılarının Araştırılması	34
4.3. EAU Aracılı Kolinerjik Kasılma Yanıtları Üzerine Kannabinoid Reseptör Antagonistlerinin Etkilerinin Araştırılması	44
4.4. Noradrenalinle Kastırılmış Dokularda Kannabinoid Reseptör Agonistlerinin Gevşetici Etkilerinin Araştırılması	45
5.TARTIŞMA	46
6.SONUÇ	53
7.ÖZET	55
8.SUMMARY	57
9.KAYNAKLAR	59
10.EKLER	79
11.ÖZGEÇMİŞ	81

ŞEKİL VE GRAFİK DİZİNİ

Şekil 1 : Kannabinoid reseptör agonistinin spesifik reseptörüne bağlanması sonucu gelişen ikincil olaylar	10
Şekil 2 : Anandamid ve 2-AG'ün sentezi ve yıkımı	13
Şekil 3 : Santral sinir sisteminde endokannabinoidlerin sentezi ve etki mekanizması	14
Şekil 4 : EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine atropin (10^{-9} - 10^{-7} M)'in etkisi	32
Şekil 5: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine neostigmin (10^{-7} - 10^{-6} M)'in etkisi	33
Grafik 1: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine ω -konotoksin GVIA (10^{-7} M), atropin (10^{-7} M) ve neostigmin (10^{-6} M)'in etkisi	33
Grafik 2: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine anandamidin etkisi	34
Grafik 3: AM 251 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine anandamidin etkisi	35
Grafik 4: AM 630 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine anandamidin etkisi	35
Grafik 5: AM 251 ve AM 630 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine anandamidin etkisi	36
Şekil 6: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine WIN 55,212-2'nin etkisi	37
Grafik 6: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine WIN 55,212-2'nin etkisi	37
Grafik 7: AM 251 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine WIN 55,212-2'nin etkisi	38

Grafik 8: AM 630 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine WIN 55,212-2'nin etkisi	38
Grafik 9: AM 251 ve AM 630 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine WIN 55,212-2'nin etkisi	39
Şekil 7: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine ACEA'nın etkisi	40
Grafik 10: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine ACEA'nın etkisi	40
Şekil 8: AM 251 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine ACEA'nın etkisi	41
Grafik 11: AM 251 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine ACEA'nın etkisi	41
Grafik 12: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine JWH015'in etkisi	42
Grafik 13: AM 630 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine JWH015'in etkisi	43
Grafik 14: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine AM 251 ve AM 630'un etkisi	44
Grafik 15: Noradrenalin ile kastırılmış dokularda JWH015'in gevşetici etkisi	45

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

AEA	N-araşidonil etanolamid
2-AG	2-araşidonilgliserol
AIDS	Edinilmiş İmmun Yetmezlik Sendromu
ATP	Adenozin-3-fosfat
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
CB ₁	Kannabinoid 1
CB ₂	Kannabinoid 2
DAG	1-2 diaçilgliserol
dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfooksit
EAU	Elektriksel alan uyarısı
FAAH	Yağ asidi amid hidrolaz
g	Gram
GABA	Gamma amino butirik asid
Hz	Hertz
i.v.	İntravenöz
K ⁺	Potasyum iyonu
M	Molar
mmHg	Milimetre civa
mRNA	Mesajcı ribonükleik asid
ms	Milisaniye
mV	Milivolt
µM	Mikromolar
NANK	Non-adrenerjik non-kolinerjik
NO	Nitrik oksit
RT-PCR	Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
s	Saniye

sAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
THC	Tetrahidrokannabinol
V	Volt
VIP	Vazoaktif intestinal polipeptit
VR ₁	Vanilloid reseptör 1

I. GİRİŞ

Kannabinoidler sinirlerden, kan ve endotel hücrelerinden salıverilen hücre zarı kaynaklı sinyal molekülleridir ¹. Farmakolojik olarak aktif komponenti olan kannabis (marijuana, marihuana) ve sentetik kannabinoidlerin G proteinlerine bağlı iki tip kannabinoid reseptörü yoluyla etki ettikleri gösterilmiştir ^{2,3}. Kannabinoid 1 (CB₁) reseptörlerinin daha çok santral ve periferik nöronlarda nörotransmitter salıverilmesini modüle ettiği, kannabinoid 2 (CB₂) reseptörlerinin ise immun fonksiyonlarla ilgili olduğu bilinmektedir ⁴. Kannabinoidlerin endojen ligandı olan N-araşidonil etanolamid (AEA, anandamid) ve 2-araşidonilgliserolün (2-AG) ve reseptörlerinin keşfi fonksiyonel bir endokannabinoid sistemin varlığını göstermiştir ⁵. Endojen kannabinoid olan anandamidin duyuşal nöronlarda yüksek oranda eksprese edilen vanilloid 1 (VR₁) reseptörler aracılığı ile de etki gösterdiği saptanmıştır ⁶.

Kannabinoidlerin santral sinir sistemi dışında periferik sinir sisteminde sempatik, parasempatik, enterik ve duyuşal nörotransmitter salıverilmesinde rol aldıklarına dair önemli kanıtlar vardır. Bundan dolayı kannabinoidlerin immun, kardiyovasküler, santral ve periferik sinir sistemini içeren birçok biyolojik etkileri mevcuttur ¹. Ayrıca kannabinoid sistemin farklı gastrointestinal fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynadığı pek çok çalışmada saptanmıştır ⁷. Gastrointestinal motilite, iyon transportu, gastrik ve intestinal sekresyon, epitelyal yara iyileşmesi ve beslenme davranışları gibi çok sayıdaki düzenleyici fonksiyonların kannabinoidler ile ilgili olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir ^{7, 8, 9, 10}. Kannabinoidlerin gastrointestinal sistemdeki etkilerini CB₁ reseptör aktivasyonu ile enterik, vagal, beyin sapı ve spinal sinirler aracılığıyla

gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca CB₂ reseptör aktivasyonunun immun hücreler aracılığı ile inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir ¹¹.

Gastrointestinal fonksiyonların düzenlenmesinde enterik sinir sistemi son yolaktır ¹². Bununla birlikte kannabinoidlerin gastrointestinal sistemde en fazla etki ettikleri alanın enterik sinir sistemi olduğu saptanmıştır ^{5, 13}. Yapılan farklı çalışmalarda hem CB₁ hem de CB₂ reseptörlerinin enterik nöronlar üzerinde kolin-asetil transferaz (ChAT) enzimi ile birlikte lokalize oldukları gösterilmiştir ^{14, 15, 16}. İnsanlarda dahil olmak üzere pek çok türde yapılan çalışmalarda gastrointestinal sistemde kannabinoidlerin en önemli etkilerinin gastrointestinal motiliteyi ve sekresyonu azaltması olduğu ve bu etkilerini CB₁ reseptörleri aracılı presinaptik asetilkolin salıverilmesini inhibe ederek oluşturduğu saptanmıştır ^{12, 15, 16, 17}. Ayrıca yapılan invitro çalışmalarda CB₁ reseptör aktivasyonunun eksitator transmisyonun inhibisyonuna, elektriksel olarak uyarılan asetilkolin salıverilmesinin inhibisyonuna etki ettiği saptanmıştır ^{18, 19}. Kobay ileumunda myenterik nöronlar üzerinde yapılan elektrofizyolojik bir çalışmada da CB₁ reseptör agonistlerinin hem presinaptik hem de postsinaptik etkilerinin olduğu ve kolinerjik sinaptik transmisyonu inhibe ettikleri gösterilmiştir ²⁰. Farelerde yapılan bir çalışmada gastrointestinal sistemde CB₁ reseptör düzeylerinin en fazla midede ve kolonda bulunduğu tespit edilmiştir ²¹.

Farklı türlerde yapılan çalışmalarda gastrointestinal sistemde CB₁ reseptörlerin motiliteyi inhibe edici etkisi ortaya konmuştur. Ancak CB₂ reseptörlerinin gastrointestinal sistem motilitesindeki etkisinin varlığı net olarak gösterilememiştir. Ayrıca tavşan mide fundusunda kannabinoidlerin etkileri ve olası etkilerinde CB₁ ve CB₂ reseptörlerinin rolü tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmada ise izole tavşan mide fundus düz kasında elektriksel alan uyarısı (EAU) aracılı kolinerjik transmisyonun tanımlanması ve bu yanıtlar üzerinde endokannabinoidlerin etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca endokannabinoidlerin olası etkilerinin hangi kannabinoid reseptörü üzerinden olabileceği araştırılmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

2.1. Mide Anatomisi ve Fizyolojisi:

Şekil bakımından mideyi asimetrik bir torbaya benzetebiliriz. Biri yukarıda, diğeri aşağıda olmak üzere iki deliği, ön ve arka iki yüzü, sağ ve sol iki kenarı vardır. Kardias denilen yukarıdaki delik, mideyi özefagus ile; pilor adı verilen aşağıdaki delik de duodenum ile birleştirir. Ön duvar(pars anterior), öne ve biraz yukarıya bakar. Arka duvar (pars posterior), arkaya ve aşağıya bakar. Bu iki yüzün birleşmesinden sağ kenar (kurvatura ventrikuli minor) ve sol kenar (kurvatura ventrikuli major) meydana gelmiştir²².

Mide üç kısımdan oluşmaktadır. **1) Fundus:** Özefagusun mideye giriş yeri düzeyinin üstünde kalan kubbe şeklindeki mide kesimidir ve normalde hava ile doludur. **2) Korpus:** Yemek borusunun giriş deliği hizasından başlar, aşağıda incisura angularis seviyesinde son bulur. Organın ortasında yer alır ve en büyük kesimidir. **3) Antrum:** Korpus ile duodenumun birinci parçası arasında bulunur. Bu kısım korpusa nispeten daha dar ve duvarları daha kalındır. Pilorik sfinkteri barındıran distal parçasına pilor kanalı denmektedir^{22, 23}.

Mide, tunika seroza, tunika muskularis ve tunika mukoza olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır. Tunika muskulariste longitudinal, sirküler ve oblik olmak üzere üç tip kas tabakası bulunmaktadır. Bu kas tabakaları midenin fonksiyon bakımından önemli hareketlerini yapmasına olanak sağlamaktadır²². Midenin karıştırma, çalkalama, öğütme ve

gıdaları duodenuma atma gibi görevlerini sağlayan tonus ve peristaltizm olmak üzere iki tip motor işlevi vardır ²³. Midenin motor fonksiyonları; gastrointestinal kanalın daha aşağı bölümlerine gelinceye kadar çok miktarda besinin depo edilmesi, besinlerin *kimus* adı verilen yarı sıvı bir karışım oluncaya kadar mide salgısı ile karıştırılması ve ince barsakların sindirim ve emilim fonksiyonlarını uygun bir şekilde yürütebilmeleri için besinlerin mideden duodenuma yavaş boşalmasının sağlanması olarak üç grupta toplanabilir ²⁴.

Gastrointestinal kanalın düz kas hücreleri ekstrasellüler kompartmana göre negatif bir intrasellüler membran potansiyeline sahiptirler. Bu membran potansiyeli (-40 ila -70 milivolt) , Adenozin 3 fosfat (ATP) bağımlı çalışan sodyum-potasyum elektrojenik pompası tarafından oluşturulan gradiyent ile sağlanmaktadır. Spontan kasılmaların olduğu bölgelerde (midenin distali, ince barsak ve kolon) miyozitler “yavaş dalga” elektriksel kontrol aktivitesi veya “temel elektriksel ritm” adı verilen spontan yavaş depolarizasyon dalgaları göstermektedirler. Yavaş dalgaların sıklığı ve birbirleriyle olan ilişkileri, değişik kasılma paternleri oluşturacak şekilde farklıdır. Yavaş dalganın depolarizasyonu tekrarlayıcı ve ritmiktir, kas kasılması her zaman bununla ilişkili olmayabilir. Yavaş dalga depolarizasyonları tipik olarak diğerlerinden daha az polarize olan hücrelerde görülür. Bu spontan depolarizasyonlar membran boyunca oluşan iyon göçleri ile ortaya çıkmaktadırlar. Miyozitler sıkı kavşaklarla fiziksel olarak birbirlerine bağlıdırlar ve bir hücrenin depolarizasyonu elektriksel olarak komşu hücrelere aktararak onların depolarizasyonuna sebep olmaktadır ²⁵.

Gastrointestinal kanalın motilitesi, miyozitlerin istirahat potansiyeli, spontan olarak depolarizasyon yeteneği, aksiyon potansiyelini tetikleyen eşik değeri, hücrelerin diğeri hücrelerle etkileşim yeteneği ve iyon kanallarının ekstrasik kontrolü tarafından belirlenmektedir. Bu özellikler gastrointestinal kanalın düz kas hücrelerinde ortaktır, bir veya birkaçında değışik bölgelerde ortaya çıkan küçük farklılıklar, çok farklı motilite paternlerinin oluşmasına sebep olabilir. Midenin kas hücreleri, sıkı kavşaklardan zengin ve birbiriyle iletişim içindedir. Bu sayede depolarizasyonları hücreler boyunca vektöryel olarak iletilir ve sonuç olarak düzenli kontraksiyonlar ortaya çıkar. Kolon düz kas hücreleri ise vektöryel olmayan düzensiz kontraksiyonlar ortaya çıkaracak şekilde birbirlerine sıkı kavşaklarla bağlantı yapmamış durumdadır. Benzer şekilde özefagusta yavaş dalgalar bulunmaz ve ekstrasik sinirsel uyarı yokluğunda bu yapı istirahat konumundadır. Yavaş dalgalar midede, ince barsakta, oddi sfinkterinde ve kolonda mevcuttur ve böylece ekstrasik sinirsel uyarı olmaksızın da aktivite görülür²⁵.

Mide barsak kanalının tonusu ve motilitesi ile salgılama ve absorpsiyon fonksiyonları nöronlar, mide barsak hormonları (kolesistokinin, gastrin, vazoaaktif intestinal peptid (VIP), sekretin, glukagon, somatostatin..gibi) ve barsak mukozası içindeki enterokromaffin hücrelerden salıverilen serotonin ve diğeri otakoidler tarafından düzenlenmektedir²⁶.

Yaklaşık yüzyıl önce Bayliss ve Starling gastrointestinal sistemde peristaltik refleksi keşfetmiş ve bu durum intrinsik enterik sistemin varlığına işaret etmiştir²⁷. Takip eden yıllarda yapılan çalışmalarda gastrointestinal sistemin sinir ağıları kendi içinde ve santral

sinir sistemi ile bağlantısını sağlayan yoğun bir sinir ağı olmak üzere iki kısımda sınıflanmaktadır.

Ekstrinsik sinir sistemi: Gastrointestinal sistem ile beyin ve omurilik boyunca ilerleyen sinir ağlarından oluşmaktadır. Fonksiyonel olarak sempatik, vagal ve pelvik motor yolların nöronları, ekstrinsik primer afferent nöronlardan oluşmaktadır.

Enterik sinir sistemi: Gastrointestinal sistemin kendi içindeki intrinsik innervasyondan sorumludur²⁸. İki ana gangliyon ağından oluşmaktadır. Myenterik plexus (Auerbach plexusu) longitudinal ve sirküler kas tabakaları arasında yer alır. Tüm gastrointestinal sistem boyunca bulunur. Submukozal plexus ise submukoza tabakasında yer alır ve ağırlıklı olarak ince ve kalın barsakta yerleşmiştir. Özefagus ve midede submukozal plexus bulunmaz. Bu bölgelerde izole gangliyonlar izlenebilir. Fonksiyonel olarak enterik nöronlar üç gruba ayrılır²⁹. **1) Motor nöronlar:** Eksitator motor nöronlar kas kontraksiyonunu indükleyerek motiliteyi kontrol etmektedirler. Baskın olan nörotransmitteri muskarinik reseptörler aracılığıyla etki eden asetilkolindir. Bunun dışında taşıkininler ve substans P'nin de nörotransmitter olarak etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. İnhibitör motor nöronlar ise inen ve akomodasyon reflekslerini kontrol ederler. Bu nöronlardan salıverilen temel nörotransmitter nitrik oksittir. Ancak bunun dışında ATP ve VIP gibi nörotransmitterlerin de salıverildiğini gösteren çalışmalar vardır¹². **2) İntrinsik primer afferent nöronlar:** Refleks yollarının, motilitenin ve kan akışının kontrolü, ayrıca sekresyon gibi görevleri vardır. Bu nöronların kolinerjik ve taşıkinin kotransmisyonu yolu ile etki gösterdikleri düşünülmektedir²⁹. **3) İnternöronlar:** Myenterik ve submukozal plexus içinde yerleşmişlerdir. Bir kısmı serotonerjik, dopaminerjik ve kolinerjiktir.

Önemli bir kısmı ise non adrenerjik non kolinerjiktir. Ayrıca ATP ve adenosin salıveren inhibitör purinerjik ara nöronlar da vardır ²⁶.

2.2. Kolinerjik Nörotransmisyon:

Kolinerjik agonistler tarafından aktive edilen muskarinik reseptörlerin, G proteinlerinin aktivasyonu ile kolinerjik sinyal transdüksiyonunu gerçekleştirdiği gösterilmiştir ³⁰. Moleküler yapı, bağlanma ve fonksiyonlarına göre 5 farklı muskarinik reseptör subtipi (M₁, M₂, M₃, M₄, M₅) tanımlanmıştır ³¹. M₁, M₃ ve M₅ subtipinin çoğunlukla G_Q proteinine bağlandığı, M₂ ve M₄ subtipinin de ağırlıklı olarak G_I proteinine bağlandığı gösterilmiştir ³². Çeşitli çalışmalarda M₃, M₁ ve M₂ muskarinik reseptör subtiplerinin gastrik fundustaki varlıkları saptanmıştır. Fare midesinde yapılan bir çalışmada, M₃ muskarinik reseptör subtipinin kontraksiyonlara aracılık ettiği, M₂ reseptör subtipinin de M₃ reseptörleri tarafından oluşturulan kontraksiyon cevaplarına yaklaşık %45 oranında katkıda bulunduğu gösterilmiştir ^{33, 34, 35}. Sıçan antral sirküler düz kasında yapılan başka bir çalışmada da kolinerjik kontraksiyonda çoğunlukla M₃, ayrıca M₂ reseptörlerinin de etki ettikleri belirtilmiştir ³⁶. M₃ reseptörlerin gastrointestinal kanalda ve diğer dokularda farmakolojik olarak postsinaptik düzeyde etki ettikleri gösterilmiştir. Presinaptik düzeyde ise hem stimulator hem de inhibitör muskarinik otoresptörler mevcut olabileceği için daha kompleks bir durum olduğu belirtilmiştir ³⁷. Kobay longitudinal kas myenterik pleksusunda yapılan bir çalışmada presinaptik muskarinik M₃ reseptörlerin asetilkolin salıverilmesini inhibe ederken, muskarinik M₁ reseptörlerin asetilkolin salıverilmesini arttırdığı ortaya konmuştur ³⁸. Ancak kobay ileum sirküler düz kasında yapılan başka bir çalışmada presinaptik inhibitör muskarinik reseptörlerin M₁ subtipinde olduğu ileri sürülmüştür ³⁹. Kobay midesinde yapılan başka bir çalışmada

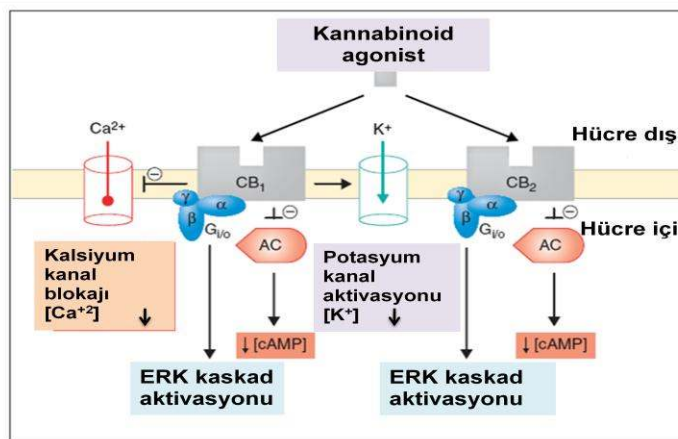
ise asetilkolin saliverilmesinin M₁ ve M₂ reseptörler tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir ⁴⁰.

2.3. Endokannabinoid Sistem

Kannabinoidler "*Cannabis sativa*" bitkisinden köken almaktadır ⁴. Bu bitki milattan önceki yıllardan beri Asya'da tedavi amacı ile kullanılırken, 19. yüzyılda batı tıbbında kullanılmaya başlanmıştır. Çok sayıdaki yan etkisinden ve her bitkiden elde edilen kannabinoidlerin standartizasyonu sağlanamadığından dolayı 20. yüzyılda tıpta kullanımı anlamlı derecede azalmıştır ⁴¹. "*Cannabis sativa*" bitkisinde bulunan 60'ın üzerinde bileşen tanımlanmıştır. Bu bileşenlerden biri olan Δ^9 -tetrahidrokannabinol (THC), bu bitkinin psiko-aktif edici etkilerinden sorumludur ⁴². Bu aktif bileşenin saf formu ilk kez 1964'te izole edilmiş ve yapısı açıklanmıştır ⁴³. Diğer kannabinoid bileşenlerinden daha zayıf psiko-aktif edici özellik gösteren kannabinol (Δ^8 -THC) ve psiko-aktif edici özelliği olmayan kannabidiol ilk kez 1940'ların başlarında Lord Todd ve Roger Adams tarafından izole edilmişlerdir. Bu çalışmalardan sonra kannabis araştırmaları artmıştır. Pek çok doğal kannabinoidin bitkilerden izole edilmesi, yapılarının açıklanması ve total sentezleri yapılmıştır ⁴⁴. Kannabimimetik aktivitenin temel yapı-aktivite ilişkisi ve metabolik yolları saptanmıştır ⁴⁵. Endojen kannabinoid sistemin ve spesifik kannabinoid reseptörlerin saptanmasından sonra, kannabinoidler tedavi ajanı olarak tekrar gündeme gelmişlerdir. Kimyasal olarak sentezlenen kannabinoid türevlerinde etkililiği ve güvenilirliği bilimsel olarak gösterilenlerin tedavide kullanıma girmeleri beklenmektedir. Ağrı, multiple skleroz, spinal kord hasarı, epilepsi, parkinson hastalığı, glokom, anoreksi, Edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromuna (AIDS) bağlı kilo kaybı ve kemoterapiye bağlı

bulantı ve kusma tedavisinde kullanılmaları ile ilgili klinik çalışmalar bulunmaktadır ⁴¹.

Anandamid ve 2-AG gibi endojen kannabinoidlerin varlığı 1990'lı yılların başında yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir ⁴⁶. İlk keşfedilen endokannabinoid olan anandamid domuz beyininden izole edilmiştir ⁴⁷. İkinci endojen ligand olan 2-AG ise ilk önce köpek sindirim sisteminden izole edilmiştir ⁴⁸. Hem THC ve sentetik analoglarının hem de endokannabinoidlerin etkilerini spesifik kannabinoid reseptörleri üzerinden gösterdikleri yine 1990'lı yıllarda saptanmıştır ⁴⁶. İlk olarak CB₁ reseptörü sıçan beyinde ve nöronal hücrelerde klonlanmıştır ⁴⁹. Daha sonra yapılan bir çalışmada dalak marjinal zonunda bulunan makrofajlarda CB₂ reseptörü klonlanmıştır ⁵⁰. CB₁ ve CB₂ reseptörlerin G_{i/o} protein bağlı olduğu ve adenilat siklaz aktivitesini inhibe ettiği, mitojen aktif protein kinaz aktivitesini ise aktive ettikleri gösterilmiştir. CB₁ reseptörlerin aynı zamanda içeriye doğrultucu potasyum kanallarına pozitif, L-/N-/P-/Q- tip kalsiyum kanallarına negatif olarak bağlandığı gösterilmiştir ^{3, 51}. (Şekil 1)

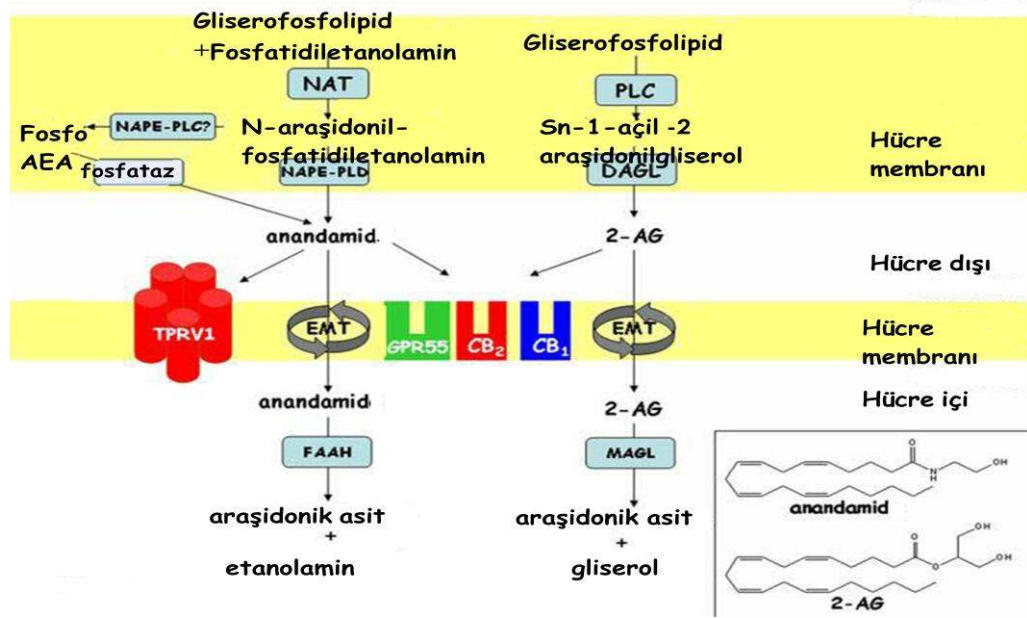


ŞEKİL 1: Kannabinoid reseptör agonistinin spesifik reseptörüne bağlanması sonucu gelişen ikincil olaylar ⁴ (AC: Adenilat siklaz, cAMP: siklik adenosin monofosfat, ERK: Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz)

CB₁ reseptörleri daha çok nöronal dokularda bulunmaktadır. Santral sinir sistemi dışında enterik sinir sisteminde sempatik ve duyuşal nöronlarda, karaciğerde, kardiyak ve vasküler dokularda, adipoz dokuda CB₁ reseptörler bulunduğu gösterilmiştir ^{3, 51, 52, 53, 54}. CB₂ reseptörlerinin ise daha çok dalak, timus gibi immun dokularda ve hücrelerde bulunduğu gösterilmiştir ^{3, 51}. Kannabinoid reseptörlerinin gastrointestinal sistemdeki varlığı anatomik ve fonksiyonel kanıtlarla ispatlanmıştır. Yapılan ilk çalışmalarda, sıçan gastrointestinal sisteminde CB₁ reseptörlerin varlığı otoradyografi ile ve domuz gastrointestinal sisteminde nöral pleksuslarda CB₁ reseptörlerin immun reaktivitesi (CB₁IR) immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir ¹⁵. Sıçan midesinde yapılan bir çalışmada, immunohistokimyasal olarak kas ve mukozayı innerve eden kolinerjik hücreler üzerinde CB₁ reseptörlerin varlığı gösterilmiştir ⁵⁵. Sıçan midesinde yapılan başka bir çalışmada, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile CB₁ ve CB₂ reseptörlerin mesajcı ribonükleik asitlerinin (mRNA) varlığı gösterilmiştir ⁵⁶.

Endojen kannabinoid olan anandamidin VR₁ reseptörler aracılığı ile de etki gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ⁶. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda endokannabinoidlerin G protein kenetli reseptör 55 (GPR55) ve G protein kenetli reseptör 119 (GPR119) gibi nadir bulunan (orfan) reseptörlere de bağlandıkları ve bu reseptörleri aktive ettikleri gösterilmiştir. GPR55'in ağrı iletiminde rol alabileceği düşünülmektedir ⁵⁷. Bir çalışmada GPR55'in kannabinoidler tarafından aktive edildiğini fakat bu reseptörün kannabinoidlerin vazodilatör etkilerinden sorumlu olmadığı gösterilmiştir ⁵⁸. GPR119 ise daha çok pankreas ve gastrointestinal kanalda saptanmıştır. Fakat bu reseptörlerin etkileri ve fizyolojik önemleri tam olarak bilinmemektedir ⁵⁷.

Endokannabinoidler klasik nörotransmitterlerden farklı olarak veziküllerde depolanmazlar ve veziküllerden salıverilmezler. Anandamid hücre membranında bulunan fosfolipidlerin yıkımı ile oluşmaktadır. Hücre içine kalsiyum (Ca^{+2}) girişi N-açiltransferaz enzimini aktive eder. N-açiltransferaz ve N-açilfosfatidiletanolamin fosfolipaz D enzimleri sıra ile iki basamaklı reaksiyonun basamaklarını ayrı ayrı katalize ederek anandamidi sentezlerler⁵⁹. 2-AG ise 1,2 diaçilgliserol (DAG)'ün DAG lipaz ile veya 2-araşidonil-lizofosfolipid'in fosfolipaz A1 ile yıkımıyla oluşur. Hücre içi Ca^{+2} miktarı, 2-AG sentezi için de önemlidir⁶⁰. Sinaptik aralığa salıverilen endokannabinoidler bu aralıktan selektif taşıyıcı aracılığı ile hızlıca hücre içine alınırlar ve böylece etkileri sonlandırılır. İleri derecede lipofilik oldukları için hücre dışında kısa süreli olarak bulunurlar ve dolayısıyla etkileri kısa sürelidir. Dokulara dağılımları lipofilitelerinden dolayı zordur. Anandamid hücre içinde, hücre içi membranına bağlı olan yağ asidi amidohidrolaz enzimi tarafından etanolamin ve araşidonata yıkılır. 2-AG ise monoaçilgliserol lipaz enzimi tarafından yıkılır. Yağ asidi amidohidrolaz daha çok post-sinaptik hücrelerde, monoaçilgliserol lipaz ise daha çok pre-sinaptik hücrelerde bulunmaktadır. Monoaçilgliserol lipaz enzimi endokannabinoidleri yıkan bir diğer enzimdir^{59,60}. (Şekil 2)

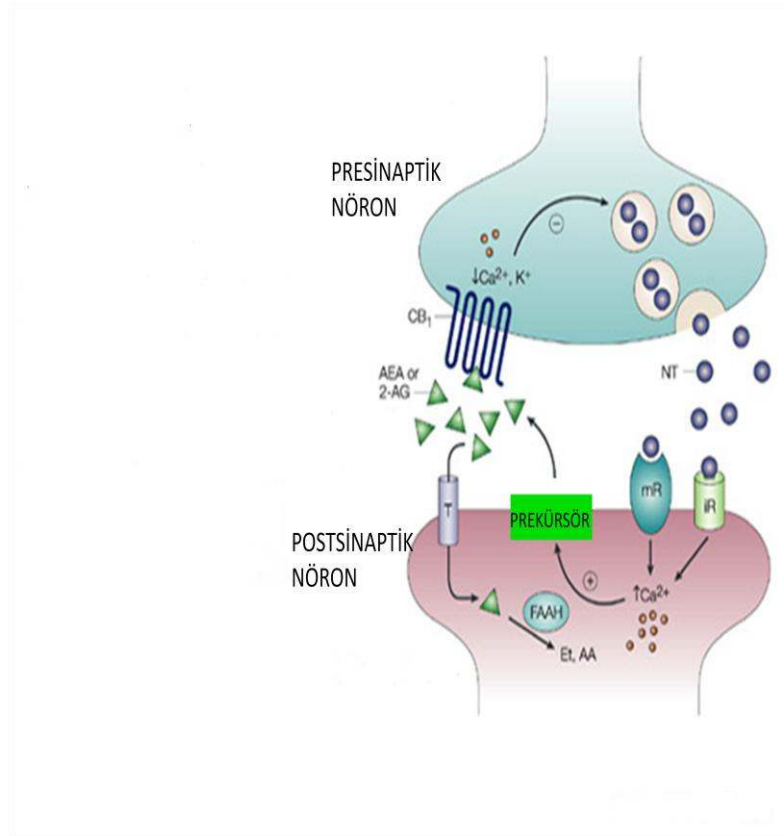


ŞEKİL 2: Anandamid ve 2-AG'ün sentezi ve yıkımı ¹⁷ (AEA: N-araşidoniletanolamid, EMT: Endocannabinoid membran taşıyıcı, FAAH: Yağ asidi amid hidrolaz, DAGL: Diaçilgliserol lipaz, MAGL: Monoaçilgliserol lipaz, NAPE: N-açil-fosfatidiletanolamin, NAPE-PLC: N-açil-fosfatidiletanolamin-selektif fosfalipaz C, NAPE-PLD: N-açil-fosfatidiletanolamin-selektif fosfalipaz D, NAT: N-açiltransferaz, PE: Fosfatidiletanolamin, PLC: Fosfalipaz C, TRPV1: Vanilloid reseptör 1)

Santral sinir sisteminde, endokannabinoidler post-sinaptik hücrelerden salıverilirler ve etkilerini pre-sinaptik uçta göstermektedirler. Pre-sinaptik olarak CB₁ ve CB₂ reseptörleri üzerinden klasik nörotransmitterlerin salıverilmesini etkilerler ⁶¹. Periferde sinaptik aralık değişen boyutlardadır. Endokannabinoidlerin sinaptik aralıkta kalış süreleri çok kısa olduğu için post-sinaptik hücrelerden yani düz kas hücrelerinden salıverilip pre-sinaptik uçta etki göstermesi çok mümkün görülmemektedir ^{1, 59}. Periferde endokannabinoidlerin pre-sinaptik uçtan salıverildikleri ve etkilerini hemen bu uçta gösterdikleri düşünülmektedir. Ayrıca endotel hücrelerinden de salıverildikleri ve nörotransmitter salıverilmesini lokal olarak modüle ettikleri düşünülmektedir ⁵⁹.

2.3.1 Kannabinoidlerin Santral Sinir Sistemindeki Etkileri

Santral sinir sisteminde 1990'lı yıllardan itibaren THC ve endokannabinoidlerin nörotransmitter salıverilmesi üzerine olan etkileri araştırılmaktadır. Post-sinaptik hücrelerden salıverilen endokannabinoidler etkilerini pre-sinaptik uçta CB₁ reseptörleri üzerinden klasik nörotransmitter salıverilmesini azaltarak veya artırarak göstermektedirler ⁶¹. (Şekil 3)



ŞEKİL 3: Santral sinir sisteminde endokannabinoidlerin sentezi ve etki mekanizması ⁶²

Endokannabinoidlerin beyinde öğrenme ve hafıza ile ilgili olan hipokampus ve amigdala bölgelerinde bulunduğu ve bu fizyolojik durumlarda rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda insanlarda akut ve kronik marihuana kullanımının kısa dönem hafızanın bozulmasını indüklediği gösterilmiştir ⁶³. Ayrıca yapılan invitro deneylerde kannabinoidlerin hafıza ile ilgili nöronal aktivitede kalıcı değişiklikler oluşturduğu gözlemlenmiştir ⁶⁴. Sıçan korteksinde yapılan çalışmalarda, CB₁ reseptör aktivasyonunun farklı nörotransmitterlerin salıverilmesini etkilediği gösterilmiştir. THC'nin, prefrontal kortekste hücre dışı gamma amino butirik asit (GABA) seviyesini azaltırken, glutamat ve dopamin seviyelerini arttırdığı saptanmıştır ⁶⁵. Yapılan başka bir çalışmada benzer şekilde kannabinoid reseptör agonistinin (WIN 55,212-2) frontal korteksde noradrenalin salıverilmesini arttırdığı gösterilmiştir ⁶⁶. Bu etkilerinin kannabinoid kullanımı ile oluşan kognitif fonksiyon bozukluklarının mekanizmasında rol alabileceği düşünülmektedir ^{65, 66}. Bir çalışmada THC'nin prefrontal kortekste CB₁ reseptörleri aracılığı ile asetilkolin salıverilmesini uzun süreli azalttığı gösterilmişken, başka bir çalışmada ise THC ve WIN 55,212-2'nin yine prefrontal kortekste endojen opioid peptidler aracılığı ile asetilkolin salıverilmesini artırdığı gösterilmiştir. Prefrontal kortekse benzer şekilde hipokampusda da THC'nin CB₁ reseptörleri aracılığı ile asetilkolin salıverilmesini uzun süreli azalttığı, fakat THC ve WIN 55,212-2'nin yine hipokampusda endojen opioid salıverilmesini artırarak asetilkolin salıverilmesini artırdığı belirtilmiştir ^{67, 68}. Ayrıca THC'nin dorsal hipokampusda glutamat salıverilmesini CB₁ reseptörleri aracılığı ile azalttığı ortaya konmuştur. Bu azalmanın kannabinoidlere bağlı oluşan hafıza kaybından sorumlu olabileceği düşünülmektedir ⁶⁹.

Kognitif fonksiyon bozuklukları ve hafıza dışında kannabinoidlerin motor aktivite kontrolü üzerinde de etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalarda kannabinoidlerin motor aktivite üzerindeki güçlü etkilerinin doza bağlı olduğu, düşük dozlarda stimülasyon yaparken yüksek dozlarda inhibisyon yaptığı ortaya konmuştur ⁷⁰. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, CB₁ ve VR₁ reseptörlerinin bazal gangliyon düzeyinde hareketi düzenledikleri belirlenmiştir ⁷¹. Farelerde yapılan bir araştırmada da, cerebelluma bağlı motor öğrenme için CB₁ reseptör aktivasyonunun gerekli olabileceği ileri sürülmüştür ⁷². Endokannabinoid sistemin GABA, glutamat ve dopamin nörotransmisyonundaki etkisi sebebiyle bu nörotransmitterler ile ilgili olan patolojik durumlarda da rolü olduğu düşünülmektedir. Bununla ilgili olarak nörodejeneratif hastalıkların (Parkinson, Alzheimer, Multiple skleroz) çeşitli hayvan modellerinde endokannabinoid sinyalinin yükseldiği gösterilmiştir ⁷³. Multiple sklerozun hayvan modeli olan deneysel alerjik ensefalitli hayvanlarda THC'nin, CB₁ reseptörleri aracılığı ile nörodejenerasyonu ve beyin omurilik sıvısında glutamat seviyelerini azalttığı bulunmuştur ⁶⁹. Huntington hastalarının post-mortem beyinlerinin bazal ganglion bölgesinde CB₁ ve dopamin reseptörlerinde belirgin bir azalma gözlemlenmiştir ⁷⁴.

Şizofrenide de dopamin ve kannabinoid sistem arasında kompleks bir etkileşimin olduğu düşünülmektedir. Kannabinoidlerin prefrontal korteks ve nükleus accumbenste dopamin salıverilmesini arttırdığı gösterilmiştir ⁷⁵. Ayrıca yapılan bir çalışmada şizofrenisi olan hastaların beyin omurilik sıvısında anandamid seviyelerinin yükselmiş olduğu görülmüştür ⁷⁶. Yapılan çeşitli çalışmalarla CB₁ reseptör aktivitesinin hem yüksek hem de düşük düzeylerinin ruhsal hastalıklarla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Preklinik çalışmaların çoğunda CB₁

reseptör blokajının, anksiyete ve depresyon benzeri durumları meydana getirdiği bulunmuştur ⁷⁷.

Bunların dışında opioid ve kannabinoid sistem arasında etkileşim olduğu birçok çalışmada saptanmıştır. Kannabinoidler endojen opioidlerin seviyelerini hem nukleus accumbensde hem de ventral tegmental alanda arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca opioid reseptör antagonistlerinin kannabinoidlerin etkilerinin bir kısmını azalttığı, bir kısmını ise tamamen ortadan kaldırdığı gösterilmiştir ^{78, 79}. Bununla ilgili olarak farklı deneysel modellerde CB₁ reseptör antagonisti SR141716'nın nikotin, alkol ve opioid bağımlılarında ilaç arayışı davranışındaki relapsı azalttığı bulunmuştur ⁸⁰.

CB₁ reseptörleri, beslenme davranışı ve iştahı kontrol eden hipotalamusta bulunmaktadır. Buna bağlı olarak endokannabinoidlerin CB₁ reseptörleri üzerinden yemek yemeyi stimüle ettikleri saptanmıştır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, yemek yoksunluğu durumunda beynin ön kısmında ve hipotalamusta 2-AG ve anandamid düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca ekzojen kannabinoidlerin (marihuana, THC) insanlarda yemek yemeyi stimüle ettiği gösterilmiştir ⁸¹. Bu özelliğinden dolayı kanser, AIDS ve Alzheimer hastalığı olan hastalarda iştahı arttırmak için kullanılabileceği düşünülmüştür ⁸².

Yapılan çok sayıda çalışmada, selektif CB₁ reseptör agonistlerinin analjezik etkilerini göstermişlerdir. Akut ağrıda anandamid, THC ve sentetik kannabinoidlerin (WIN 55,212-2 gibi) kimyasal, mekanik ve termal ağrı stimülasyonuna karşı etkili oldukları gösterilmiştir ⁷³. Ayrıca ağrı algılanmasının (anti-nosisepsiyon) ve kronik ağrıların (inflamatuvar ve

nöropatik durumlarda) inhibisyonunda CB₂ reseptörlerinin rolü olduğunu öneren çeşitli çalışmalar mevcuttur ⁸³.

Endokannabinoidlerin immün sistemi baskılayarak çeşitli hastalıklarda nöron hasarı oluşumunu engellediği bilinmektedir ⁶⁰. Ayrıca CB₁ reseptör aktivasyonunun vazodilatör etkisinin iskemik beyin alanlarına oksijen sağlayarak nöroprotektivitede önemli olabileceği önerilmiştir. Çeşitli hayvan deney modellerinde CB₁ reseptörlerinin inmeden korunmaya katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir ⁸⁴. Ancak nöronların ekzojen veya endojen kannabinoidler ile uzun süreli maruz kalması sonucu apoptozisi oluşturan mekanizmaları aktive edeceği için nöronal hasar oluşturabileceği düşünülmektedir. Bugün için endokannabinoidlerin santral sinir sistemindeki etkileri tam olarak anlaşılmamıştır ve karmaşıktır. Bu yüzden santral sinir sistemi ile ilgili hastalıklarının tedavisinde endokannabinoidlerin kullanılması için birçok araştırmaya ihtiyaç vardır ⁶⁰.

2.3.2 Kannabinoidlerin Periferdeki Etkileri

Kannabinoidlerin kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri pek çok çalışma ile ortaya konmuştur. Bu çalışmalar ile kardiyovasküler regulasyonda CB₁ reseptörlerinin CB₂ reseptörlerden daha önemli olduğu gösterilmiştir ⁷³. İnsan ve çeşitli hayvan türlerinin myokardında yapılan çalışmalarda, CB₁ reseptörlerinin negatif inotrop etkiye aracılık ettiği bulunmuştur ^{85, 86}. Ayrıca CB₁ reseptörlerinin aktivasyonunun vasküler dokularda vazodilatasyona neden olduğu saptanmıştır ⁸⁷. Kannabinoidlerin vazodilatasyon ve negatif inotrop etkilerinin anandamidin hipotansif etkisi ile ilgili olduğu öne sürülmüştür ⁵³. Sıçanlarda yapılan çalışmada intravenöz olarak uygulanan anandamidin hipotansiyona neden olduğu ve

bu etkisini sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin saliverilmesini CB₁ reseptörleri aracılığı ile presinaptik olarak azaltarak yaptığı gösterilmiştir ⁸⁸. Kobaylarda yapılan bir başka çalışmada da, anandamidin CB₁ reseptörleri aracılığıyla hipotansiyon oluşturduğu ve sinaptik aralığa saliverilen endokannabinoidleri bu aralıktan hücre içine alıp etkisini sonlandıran selektif taşıyıcının inhibisyonunun anandamidin bu etkisini artırdığı tespit edilmiştir ⁸⁹. Yapılan bu çalışmalar hipertansiyonda endokannabinoidlerin etkisinin varlığına işaret etmektedir. Hipertansiyondaki etkileri, vasküler CB₁ reseptörleri ve kardiyak tonus aktivasyonu ile gösterdikleri, böylece kan basıncı ve kardiyak kontraktilitenin artmasını sınırladıkları belirtilmiştir ⁷³. Ayrıca yapılan çalışmalarda, hipotansiyonla seyreden hemorajik, endotoksik ve kardiyojenik şok gibi durumlarda, CB₁ reseptör antagonisti SR141716'nın hipotansiyondan koruduğu veya ortadan kaldırdığı gösterilmiştir ^{90, 91, 92}.

Kannabinoidlerin kalbi iskemi-reperfüzyon hasarından koruduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur ^{93, 94, 95}. İzole sıçan kalbinde yapılan bir çalışmada, 2-AG'nin miyokardiyal hasarı ve infarkt alanını azaltarak miyokardiyal iyileşmeyi sağladığı, böylece iskemiye karşı koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir ⁹³. Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada da CB₁ reseptörlerin endotel hücrelerinde bulunduğu ve nitrik oksit (NO) sentezini artırarak kalbi iskemiden koruduğu; CB₂ reseptörlerin ise kardiyomiyositlerde bulunduğu ve koruyucu etkisinin endotelden bağımsız olduğu belirtilmiştir ⁹⁴. THC ile yapılan bir çalışmada ise, THC'nin NO seviyesini artırarak kalp hücrelerini CB₂ reseptörleri aracılığı ile hipoksiden koruduğu gösterilmiştir ⁹⁵.

Uzun yıllardır kannabinoidlerin solunum sistemindeki etkilerinin araştırılması devam etmektedir. Klinik çalışmalar sağlıklı kişilerde marihuana içilmesinden sonra hava yolu direncinde azalma, hava yolu kondüktansında ise artma olduğu gösterilmiştir ⁹⁶. Bu durumun THC'nin bronkodilatör etkisine bağlı olduğu ileri sürülmüştür ⁹⁷. Kannabinoidlerin astmadaki etkisini araştıran bir çalışmada bazı astma hastalarında kısa dönemde marihuana içiminin bronkospazmı azalttığı, bronkodilatasyonu arttırdığı gözlemlenmiştir ⁹⁶. Ancak marihuana içiminin solunum sistemine zarar veren ve irrite eden partiküller içermesi sebebiyle uzun dönem astma tedavisinde uygun olmadığı belirtilmiştir ⁹⁷. Bir başka çalışmada düşük doz nebulize THC'nin (0,2 mg) astmalı hastalarda yan etki olmaksızın bronkodilatasyon yaptığı bulunmuştur ⁹⁸. Ancak yüksek doz THC (5-20 mg) ile yapılan bir çalışmada lokal irritasyona bağlı paradoksik bronkokonstrüksiyon meydana geldiği saptanmıştır ⁹⁹. Yakın zamanda kobay hava yolu düz kasında yapılan in vitro bir çalışmada, anandamidin EAU aracılı kontraksiyonları azalttığı ve bu etkinin CB₂ antagonisti tarafından inhibe edildiği gözlemlenmiştir. Bundan dolayı CB₂ agonistlerinin astma tedavisinde yeri olabileceği önerilmiştir ¹⁰⁰. Calignano ve arkadaşları tarafından kobaylarda yapılan başka bir çalışmada, kannabinoid agonistlerinin kapsaisine duyarlı duyuşal sinir sonlanmalarında bronkokonstrüksiyon yapan ajanların salıverilmesini CB₁ reseptörleri aracılığı ile azalttığı gösterilmiştir ¹⁰¹. Sıçan trakeasında yapılan bir başka çalışmada ise Anandamid ve WIN 55,212-2 EAU aracılı kasılma yanıtlarını CB₂ reseptörleri aracılığı ile azalttığı ortaya konmuştur ¹⁰². Bu etkilerinin dışında kannabinoidlerin kobay akciğerlerinde noradrenerjik sinir sonlanmalarında bulunan CB₁ reseptörleri aracılığı ile noradrenalin salıverilmesini azalttığı, böylece beta-2 adrenoreseptörleri üzerinden oluşun sempatik sinir sistemi aracılı solunum yolları genişlemesini sınırlandırdıkları saptanmıştır ¹⁰³.

Endokannabinoid sistemin insan ve hayvanlarda üreme fonksiyonları üzerinde etkisi olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur ⁷³. Özellikle CB₂ reseptörlerin üremede önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir. Bu reseptörlerin in vivo embriyo gelişimi, maternal-fetal etkileşme, plasenta, spermatogenesis ve sperm-oosit birleşmesi gibi durumlarda etkilerinin olduğu düşünülmektedir ¹⁰⁴. Diğer taraftan yapılan başka çalışmalarda erkeklerde marihuana, anandamid ve sentetik kannabinoidlerin CB₁ reseptörler üzerinden spermin fertilizasyon kapasitesini azalttıkları saptanmıştır ¹⁰⁵. Yapılan başka bir çalışmada CB₁ reseptör blokajının erektil disfonksiyon tedavisinde yararlı olabileceğine dair kanıt öne sürülmüştür ¹⁰⁶. Tavşan korpus kavernozumunda yapılan bir çalışmada, endokannabinoidlerin CB₁ ve CB₂ reseptörleri aracılığı ile non-nitrerjik, non-adrenerjik non-kolinerjik (NANK) gevşeme yanıtlarına katkısı olduğu gösterilmiştir ¹⁰⁷.

Ayrıca kannabinoid reseptörlerin insan ve hayvanlarda mesanede bulundukları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir ^{108, 109}. Detrusor kas tonusu ve mesane kontraksiyonları üzerinde etkileri oldukları ortaya konmuştur ¹⁰⁹.

Endokannabinoid sistemin stimülasyonunun kilo alımı, lipogenezis, insülin rezistansı, dislipidemi ve glukoz intoleransının bozulmasına neden olan metabolik süreci desteklediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. CB₁ reseptörlerinin beyin, karaciğer, adipoz doku, iskelet kası ve gastrointestinal sistem gibi enerji dengesi ve metabolik homeostazi kontrol eden periferik dokularda bulunduğu ortaya konmuştur ¹¹⁰.Yapılan bir çalışmada diyetle indüklenen obez farelerin adipoz dokusunda endokannabinoid düzeylerinin yükseldiği görülmüştür ¹¹¹. Başka bir çalışmada da diyetle indüklenen obez farelerde CB₁ reseptörlerin

dislipidemiği azalttığı gösterilmiştir ¹¹². Ayrıca CB₁ reseptör blokajının izole sıçan soleus kasında glukoz uptake'ini stimüle ettiği ortaya konmuştur ¹¹³. Bir başka çalışmada ise CB₁ reseptör blokajının, AEA kullanımından sonra indüklenen glukoz intoleransını düzelttiğini belirtilmiştir ¹¹⁴.

Endokannabinoidlerin ve kannabinoid reseptörlerin keşfinden sonra THC'nin ve marihuana içiminin immun hücre fonksiyonlarındaki etkileri pek çok çalışma ile incelenmiştir. Öncelikle marihuana içiminin immun hücrelerin fonksiyonlarını anlamlı şekilde baskıladığı gösterilmiştir. Özellikle T lenfositler, B lenfositler, doğal öldürücü (NK) hücreler ve makrofajlar üzerinde baskılayıcı etkilerinin olduğu bulunmuştur ¹¹⁵. Kannabinoidlerin bu etkisini CB₂ reseptörler aracılığı ile siklik adenosin monofosfat (sAMP)/protein kinaz A yolağının inhibisyonu ile gösterdikleri düşünülmektedir ¹¹⁶.

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda kannabinoidlerin direkt olarak kanser gelişimini inhibe ettikleri önerilmiştir. Bu önerilen mekanizma içerisinde tümör hücrelerinde apoptozis, antiproliferatif etki ve tümör hücre migrasyonu ve angiogenezin inhibisyonu yolu ile antimetastatik etkilerinin olduğu belirtilmiştir ⁶². Kannabinoidlerin insan osteosarkom hücrelerinde yapılan bir çalışmada kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptozis yaptıkları gösterilmiştir ¹¹⁷. Başka bir çalışmada, anandamidin sAMP/protein kinaz A yolağının inhibisyonu ile insanlardaki meme kanserindeki antiproliferatif etkisi tespit edilmiştir ¹¹⁸. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda, kolorektal karsinomda CB₁ reseptörlerinin CB₂ reseptörlerine göre daha önemli olduğu belirtilmiştir ⁵. Joseph ve arkadaşları, SW480 kolon karsinom hücrelerinde anandamid tarafından CB₁ reseptörlerinin aktivasyonunun tümör hücrelerinin migrasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir ¹¹⁹. Başka bir çalışmada, kannabinoidlerin gliomada

vasküler endotelyal büyüme faktörünü inhibe ederek antianjiyogenik etki gösterdikleri ortaya konmuştur ¹²⁰.

2.3.3 Kannabinoidlerin Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri

Gastrointestinal sistemde kannabinoidlerin rol aldığı fizyolojik ve patofizyolojik olaylar çok sayıda çalışma ile incelenmiştir. Kannabinoid agonistlerinin presinaptik CB₁ reseptörleri aracılığı ile gastrointestinal kanaldaki farklı bölgelerde düz kas kontraktilesini ve peristaltizmi azalttığı bilinmektedir ⁵. Bununla ilgili önerilen mekanizmalar; CB₁ reseptör aktivasyonunun asetilkolin salıverilmesini azaltması, non-adrenerjik non-kolinerjik transmisyonu inhibe etmesi, adenozin salıverilmesini modüle etmesi ve apamin duyarlı potasyum (K⁺) kanallarını aktive etmesidir ⁴.

Kobay izole ince bağırsağında yapılan bir çalışmada endojen ve sentetik kannabinoidlerin CB₁ reseptörlerine bağımlı olarak elektriksel olarak oluşan kontraksiyonları inhibe ettiği gösterilmiştir. Buna karşın kannabinoidler ekzojen olarak uygulanan asetilkolin ile postsinaptik muskarinik reseptörler aracılığı ile oluşan kontraksiyonları etkilememektedir ¹²¹. Farelerde yapılan bir çalışmada selektif yağ asidi amid hidrolaz (FAAH) inhibitörü 5-hidroksiseratonin ve palmitolizopropilamid'in intestinal motiliteyi inhibe ettiği ve bu inhibisyonun CB₁ reseptör antagonisti rimonabant tarafından azaltıldığı, ancak VR₁ reseptör antagonisti 5-iyodoresiniferatoksinin bu inhibisyonu etkilemediği gösterilmiştir ¹²². Başka bir çalışmada, sıçanlara intravenöz olarak uygulanan THC sonrasında intragastrik basınç ve pilorik kontraktilitenin

uzun süreli olarak azaldığı ve bu değişikliğin vagatomi, gangliyon blokajı ve CB₁ reseptör blokörü SR141716 ile tamamen ortadan kalktığı belirtilmiştir ¹²³. Sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada lipopolisakkarit ile oluşturulan gastrointestinal transit hızındaki artışın CB₂ reseptör antagonisti ile azaldığı saptanmıştır. Lipopolisakkarite bağlı transit artışının inflamatuvar stimulusa bağlı olduğu öne sürülmüştür ¹²⁴.

Kannabinoidler gastrointestinal kanalda motilite üzerindeki etkilerini CB₁ reseptörleri üzerinden göstermektedirler. CB₂ reseptörleri, özellikle inflamasyona bağlı motilite değişikliklerinde etkilidir ⁵. Ayrıca endokannabinoid sistemin gastrik asit sekresyonunun regülasyonunda rol aldığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir ¹³. Sıçan izole mide preparatlarında yapılan bir çalışmada THC'nin yüksek dozlarda histamine bağlı gastrik asit sekresyonundaki artışı inhibe ettiği bulunmuştur ¹²⁵. Sıçanlarda pentagastrin ile uyarılmış gastrik asit sekresyonun WIN 55,212-2 ve THC'ün sentetik agonisti HU210 ile inhibe edildiği ve bu etkinin CB₁ reseptör antagonistleri ile önlendiği değişik çalışmalarda gösterilmiştir. Bu bulgular preganglionik ve postganglionik kolinerjik yollarda yerleşmiş olan CB₁ reseptörlerinin kannabinoidlerin gastrik antisekretuar etkilerine aracılık ettiğini göstermektedir ^{55, 126}.

Yapılan yeni bir çalışmada anandamidin mukozal oksidatif stresi azalttığı, inflamatuvar süreci inhibe ettiği ve stresle indüklenen gastrik ülserde gastrik mukozayı koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur. Bu etkilerin kısmen kapsaisin duyarlı duyuşal sinirler tarafından düzenlendiği ortaya konmuştur ¹²⁷. Gastrointestinal sistemin inflamatuvar hastalıklarında endokannabinoidlerin seviyelerinde ve kannabinoid reseptörlerinin ekspresyonunda artış olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir ⁵. Massa F. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, intrarektal dinitrobenzen sülfonik

asit uygulaması ile farelerde deneysel enterit oluşturulmuş ve CB₁ reseptör ekspresyonunun kolonda arttığı saptanmıştır ¹²⁸. CB₂ reseptör agonistlerinin ise inflamasyonda direkt bir etkisi olmadığı, ancak CB₂ reseptörlerinin aktivasyonunun proinflamatuvar sitokinlerin inhibisyonuna neden olduğu ileri sürülmüştür ¹²⁹.

Kannabinoidlerin CB₁ reseptörleri aracılığı ile alt özefagus sfinkterinin relaksasyonunu düzenlediği tespit edilmiştir ¹³⁰. Köpeklerde yapılan fonksiyonel bir çalışmada kannabinoid agonistleri WIN 55,212-2 ve THC'nin alt özefagus sfinkterindeki relaksasyonu azalttığı gösterilmiştir ¹³¹.

Kannabinoidlerin insanlarda antiemetik etkileri de bulunmaktadır. CB₁ reseptörü ve FAAH beyinde emezis ile ilgili bölgeler olan dorsal vagal kompleks ve vagusun dorsal motor çekirdeğinde bulunduğu gösterilmiştir. CB₁ reseptörünün aktivasyonunun değişik hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda sisplatin, 5-hidroksitriptofan, opioidler, lityum ile oluşan emezise karşı koruyucu etkisi bulunduğu saptanmıştır ⁵.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İzole Tavşan Mide Fundus Preparatının Hazırlanması

Deneylerde 2,5-3 kg. ağırlığında 30 adet albino tavşan kullanılmıştır. Çalışma Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (G.Ü.ET-06.078). Tavşanlar normal laboratuvar koşullarında standart laboratuvar hayvan yemi ile beslendi, tavşanlar kulak veninden tiyopental (30 mg/kg, i.v.) ile anesteziye edildikten sonra karın orta hat bölgesinden açılarak mideye ulaşıldıktan sonra büyük kurvatür boyunca açılıp özefagus sfinkteri ile büyük kurvatur arasındaki bölge kesilerek vücut haricine çıkarıldı. Doku, önceden 37° C'ye ısıtılmış ve %5 CO₂, %95 O₂ karışımı ile havalandırılan Krebs solüsyonu bulunan petrilere konulup, petrilere epidermal doku, bağ dokusu dokudan uzaklaştırılmıştır. Üzerindeki mukoza tabakası uzaklaştırılan mide fundusu 3x3x20 mm boyutunda longitudinal şeritler halinde kesilerek hazırlandı. Dokular organ askısı yardımıyla Krebs solüsyonu içeren 20 ml'lik organ banyosuna bir ucu organ askısına, bir ucu izometrik kasılmaları kayıt etmek için izometrik kuvvet transdüserine (MAY, FDT05, COMMAT Ltd., Ankara, Türkiye) bağlı olacak şekilde yerleştirilmiştir. İzometrik düz kas kasılmaları ve gevşemeleri transdüserler aracılığı ile (BIOPAC, MP35 System Inc, COMMAT Ltd., Ankara, Türkiye) kayıt edilmiştir.

3.2. Deney Protokolu

Dokulara deneylerin başlangıcında 1 g ön gerim uygulanmış ve 15 dk da bir yıkanarak bir saat süre ile dengelenmeye bırakılmıştır. Spontan tonusun oluşması nedeniyle bozulan gerim dinlenme süreci boyunca tekrar 1 g'a ayarlanmıştır. Dinlenme periyodunun ardından yapılan ön deneylerde Elektriksel Alan Uyarısı (EAU) için uygun parametreler belirlenmiş, EAU için dokular iki platin elektrod arasına vertikal olarak ve elektrodla değmeyecek şekilde asılmıştır. Elektriksel stimülasyon için STPT 03 Stimülatör (MAY STPT 03 Stimülatör Research Stimulator, COMMAT Ltd., Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. EAU aracılı kasılma yanıtları 120 s. aralıkla 10 s. süre ile 60 V, 1 ms. parametrelerinde ve 8-16 Hz de alınmıştır.

EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları, sempatik sinir sisteminin ve prostoglandinlerin etkisini ortadan kaldırmak için, sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin salıverilmesini inhibe eden guanetidin (10^{-6} M) ve siklooksijenaz inhibitörü indometasin (10^{-5} M) varlığında alınmıştır. Guanetidin ve indometasin organ banyosuna EAU aracılı kasılma yanıtları elde edilmeden 20 dk. önce eklenmiştir.

Ayrı bir seri deneyde maddelerin çözücüsü olan dimetil sülfoksit (DMSO) 'in etkisine bakıldı. DMSO, EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarında artışa neden oldu. DMSO ortama artan dozlarda eklenerek submaksimal artışa neden olan miktar 180 mikrolitre olarak belirlendi. DMSO bu miktarda EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarında % $205,15 \pm 16,82$ artışa neden oldu. EAU kasılma yanıtları üzerine

maddelerin etkisi değerlendirilirken ortama 180 mikrolitre DMSO eklenerek maddelerin net etkisi değerlendirildi.

3.2.1. EAU Aracılı Kolinerjik Kasılma Yanıtların Tanımlaması

EAU aracılı kasılma yanıtları alındıktan sonra ortama farklı dokularda farklı agonist ve antagonistler; guanetidin (10^{-6} M) ; indometasin (10^{-5} M); atropin (muskarinik reseptör antagonisti, 10^{-9} - 10^{-7} M) ; neostigmin (antikolinesteraz, 10^{-7} - 10^{-6} M); ω -konotoksin GVIA (spesifik voltaj bağımlı N tipi Ca^{+2} kanal blokörü, 10^{-7} M) uygulanarak tanımlama yapıldı.

3.2.2. EAU Aracılı Kolinerjik Kasılma Yanıtları Üzerine Endokannabinoidlerin Etkileri ve Olası Etkilerine Kannabinoid Reseptörlerinin Katkılarının Araştırılması

Mide fundus şeritlerinde guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında kontrol kasılma yanıtları elde edildi. Kasılma yanıtları stabilize olduktan sonra ortama maddelerin çözücüsü olan DMSO 180 mikrolitre eklendi. DMSO eklendikten 20 dakika sonra ortama artan dozlarda endojen kannabinoid anandamid (10^{-7} – 3×10^{-5} M), kannabinoid reseptör agonisti WIN 55,212-2 (10^{-9} – 3×10^{-5} M), selektif CB₁ reseptör agonisti olan ACEA (10^{-7} – 3×10^{-5} M), selektif CB₂ reseptör agonisti olan JWH015 (10^{-8} – 3×10^{-5} M) eklendi ve EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine etkilerine bakıldı.

CB₁ reseptörünün katkısını araştırmak için selektif CB₁ reseptör antagonisti AM 251 (10^{-6} M) eklendi. AM 251 eklendikten 20 dk. sonra ortama artan dozlarda anandamid ($10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$ M), WIN 55,212-2 ($10^{-9} - 3 \times 10^{-5}$ M), ACEA ($10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$ M) eklendi ve EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine etkilerine bakıldı.

CB₂ reseptörünün katkısını araştırmak için selektif CB₂ reseptör antagonisti AM 630 (10^{-6} M) eklendi. AM 630 eklendikten 20 dk. sonra ortama artan dozlarda anandamid ($10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$ M), WIN 55,212-2 ($10^{-9} - 3 \times 10^{-5}$ M), JWH015 ($10^{-8} - 3 \times 10^{-5}$ M) eklendi ve EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine etkilerine bakıldı.

CB₁ ve CB₂ reseptörlerinin katkısını araştırmak için ortama AM 251 (10^{-6} M) ve AM 630 (10^{-6} M) birlikte eklendikten 20 dk. sonra ortama artan dozlarda anandamid ($10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$ M) ve WIN 55,212-2 ($10^{-9} - 3 \times 10^{-5}$ M) eklendi ve EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine etkilerine bakıldı.

3.2.3. EAU Aracılı Kolinerjik Kasılma Yanıtları Üzerine Kannabinoid Reseptör Antagonistlerinin Etkilerinin Araştırılması

Mide fundus şeritlerinde guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında kontrol kasılma yanıtları elde edildi. Kasılma yanıtları stabilize olduktan sonra ortama maddelerin çözücüsü olan DMSO 180 mikrolitre eklendi. DMSO eklendikten 20 dakika sonra ortama selektif CB₁ reseptör antagonisti olan AM 251 (10^{-6} M), selektif CB₂ reseptör

antagonisti olan AM 630 (10^{-6} M) eklendi ve EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine etkilerine bakıldı.

3.2.4. Noradrenalinle Kastırılmış Dokularda Kannabinoid

Reseptör Agonistlerinin Gevşetici Etkilerinin Araştırılması

Mide fundus şeritleri, guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında noradrenalin (10^{-6} M) ile kasıldı. Kasılma yanıtları platoya ulaşınca ortama artan dozlarda anandamid (10^{-7} – 3×10^{-5} M), WIN 55,212-2 (10^{-9} – 3×10^{-5} M), ACEA (10^{-7} – 3×10^{-5} M), JWH015 (10^{-8} – 3×10^{-5} M) eklendi ve gevşeme yanıtları elde edildi.

3.3. Deneylerde Kullanılan Solüsyon ve Maddeler

Banyo solüsyonu olarak kullanılan Krebs-Henseleit çözeltisinin bileşimi (mM), NaCl 118; KCl 4.7; NaHCO_3 25; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.9; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.26; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5; Glukoz monohidrat 11. 80 mM KCl'lik Krebs-Henseleit çözeltisinin bileşimi (mM), NaCl 42.7; KCl 80.0 mM; NaHCO_3 25; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.9; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.26; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5; Glukoz monohidrat 11.

Atropin sülfat, guanetidin monosülfat, indometasin, neostigmin ve WIN 55,212-2 Mesylate Salt (R - [+] - [2,3 – Dihydro - 5 Methyl – 3 - ([Morpholinyl] Methyl) pyrrolo (1,2,3-de) - 1,4 - benzoxazinyl] - [1-naphthalenyl] methanone) (Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, ABD)'den temin edilirken, anandamid, ACEA (Arachidonyl-2-

chloroethylamide hydrate), ω -konotoksin GVIA, AM251 [N-(piperidin-1-il)-5-(4-iodofenil)-1 (2,4-diklorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-karboksamid], AM630 [6-iyodo-2-metil-1-[2-(4 morfolinil)etil]-1H-indol-3-il (4 metioksifenil) metanon ve JWHO15 [(2-metil-1-propil-1H-indol-3-il)-1-naptialenilmetanon] Tocris (Ellisville, MO, USA)'den temin edildi. Atropin sülfat, guanetidin monosülfat, neostigmin ve ω -konotoksin GVIA distile suda çözündü. İndometasin, anandamid, AM 251, AM 630, JWHO15, ACEA ve WIN 55,212-2 DMSO'da çözündü.

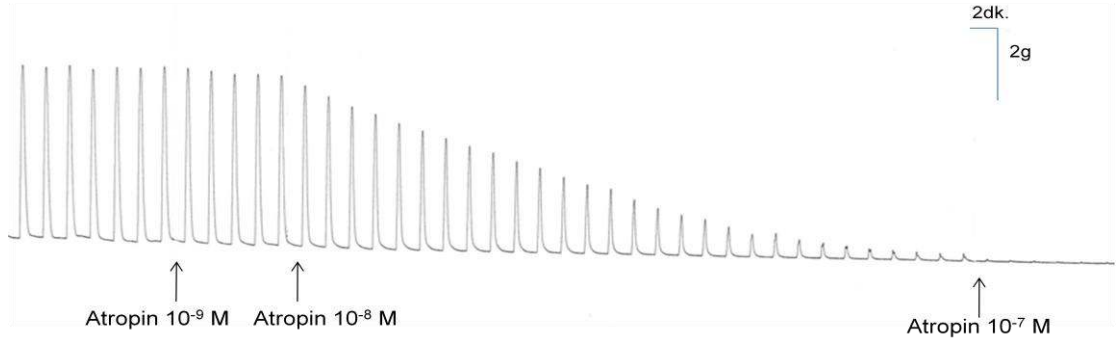
3.4. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz

Kannabinoid agonist ve antagonistlerinin kontrol yanıtlarına olan etkisi ifade edilirken, EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları kontrol yanıtlarının yüzdesi olarak hesaplandı. Ekzojen gevşeme yanıtları ise noradrenalin kasılmalarının yüzdesi olarak ifade edildi. Verilerin istatistiksel analizi "SPSS for Windows 10.0" programı ile bilgisayar ortamında yapılmıştır. Deneysel sonuçlar, ortalama değer $\pm$ standart hata ile ifade edilmiştir. Deney gruplarından elde edilen yanıtların istatistiksel olarak anlamlılığını değerlendirmek için bağımsız gruplarda Mann Whitney U testi, bağımlı gruplarda ise Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanılmış, $p < 0.05$ ise ortalamalar arası fark anlamlı kabul edilmiştir.

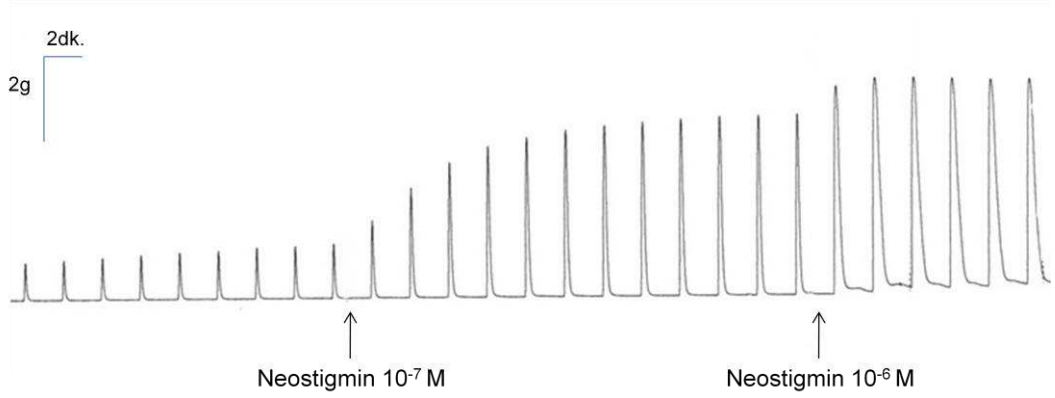
4.BULGULAR

4.1. EAU Aracılı Kolinerjik Kasılma Yanıtların Tanımlaması

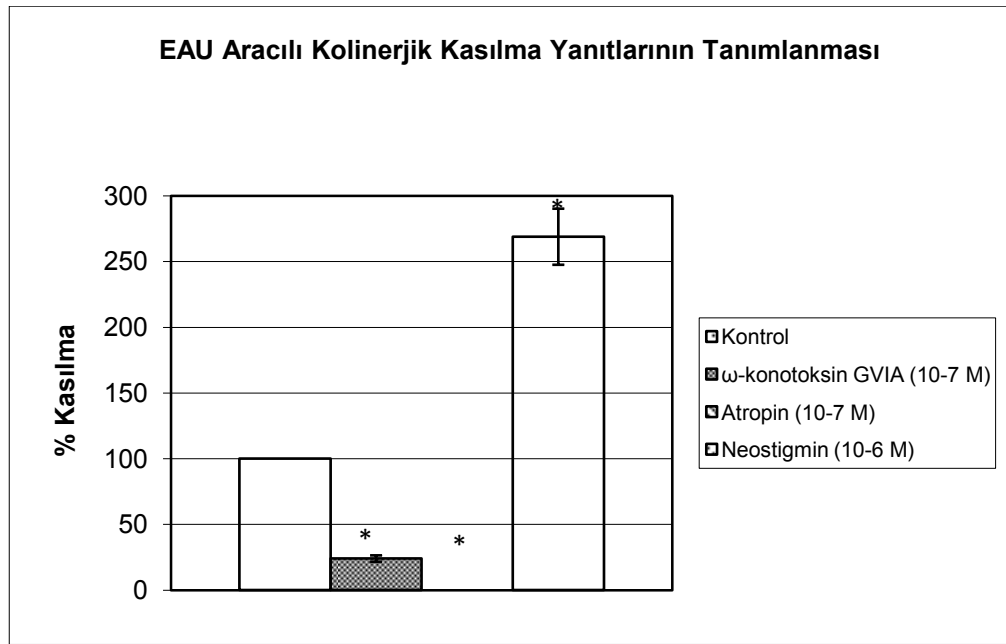
Guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadi. ω -konotoksin GVIA (10^{-7} M) EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($76,08 \pm 2,45$). Atropin, konsantrasyon bağımlı olarak (10^{-9} - 10^{-7} M), EAU aracılı kasılma yanıtlarını tamamen ortadan kaldırdı (Şekil 4). Neostigmin (10^{-7} - 10^{-6} M), konsantrasyon bağımlı olarak, EAU aracılı kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırdı ($\%268,82 \pm 21,35$) (Şekil5) (Grafik1).



Şekil 4 : EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine atropin (10^{-9} – 10^{-7} M)'in etkisi



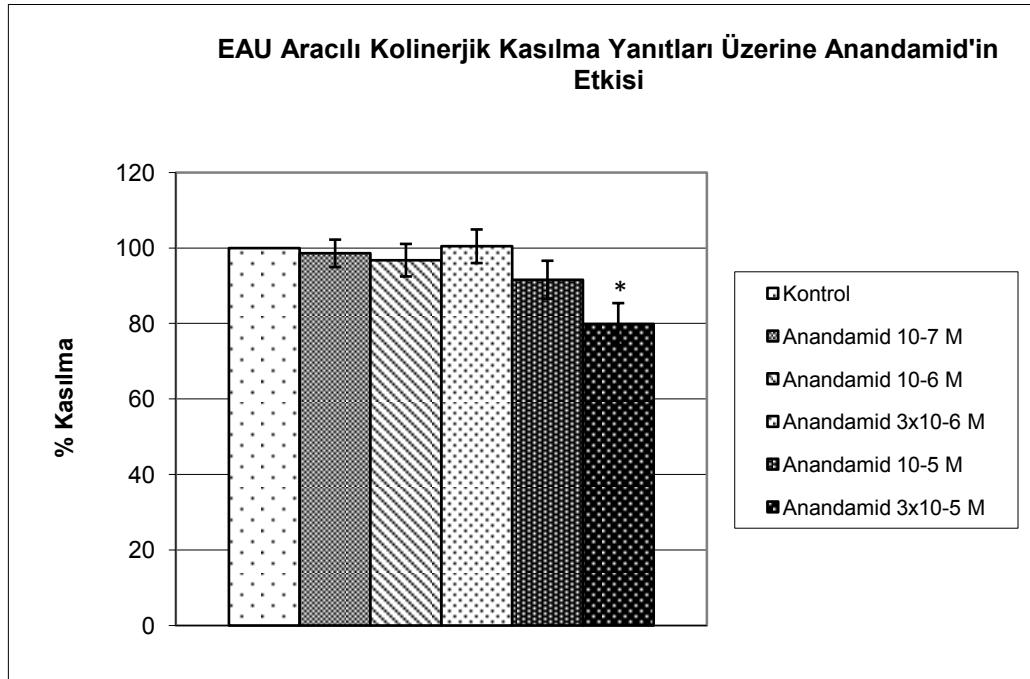
Şekil 5 : EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine neostigmin (10^{-7} - 10^{-6} M)'in etkisi.



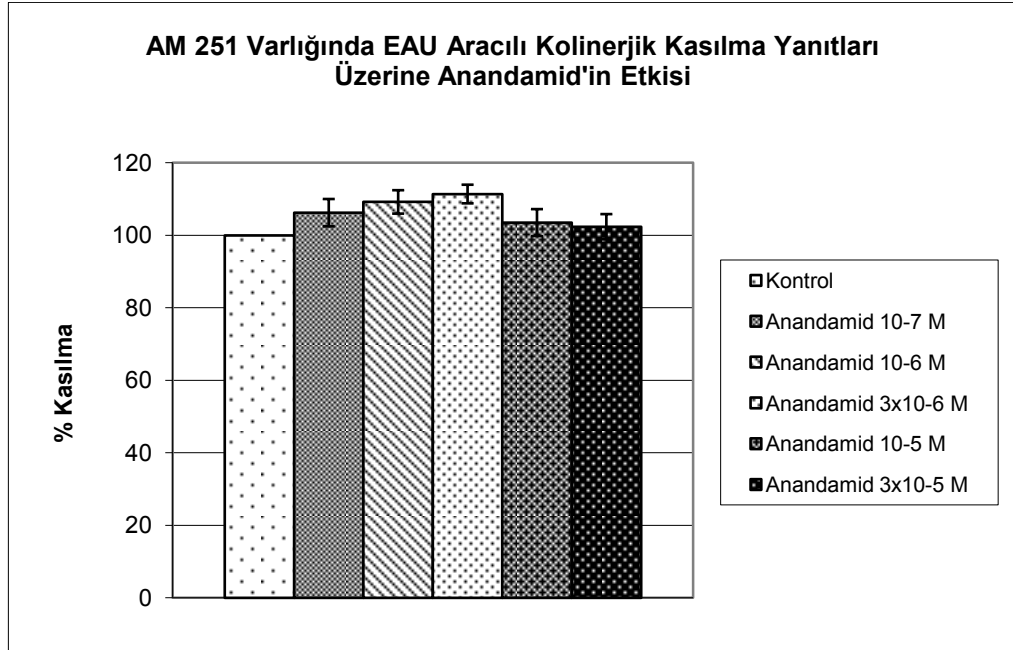
Grafik 1: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine ω-konotoksin GVIA(10^{-7} M), atropin (10^{-7} M) ve neostigmin (10^{-6} M)'in etkisi. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (*, $p < 0,05$, $n=4$).

4.2. EAU Aracılı Kolinerjik Kasılma Yanıtları Üzerine Endokannabinoidlerin Etkileri ve Olası Etkilerine Kannabinoid Reseptörlerinin Katkılarının Araştırılması

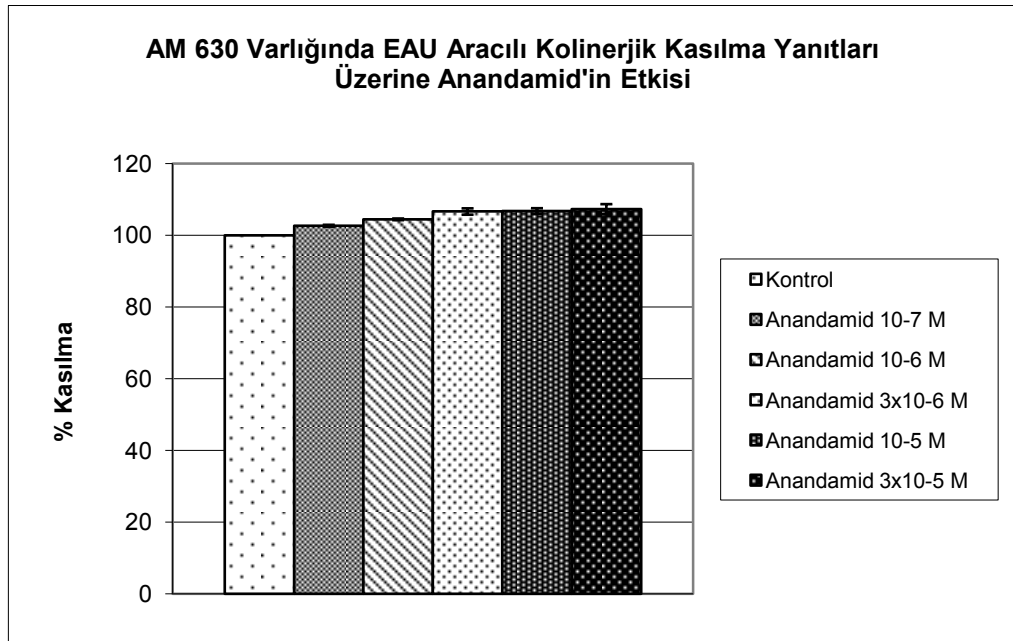
Anandamid (10^{-7} – 3×10^{-5} M), konsantrasyon bağımlı olarak, EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($20,16 \pm 5,55$) (Grafik 2). CB_1 reseptör antagonisti AM 251 (10^{-6} M), CB_2 reseptör antagonisti AM 630 (10^{-6} M) ve her iki antagonistin birlikte bulunduğu ortamda anandamid'in bu inhibitör etkisi ortadan kalktı (Grafik 3, 4, 5).



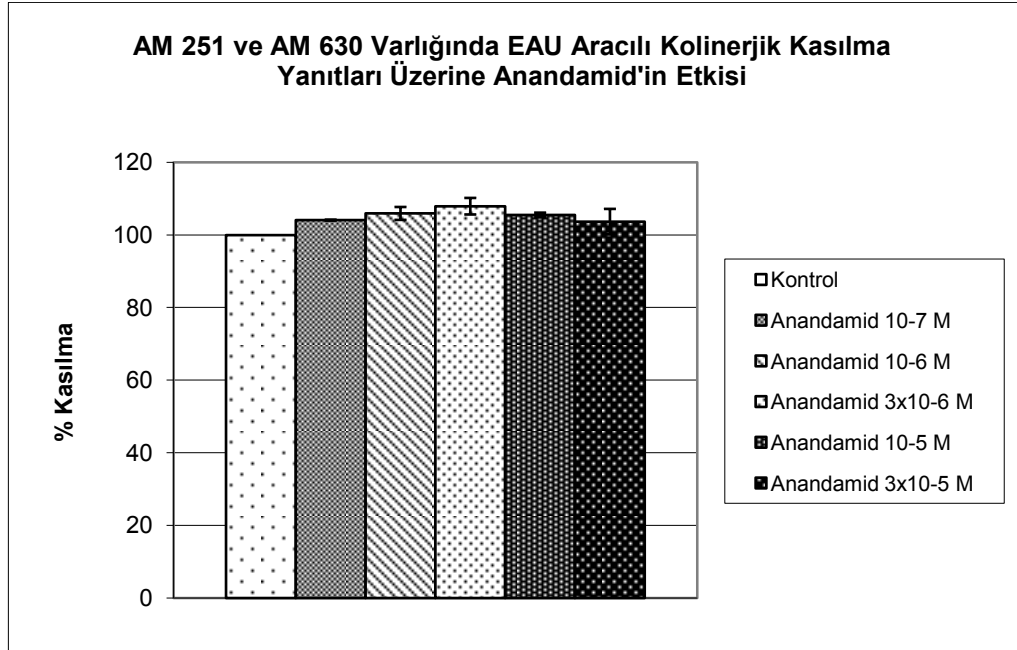
Grafik 2: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine Anandamid (10^{-7} – 3×10^{-5} M) 'in etkisi. Kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (*, $p < 0,05$, $n=9$).



Grafik 3: AM 251 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine Anandamid (10^{-7} – 3×10^{-5} M) 'in etkisi. Kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve AM 251 (10^{-6} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (n=5).

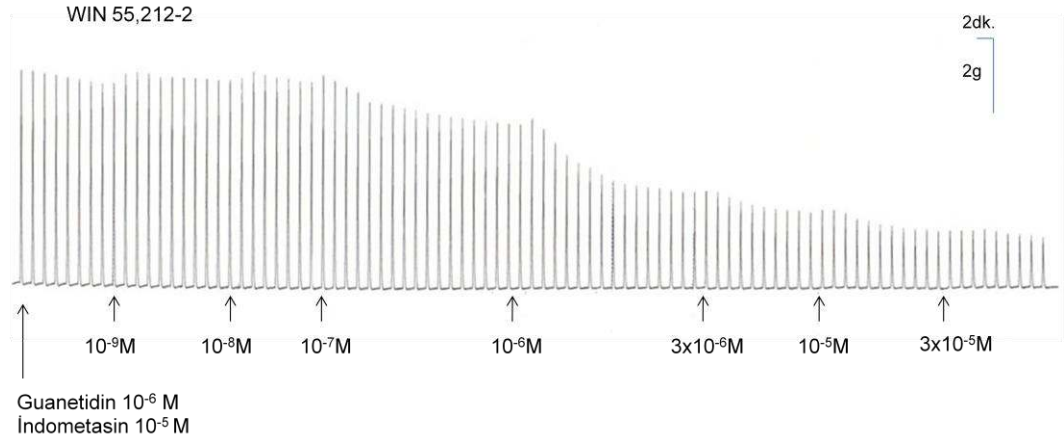


Grafik 4: AM 630 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine Anandamid (10^{-7} – 3×10^{-5} M) 'in etkisi. Kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve AM 630 (10^{-6} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (n=4).

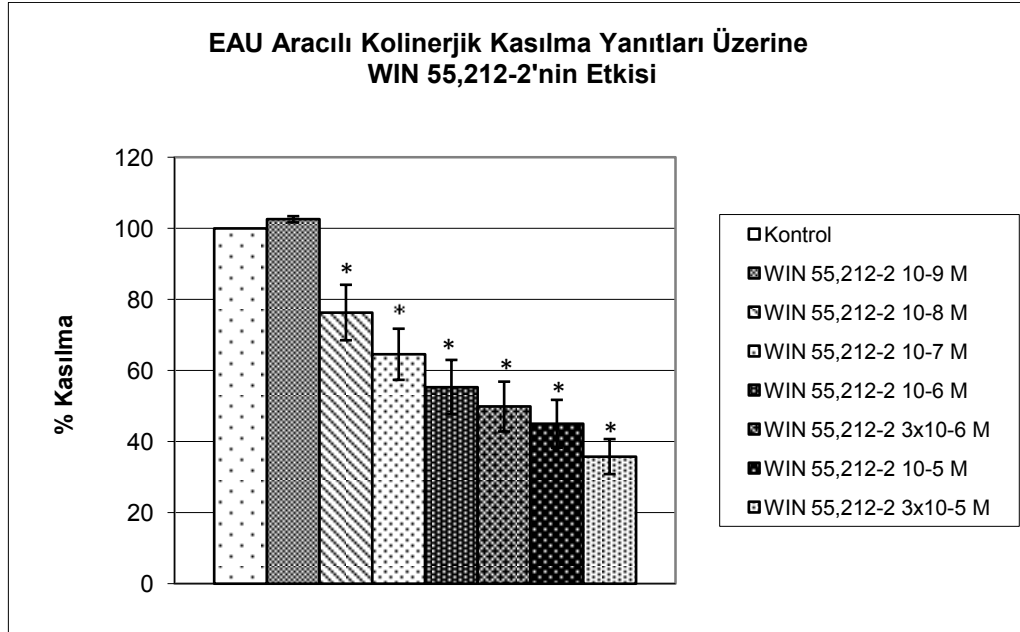


Grafik 5: AM 251 ve AM 630 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine Anandamid (10^{-7} – 3×10^{-5} M) 'in etkisi. Kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M), AM 251 (10^{-6} M) ve AM 630 (10^{-6} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (n=4).

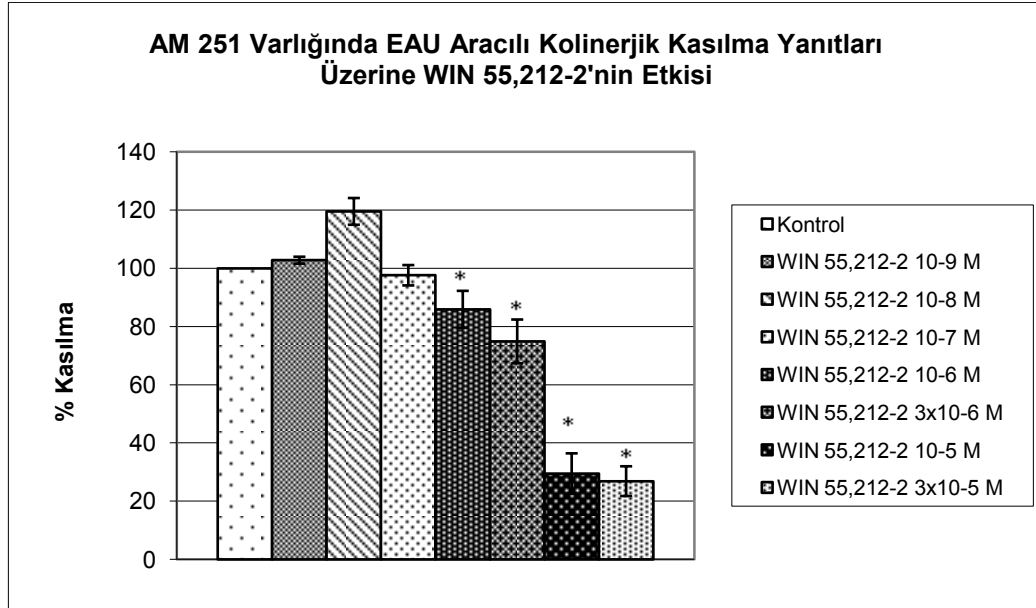
WIN 55,212-2 (10^{-9} – 3×10^{-5} M), konsantrasyon bağımlı olarak, EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($64,22 \pm 4,93$) (Şekil 6) (Grafik 6). WIN 55,212-2 'nin bu inhibitör etkisini, CB1 reseptör antagonisti AM 251 (10^{-6} M) etkilemezken, CB₂ reseptör antagonisti AM 630 (10^{-6} M)'un bulunduğu ortamda bu etkisi istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldı (Grafik 7,8,9).



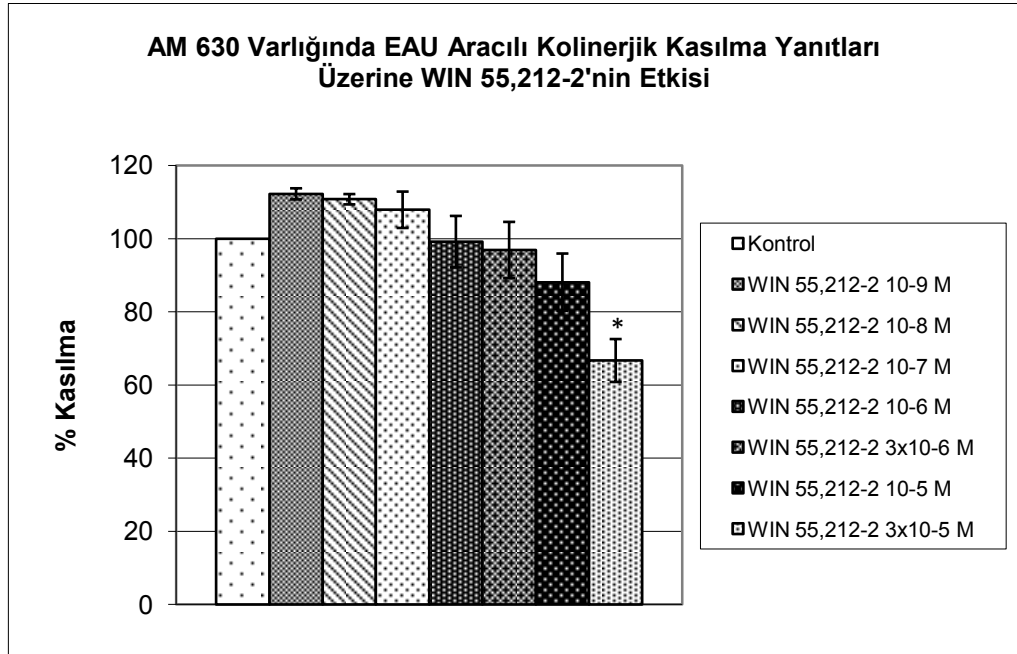
Şekil 6 : EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine WIN 55,212-2(10⁻⁹ – 3x10⁻⁵ M) 'nin etkisi.



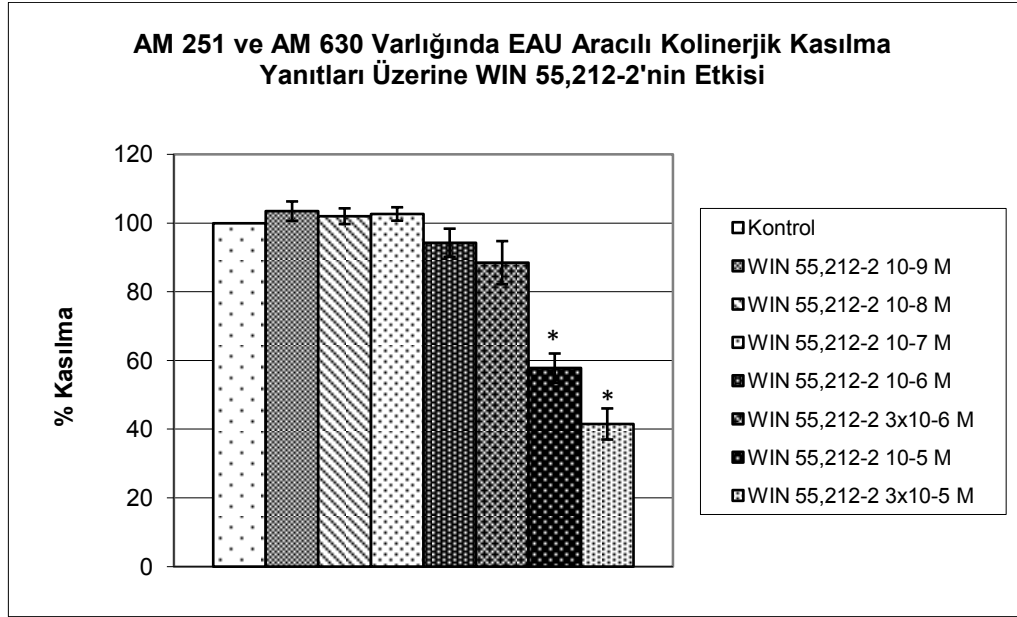
Grafik 6: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine WIN 55,212-2(10⁻⁹ – 3x10⁻⁵ M) 'in etkisi. Kasılma yanıtları guanetidin (10⁻⁶ M) ve indometasin (10⁻⁵ M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (*, p <0,05, n=6).



Grafik 7: AM 251 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine WIN 55,212-2(10^{-9} – 3×10^{-5} M) 'in etkisi. Kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve AM 251 (10^{-6} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (*, $p < 0,05$, $n=6$).

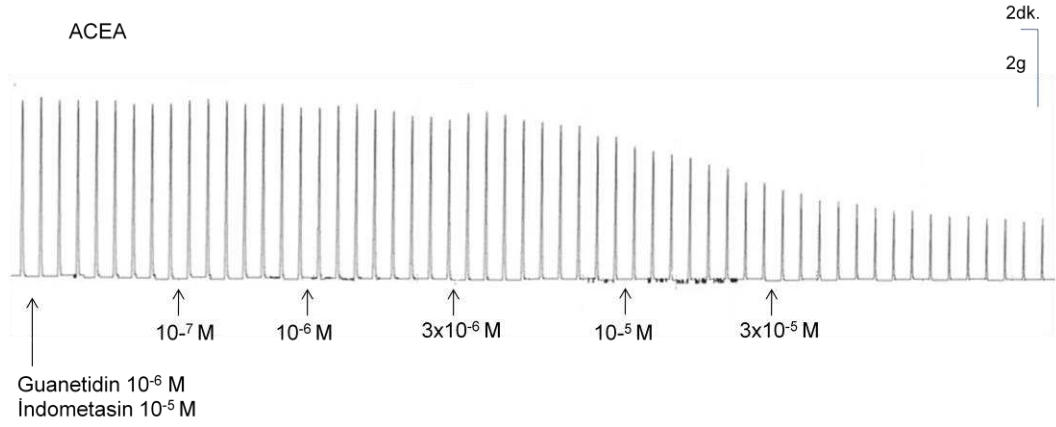


Grafik 8: AM 630 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine WIN 55,212-2(10^{-9} – 3×10^{-5} M) 'in etkisi. Kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve AM 630 (10^{-6} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (*, $p < 0,05$, $n=5$).

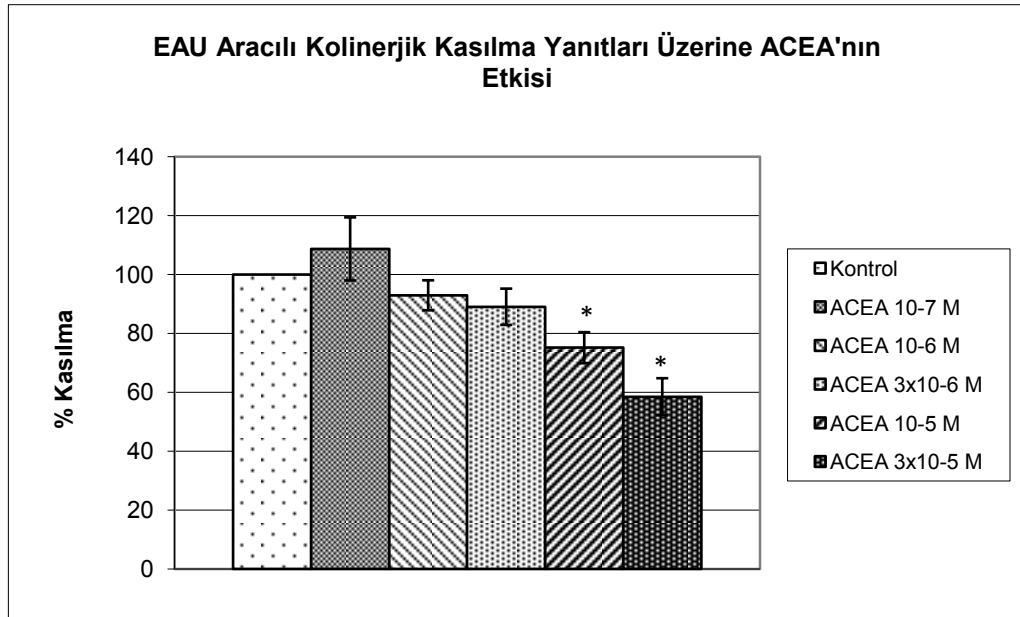


Grafik 9: AM 251 ve AM 630 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine WIN 55,212-2(10^{-9} – 3×10^{-5} M) 'in etkisi. Kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M), AM 251 (10^{-6} M) ve AM 630 (10^{-6} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (*, $p < 0,05$, $n=5$).

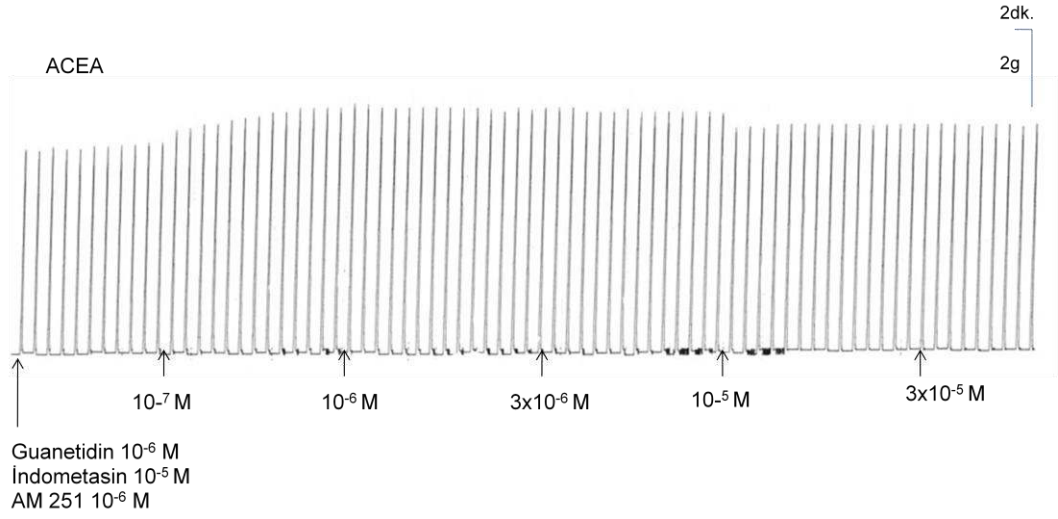
ACEA (10^{-7} – 3×10^{-5} M), konsantrasyon bağımlı olarak, EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($41,51 \pm 6,28$) (Şekil 7) (Grafik 10). ACEA 'nın bu inhibitör etkisi, CB₁ reseptör antagonisti AM 251 (10^{-6} M)'in bulunduğu ortamda istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldı (Şekil 8) (Grafik 11).



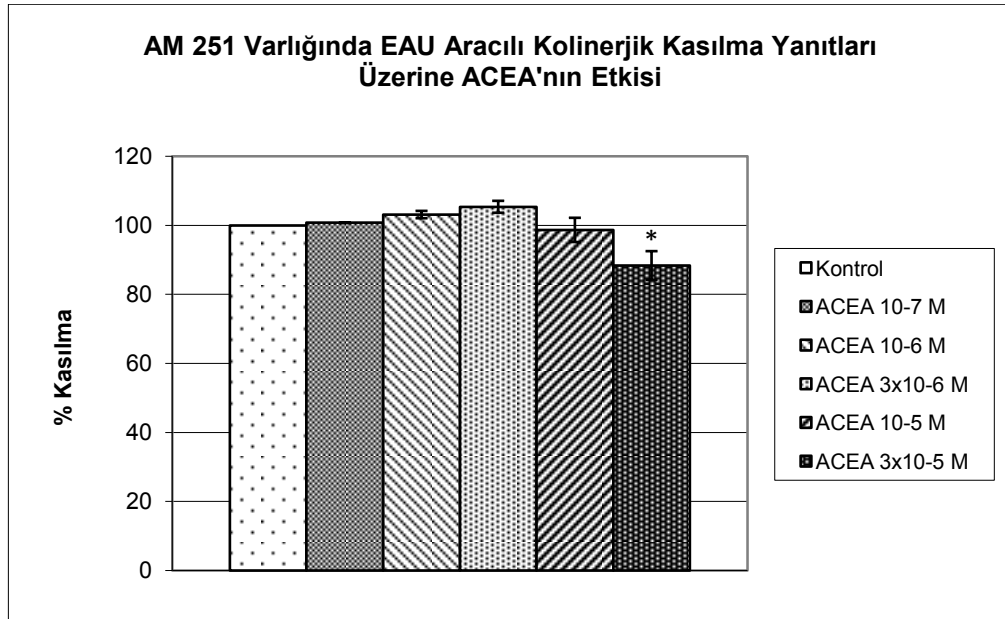
Şekil 7 : EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine ACEA(10⁻⁷ – 3x10⁻⁵ M) 'nın etkisi.



Grafik 10: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine ACEA (10⁻⁷ – 3x10⁻⁵ M) 'nın etkisi. Kasılma yanıtları guanetidin (10⁻⁶ M) ve indometasin (10⁻⁵ M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (*, p < 0,05, n=6).

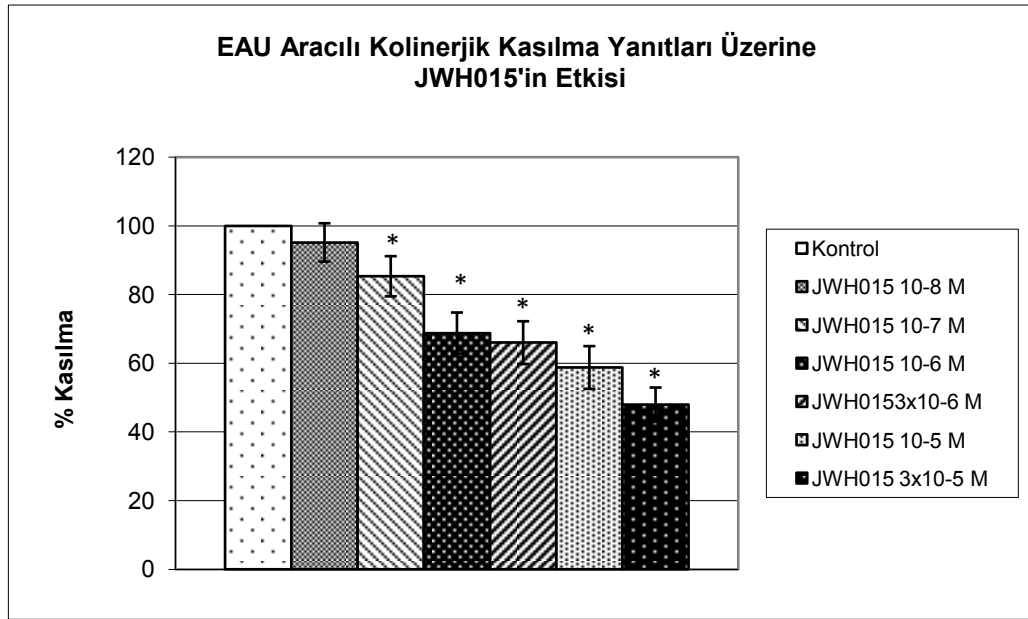


Şekil 8 : AM 251 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine ACEA ($10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$ M) 'nın etkisi.

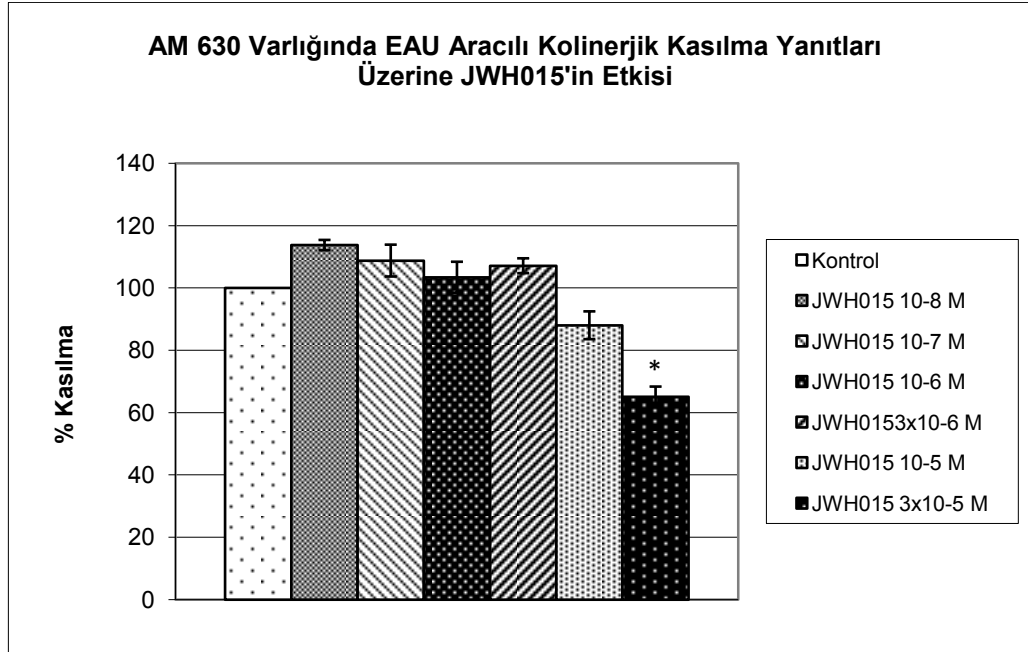


Grafik 11: AM 251 varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine ACEA ($10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$ M) 'nın etkisi. Kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve AM 251 (10^{-6} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (*, $p < 0,05$, $n=6$).

JWH015 (10^{-8} – 3×10^{-5} M), konsantrasyon bağımlı olarak, EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($52,08 \pm 3,29$) (Grafik 12). JWH015 'in bu inhibitör etkisi, CB₂ reseptör antagonisti AM 630 (10^{-6} M)'un bulunduğu ortamda istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldı (Grafik 13).



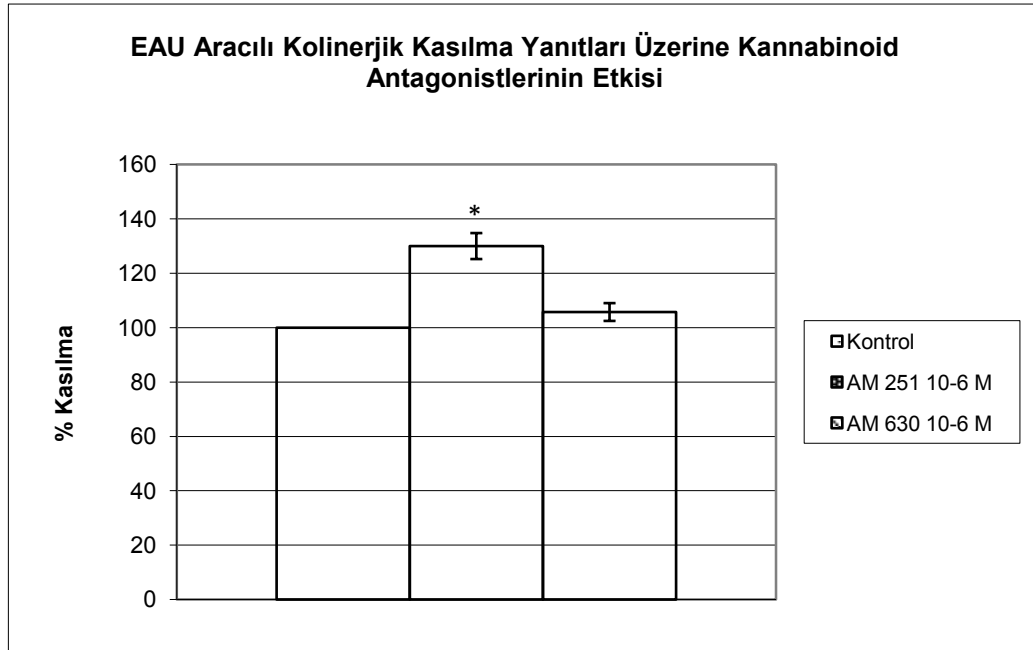
Grafik 12: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine JWH015 (10^{-8} – 3×10^{-5} M) 'in etkisi. Kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (*, $p < 0,05$, $n=5$).



Grafik 13: AM 630 varlığında EAU aracılı kolinergik kasılma yanıtları üzerine JWH015 (10^{-8} – 3×10^{-5} M) 'in etkisi. Kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve AM 630 (10^{-6} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (*, $p < 0,05$, $n=5$).

4.3. EAU Aracılı Kolinerjik Kasılma Yanıtları Üzerine Kannabinoid Reseptör Antagonistlerinin Etkilerinin Araştırılması

EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını CB_1 reseptör antagonisti AM 251 (10^{-6} M) istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırırken ($\%30,01 \pm 4,78$), CB_2 reseptör antagonisti AM 630 (10^{-6} M) etkilemedi (Grafik 14).

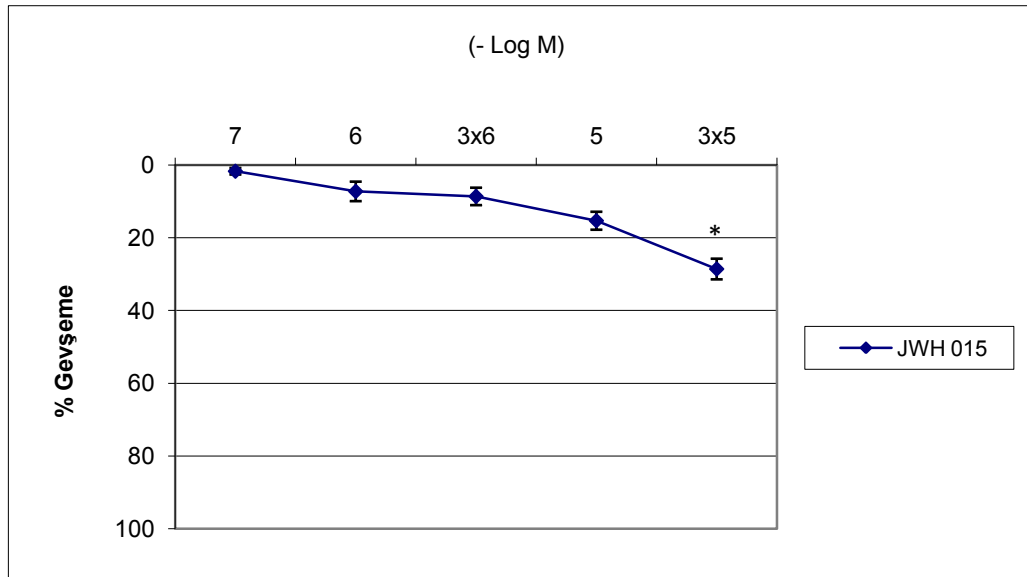


Grafik 14: EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine AM 251 (10^{-6} M) ve AM 630 (10^{-6} M)'un etkisi. Kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (*, $p < 0,05$, $n=6$).

4.4. Noradrenalinle Kastırılmış Dokularda Kannabinoid

Reseptör Agonistlerinin Gevşetici Etkilerinin Araştırılması

Noradrenalin ile kastırılmış dokularda Anandamid, WIN 55,212-2 ve ACEA istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmazken, JWH015 istatistiksel olarak anlamlı gevşemeye neden oldu ($28,57 \pm 2,84$) (Grafik 15).



Grafik 15: Noradrenalin ile kastırılmış dokularda JWH015(10^{-7} - 3×10^{-5} M)'in gevşetici etkisi. Kasılma yanıtı guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. Gevşeme yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (*, $p < 0,05$, $n=6$).

5. TARTIŞMA

Sunulan çalışmada mide fundus dokusunda EAU aracılı kasılma yanıtları elde edildi. EAU aracılı kasılma yanıtları üzerinde sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin salıverilmesini inhibe eden guanetidin ve siklooksijenaz inhibitörü indometasin istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadi. Muskarinik reseptör antagonisti atropin, konsantrasyon bağımlı olarak EAU aracılı kasılma yanıtlarını tamamen inhibe ederken, bir antikolinesteraz olan neostigmin konsantrasyon bağımlı olarak bu yanıtları arttırdı. Ayrıca spesifik voltaj bağımlı N tipi Ca^{+2} kanal blokörü ω -konotoksin GVIA, EAU aracılı kasılma yanıtlarını büyük oranda azalttı. Bu sonuçlar mide fundusunda elde edilen EAU aracılı kasılma yanıtlarının sinirsel uyarıya bağılı olduğunu ve kolinerjik sinirler kaynaklı olduğunu göstermektedir.

Daha önce laboratuvarımızda mide fundusunda yapılan çalışmalarla da benzer şekilde, atropin EAU aracılı kasılma yanıtlarını tamamen ortadan kaldırırken, neostigmin bu yanıtları potansiyelize etmiştir. Aynı zamanda mide fundusundaki EAU aracılı kasılma yanıtlarının tetradotoksin(TTX) ile ortadan kalktığı gösterilmiştir^{132,133}. Kolinerjik sinirler, gastrointestinal sistem motilitesinin düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Mide fundusunun kolinerjik innervasyonunun olduğu ve muskarinik reseptörler aracılığı ile kasılmaya neden olduğu bilinmektedir. Gastrointestinal kanalda asetilkolin, gastrointestinal motilitenin primer düzenleyicisi ve ana kasılmaya neden olan nörotransmitter olarak kabul görmektedir. Enterik sinirlerden asetilkolin salıverilmesi spesifik nöronal reseptörler içeren presinaptik kontrol altındadır^{34,37,40}. Bu bilgilere benzer şekilde, sonuçlarımız mide

fundusunda elde ettiğimiz EAU aracılı kasılma yanıtlarının kolinerjik olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, guanetidin ve indometasinli ortamda, endojen kannabinoid anandamid, kannabinoid reseptör agonisti WIN 55,212-2, selektif CB₁ reseptör agonisti ACEA ve selektif CB₂ reseptör agonisti JWH015'in EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine etkileri değerlendirildi. Aynı zamanda agonistlerin etkilerinin hangi reseptörler üzerinden olduğunu araştırmak için, selektif CB₁ reseptör antagonisti AM 251, selektif CB₂ reseptör antagonisti AM 630 ve her iki reseptör antagonistinin birlikte bulunduğu ortamda agonistlerin etkisi değerlendirildi. Ayrı bir seri deneyde de reseptör antagonistleri olan AM 251 ve AM 630'un EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine etkisi ve agonistlerin noradrenalin ile kastırılmış dokularda direkt gevşetici etkileri değerlendirildi.

Anandamid, WIN 55,212-2, ACEA ve JWH015 , konsantrasyona bağımlı olarak, EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttı. Anandamid'in inhibitör etkisi, selektif CB₁ reseptör antagonisti AM 251, selektif CB₂ reseptör antagonisti AM 630 ve her iki reseptör antagonistinin birlikte bulunduğu ortamda tamamen geri döndü. WIN 55,212-2'nin inhibitör etkisi, selektif CB₂ reseptör antagonisti AM 630 varlığında düşük konsantrasyonlarda daha fazla olmak üzere geri dönerken, selektif CB₁ reseptör antagonisti AM 251 ve her iki antagonistin birlikte bulunduğu ortamda geri dönmedi. ACEA'nın inhibitör etkisi, selektif CB₁ reseptör antagonisti AM 251 varlığında tamamen geri döndü. JWH015'in inhibitör etkisi, selektif CB₂ reseptör antagonisti AM 630 varlığında düşük konsantrasyonlarda tamamen geri döndü, yüksek konsantrasyonlarda da tamamen olmamakla birlikte geri

dönüş gözlemlendi. Anandamid, WIN 55,212-2 ve ACEA noradrenalin ile kastırılmış dokularda gevşemeye neden olmazken, JWH015 konsantrasyon bağımlı olarak gevşemeye neden oldu. AM 251, EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olurken, AM 630 etkilemedi.

Kannabinoid agonistlerinin gastrointestinal kanaldaki farklı bölgelerde düz kas kontraktilesini ve peristaltizmi presinaptik CB₁ reseptörleri aracılığı ile azalttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ⁵. CB₁ reseptörlerin bu etkilerini asetilkolin salıverilmesini azaltarak, non-adrenerjik non-kolinerjik transmisyonu inhibe ederek, adenosin salıverilmesini modüle ederek ve apamin duyarlı potasyum (K⁺) kanallarını aktive ederek gösterdiği önerilmiştir ⁴.

Kannabinoidler gastrointestinal kanalda motilite üzerindeki etkilerini CB₁ reseptörleri üzerinden göstermektedirler. CB₂ reseptörleri, özellikle inflamasyona bağlı motilite değişikliklerinde etkilidir ⁵. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada lipopolisakkarit ile oluşturulan gastrointestinal transit hızındaki artışın CB₂ reseptör antagonisti ile azaldığı saptanmıştır. Lipopolisakkarite bağlı transit artışının inflamatuvar stimulusa bağlı olduğu öne sürülmüştür ¹²⁴. Kobay izole ince bağırsağında yapılan bir çalışmada endojen ve sentetik kannabinoidlerin CB₁ reseptörlerine bağımlı olarak elektriksel olarak oluşan kontraksiyonları inhibe ettiği gösterilmiştir. Buna karşın kannabinoidler ekzojen olarak uygulanan asetilkolin ile postsinaptik muskarinik reseptörler aracılığı ile oluşan kontraksiyonları etkilememektedir ¹²¹. Başka bir çalışmada, sıçanlara intravenöz olarak uygulanan THC sonrasında intragastrik basınç ve pilorik kontraktilesinin uzun süreli olarak azaldığı ve bu değişikliğin vagatomi, gangliyon blokajı

ve CB₁ reseptör blokörü SR141716 ile tamamen ortadan kalktığı belirtilmiştir ¹²³.

Kannabinoidlerin gastrik boşalma ve intestinal geçiş hızında azalmaya neden olduğu insanlarda ve çeşitli hayvan türlerinde gösterilmiştir ^{134,135,136}. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada sistemik olarak uygulanan THC'nin gastrik etkisinin intakt kolinerjik sinirlere bağlı olduğu saptanmıştır ¹²³. Gastrointestinal sistemde CB₁ aktivasyonunun nörotransmisyonu etkilemesindeki temel mekanizmanın öncelikle kolinerjik sinir sonlanmalarından asetilkolin saliverilmesini azaltması ile ilgili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir ^{16,18,19, 56,137,138}. İnsan kolon sirküler düz kasında yapılan bir çalışmada kannabinoidlerin CB₁ reseptör aktivasyonu ile asetilkolin saliverilmesini azalttığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda immunohistokimyasal olarak CB₁ reseptörlerin ChAT ile birlikte enterik nöronlar üzerinde lokalize olduklarını saptanmıştır ¹³⁷. Kobay myenterik pleksusunda yapılan bir çalışmada ise WIN 55,212'nin CB₁ reseptörleri aracılığı ile asetilkolin saliverilmesini azalttığı, ayrıca CB₁ reseptör antagonisti SR141716 tek başına uygulandığında asetilkolin saliverilmesini artırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, asetilkolin saliverilmesi üzerinde endojen bir kannabinoid sistemin baskılayıcı bir etkisi olabileceği veya antagonistin parsiyel agonistik etkisi olabileceği şeklinde yorumlanmıştır ¹⁹. Benzer şekilde kobay ileumunda EAU aracılı kolinerjik kasılmaları anandamid ve WIN 55,212 CB₁ reseptörleri aracılığı ile azaltmış ve CB₁ reseptör antagonisti SR141716 tek başına uygulandığında EAU aracılı kolinerjik kasılmaları artırmıştır ¹⁸. Ancak fare midesinde yapılan bir çalışmada anandamid ve WIN 55,212'nin neostigmin ile uyarılmış EAU aracılı kolinerjik kasılmaları inhibe ettiği ve bu inhibitör etkilerinin SR141716 ve AM630 ile azaldığı saptanmıştır. Aynı zamanda CB₁ agonisti ACEA ve CB₂ agonisti JWH133 konsantrasyona bağlı olarak kasılma cevaplarını azalttığı gösterilmiştir. ACEA'nın etkisini

CB₁ reseptör antagonisti SR141716'nın, JWH133'ün inhibitör etkisini CB₂ reseptör antagonisti AM630'un önlediği gösterilmiş. Ancak SR141716 ve AM630'un neostigmin ile uyarılmış EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine herhangi bir etkilerinin olmadığı gözlenmiştir. Kannabinoid antagonistlerin etkilerindeki bu farklılığın gastrointestinal kanalda etki ettiği alana bağlı olabileceği ileri sürülmüştür¹³⁸. Hanus ve ark. yeni bir çevreye yerleştirilerek akut stres oluşturulan farelerde CB₂ reseptör agonisti HU-308'in defekasyonu azalttığını, HU-308'in bu etkisinin CB₂ reseptör antagonisti SR144528 ile kısmen geri çevrildiğini göstermişlerdir¹³⁹. Bu sonuçlar gastrointestinal sistemde etkisi daha önce keşfedilen CB₁ reseptörleri dışında CB₂ reseptörlerinin de gastrik motilite üzerinde inhibitör etkilerinin olduğu göstermektedir¹³⁸. Ancak farklı olarak normal sıçanlarda selektif CB₂ reseptör agonisti JWH-133'ün intestinal geçiş hızını etkilemediği ve farelerde yapılan bir çalışmada da selektif CB₂ reseptör agonisti JWH015'in kolonik propulsiyonu etkilemediği gösterilmiştir^{124,140}. Sıçan mide fundusunda yapılan başka bir çalışmada ise RT-PCR yöntemi ile CB₂ reseptörlerin mRNA'sı saptanmış ancak fonksiyonel olarak CB₂ reseptörlerin etkisi tam olarak gösterilememiştir⁵⁶.

Yapılan çalışmalarda CB₁ reseptörlerin presinaptik mekanizma ile kolinerjik nörotransmisyonu inhibe ettikleri gösterilmiştir. Kannabinoidlerin ve CB₁ reseptör antagonistlerinin bazal tonus veya asetilkolin ve substans P ile önceden uyarılmış gastrik düz kaslarda etkisi olmadığı bulunmuştur. Bu yüzden CB₁ reseptörlerin postsinaptik lokalizasyonlarının olmadığı önerilmiştir. Ayrıca postsinaptik muskarinik reseptörleri aktive eden karbakol kasılmalarını kannabinoid agonistlerinin etkilemediği saptanmıştır^{18,56,138}.

Sunulan çalışmada kannabinoid agonistleri anandamid, WIN 55,212-2, ACEA ve JWH015'in konsantrasyona bağımlı olarak EAU aracılı kasılma yanıtlarını azaltması diğer çalışmalarla da uyumludur.

Anandamid'in inhibitör etkisinin CB₁ reseptör antagonisti AM 251 ve CB₂ reseptör antagonisti AM 630 varlığında ortadan kalkması, anandamid'in etkisinin CB₁ ve CB₂ reseptörleri üzerinden olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda anandamid'in inhibitör etkisinin CB₁ ve CB₂ reseptör antagonistlerinin her ikisinin de varlığında ortadan kalkması kannabinoidlerin diğer reseptörleri olan VR₁, GPR55 ve GPR119 üzerinden etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Anandamid'in noradrenalin ile kastırılmış dokularda gevşemeye neden olmaması da etkisinin presinaptik olduğunu göstermektedir .

WIN 55,212-2'nin inhibitör etkisinin selektif CB₂ reseptör antagonisti AM 630 varlığında düşük konsantrasyonlarda daha fazla olmak üzere geri dönmesi, selektif CB₁ reseptör antagonisti AM 251 ve her iki antagonistin birlikte bulunduğu ortamda geri dönmemesi etkisinin non-spesifik olduğunu veya diğer kannabinoid reseptörleri üzerinden bir etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. WIN 55,212-2'nin de anandamid gibi noradrenalin ile kastırılmış dokularda gevşemeye neden olmaması etkisinin presinaptik olduğunu göstermektedir.

ACEA'nın inhibitör etkisinin selektif CB₁ reseptör antagonisti AM 251 varlığında tamamen geri dönmesi ve noradrenalin ile kastırılmış dokularda gevşemeye neden olmaması etkisinin presinaptik CB₁ reseptörleri üzerinden olduğunu göstermektedir.

JWH015'in inhibitör etkisinin AM 630 varlığında düşük konsantrasyonlarda tamamen geri dönmesi, yüksek konsantrasyonlarda da tamamen olmamakla birlikte geri dönüş gözlenmesi ve noradrenalin ile kastırılmış dokularda gevşemeye neden olması etkisinin hem presinaptik hem de postsinaptik CB₂ reseptörleri üzerinden olduğunu göstermektedir.

Sunulan çalışmada Pertwee RG. ve arkadaşlarının kobay ileumunda yaptıkları çalışmaya benzer şekilde CB₁ reseptörleri üzerinden etki gösteren anandamid ve ACEA'nın etkisi presinaptik reseptörler üzerinden olduğu gözlenmiştir ¹²¹. Hinds NM.ve arkadaşlarının insan kolon sirküler düz kasında yaptıkları çalışmadaki sonuçlar ile uyumlu olarak kannabinoidler CB₁ reseptörleri üzerinden kolinerjik transmisyonu inhibe ettikleri, bu çalışmadan farklı olarak aynı zamanda CB₂ reseptörleri üzerinden de inhibisyon yaptıkları gösterilmiştir ¹³⁷. Fare midesinde yapılan çalışmaya benzer şekilde anandamid ve WIN 55,212-2 kolinerjik kasılmaları inhibe ederken, farklı olarak WIN 55,212-2'in etkisi selektif CB₁ reseptör antagonisti AM 251varlığında geri dönmedi¹³⁸. Kobay ileumu ve myenterik pleksusunda yapılan çalışmalarla uyumlu olarak AM 251, EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları üzerine tek başına uygulandığında kasılma yanıtlarında artışa neden olurken, AM 630 etkilemedi ^{18,19}. Bu bulgu, kannabinod sistemin kolinerjik nörotransmisyon üzerinde baskılayıcı bir rolü olabileceğini veya AM 251'in parsiyel agonistik bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada tavşan mide fundusunda kannabinoidlerin CB₁ ve CB₂ reseptörlerinin her ikisi üzerinden de etki gösterdiği ve bu etkilerinin büyük oranda presinaptik reseptörler aracılığı ile olduğu tespit edilmiştir.

6.SONUÇ

EAU aracılı kasılma yanıtları üzerinde sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin saliverilmesini inhibe eden guanetidin ve siklooksijenaz inhibitörü indometasin istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadi. Muskarinik reseptör antagonisti atropin, konsantrasyon bağımlı olarak EAU aracılı kasılma yanıtlarını tamamen inhibe ederken, bir antikolinesteraz olan neostigmin konsantrasyon bağımlı olarak bu yanıtları arttırdı. Ayrıca spesifik voltaj bağımlı N tipi Ca^{+2} kanal blokörü ω -konotoksin GVIA, EAU aracılı kasılma yanıtlarını büyük oranda azalttı.

Anandamid, WIN 55,212-2, ACEA ve JWH015 , konsantrasyona bağımlı olarak, EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttı. Anandamid'in inhibitör etkisi, selektif CB₁ reseptör antagonisti AM 251, selektif CB₂ reseptör antagonisti AM 630 ve her iki reseptör antagonisinin birlikte bulunduğu ortamda tamamen geri döndü. WIN 55,212-2'nin inhibitör etkisi, selektif CB₂ reseptör antagonisti AM 630 varlığında düşük konsantrasyonlarda daha fazla olmak üzere geri dönerken, selektif CB₁ reseptör antagonisti AM 251 ve her iki antagonistin birlikte bulunduğu ortamda geri dönmedi. ACEA'nın inhibitör etkisi, selektif CB₁ reseptör antagonisti AM 251 varlığında tamamen geri döndü. JWH015'in inhibitör etkisi, selektif CB₂ reseptör antagonisti AM 630 varlığında düşük konsantrasyonlarda tamamen geri döndü, yüksek konsantrasyonlarda da tamamen olmamakla birlikte geri dönüş gözlemlendi. Anandamid, WIN 55,212-2 ve ACEA noradrenalin ile kastırılmış dokularda gevşemeye neden olmazken, JWH015 konsantrasyon bağımlı olarak gevşemeye neden oldu. AM 251, EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olurken, AM 630 etkilemedi.

Sonuç olarak, bu çalışmada tavşan mide fundusunda kannabinoidlerin CB₁ ve CB₂ reseptörlerinin her ikisi üzerinden de etki gösterdiği ve bu etkilerinin büyük oranda presinaptik reseptörler aracılığı ile olduğu tespit edilmiştir.

7.ÖZET

İzole Tavşan Mide Fundusunda Kolinerjik Aşırım Üzerine
Kannabinoidlerin Etkilerinin Araştırılması.

Dr. Nuray İmıl Duyuran

Kannabinoidlerin gastrointestinal kanalın farklı bölgelerinde kolinerjik aşırım üzerine etkisiyle düz kas kontraktilesini azalttığı bilinmektedir. Bu çalışmada tavşan izole mide fundus düz kasında Elektriksel Alan Uyarısı (EAU) aracılı kolinerjik transmisyon üzerinde kannabinoidlerin etkileri ve olası etkilerinin hangi kannabinoid reseptörü üzerinden olabileceğinin araştırılması amaçlanmıştır. Deneylerde 2,5-3 kg ağırlığında 30 adet albino tavşandan elde edilen mide fundus şeritleri Krebs solüsyonu içeren organ banyosuna izometrik kasılmaları kayıt etmek için izometrik kuvvet transdüserine bağlı olacak şekilde yerleştirilmiştir. EAU aracılı kasılma yanıtları üzerinde guanetidin ve indometasin'in etkisi olmadı. Atropin EAU aracılı kasılma yanıtlarını tamamen ortadan kaldırırken, neostigmin bu yanıtları arttırdı, ω -gonotoksin GVIA ise anlamlı oranda azalttı. Bu sonuçlar mide fundusunda elde edilen EAU aracılı kasılma yanıtlarının sinirsel uyarıya bağlı olduğunu ve kolinerjik sinirler kaynaklı olduğunu göstermektedir. Guanetidin ve indometasin varlığında EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtlarını anandamid, WIN 55,212-2, ACEA ve JWH015 konsantrasyon bağımlı olarak azalttı. Anandamidin inhibitör etkisi, CB₁ reseptör antagonisti AM 251, CB₂ reseptör antagonisti AM 630 ve her iki antagonistin birlikte bulunduğu ortamda geri döndü. WIN 55,212-2'nin inhibitör etkisi ise AM 630 varlığında düşük konsantrasyonlarda daha fazla olmak üzere geri

dönerken, AM 251 ve her iki antagonistin birlikte bulunduğu ortamda geri dönmedi. ACEA'nın etkisi AM 251, JWH015'in etkisi de AM 630 ile geri döndü. EAU aracılı kolinerjik kasılma yanıtları AM 251 arttırırken, AM 630 etkilemedi. Anandamid, WIN 55,212-2 ve ACEA noradrenalin ile kastırılmış dokularda gevşemeye neden olmazken, JWH015 gevşemeye neden oldu. Bu sonuçlar endokannabinoidlerin tavşan mide fundusunda CB₁ ve CB₂ reseptörleri aracılığıyla kolinerjik kasılma yanıtları üzerinde presinaptik etkisinin olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler:

Endokannabinoidler, tavşan mide fundusu, elektriksel alan uyarısı

8.SUMMARY

Investigation of Cannabinoids Effects on the Cholinergic Neurotransmission in Isolated Rabbit Gastric Fundus.

Nuray İmîl Duyuran, MD

It is known that cannabinoid agonists act on cholinergic transmission to reduce smooth muscle contractility in different regions of gastrointestinal tract. This study's aim is to investigate cannabinoids effects on cholinergic transmission responses which are mediated electrical field stimulation in isolated rabbit gastric fundus smooth muscle and also these likely effects can be on which cannabinoid receptors. In the experiments 2,5-3 kg of 30 albino rabbits gastric smooth muscle strips obtained from the organ bath containing Krebs solution isometric force transducer for recording of isometric contractions of the way that they are connected. Guanetidine and indomethacin had any effect on the contractile responses mediated electrical field stimulation (EFS). While atropine was abolished contractile responses, neostigmine was enhanced contractile responses via EFS. Although ω -conotoxin GVIA was decreased the contractions significantly. These results show that contractile responses, which was obtained from gastric fundus caused by EFS, depend on neurally stimulation and take it's source from cholinergic neurons. In the presence of guanetidine and indomethacin anandamide, WIN 55,212-2, ACEA and JWH015 produced a concentration-dependent reduction of EFS-evoked cholinergic contractions. CB₁ receptor antagonist AM 251, CB₂ receptor antagonist AM 630 and together with two antagonists are existed reduced inhibitory effects induced by anandamide. Although while inhibitory effects of WIN 55,212-2 was reduced more in

low concentrations in the existence of AM 630, AM 251 and together with two antagonists had any effects on inhibitory effects of WIN 55,212-2. While AM 251 reduced the effects of ACEA, AM 630 attenuated the effects of JWHO15. AM 251 was enhanced cholinergic contractions induced by EFS, but AM 630 had any effect on the contractions. While anandamide, WIN 55,212-2 and ACEA didn't cause relaxation in tissues precontracted with noradrenaline, JWH015 caused relaxation in these tissues. These findings indicate that endocannabinoids have presynaptic effects on cholinergic contractions via CB₁ and CB₂ receptors in isolated rabbit gastric fundus.

Key Words:

Endocannabinoids, rabbit gastric fundus, electrical field stimulation

9. KAYNAKLAR

1. Ralevic V. Cannabinoid modulation of peripheral autonomic and sensory neurotransmission. *European Journal of Pharmacology* 2003; 472: 1-21.
2. Pertwee RG. The evidence for the existence of cannabinoid receptors. *Gen Pharmacol* 1993; 24: 811-824.
3. Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 1997; 74: 129-180.
4. Izzo AA, Mascolo N, Caposso F. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 597-603.
5. Coutts AA, Izzo AA. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: an update. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 572-579.
6. Zygmunt PM, Petersson J, Anderson DA, Chuang H, Sørsgård M, Di Marzo V, et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999; 400: 452-457.
7. Massa F, Storr M, Lutz B. The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. *J Mol Med* 2005; 83: 944-954.
8. Gomez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo JM, Bilbao A, Del Arco I. A peripheral mechanism for CB₁ cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding *J Neurosci* 2002; 22: 9612-9617.
9. Mac Naughton WK, Von Sickle MD, Keenan CM, Cushing K, Mackie K, Sharkey KA. Distribution and function of the CB₁ receptor in the modulation of ion transport in the guinea-pig ileum: relationship to capsaicin-sensitive nerves. *Am J Physiol* 2004; 286: 863-871.

10. Wright K, Rooney N, Feeney M, Tate J, Robertson D, Welham M. Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology* 2005; 129: 437-453.
11. Sanger GJ. Endocannabinoids and the gastrointestinal tract: what are the key questions. *Br J Pharmacol* 2005; 152: 663-670.
12. Duncan M, Davison JS, Sharkey KA. Endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 667–683.
13. Pertwee RG. Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 2001; 48: 859-867.
14. Duncan M, Mouihate A, Mackie K, Keenan CM, Buckley NE, Davison JS, et al. Cannabinoid CB₂ receptors in the enteric nervous system modulate gastrointestinal contractility in lipopolysaccharide- treated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: 78–87.
15. Kulkarni-Narla A, Brown DR. Localization of CB₁-cannabinoid receptor immunoreactivity in the porcine enteric nervous system. *Cell Tissue Res* 2000; 302: 73–80.
16. Storr M, Sibaev A, Marsicano G, Lutz B, Schusdziaarra Timmermans JP, Allescher HD. Cannabinoid receptor type 1 modulates excitatory and inhibitory neurotransmission in mouse colon *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: 110–117.
17. Izzo AA, Camilleri M. Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects. *Gut online*, 2008; 57: 1140–1155.

18. Izzo AA, Mascolo N, Borelli F, Capasso F. Excitatory transmission to the circular muscle of guinea-pig ileum: evidence for the involvement of cannabinoid CB₁ receptors. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 1363-1368.
19. Coutts AA, Pertwee RG. Inhibition by cannabinoid receptor agonists of Ach release from the guinea-pig myenteric plexus. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 1557-1566.
20. Lopez-Redondo F, Lees GM, Pertwee RG. Effects of cannabinoid receptor ligands on electrophysiological properties of myenteric neurons of the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 330-334.
21. Casu MA, Porcella A, Ruiu S, Saba P, Marchese G, Carai MAM. Differential distribution of functional cannabinoid CB₁ receptors in the mouse gastrointestinal tract. *Eur J Pharmacol* 2003; 459: 97-105.
22. Odar İV. Anatomi Ders Kitabı. 7. Baskı. Ankara: Salmantlar Ofset; 1984. s. 2. Cilt, 73-84.
23. Değerli Ü, Bozfakıoğlu Y, editörler. Cerrahi Gastrointestinal. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 1990. s. 2. Cilt, 105-107.
24. Guyton AC. Tıbbi Fizyoloji. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 1989. s. 2. Cilt, 1085-1106.
25. Cullen JJ, Kelly KA. Gastric motor physiology and pathophysiology. In: Becker JM, editor. *The Surgical Clinics of North America: Motility Disorders of The Gastrointestinal Tract*. Vol. 73 (6). Philadelphia: Saunders; 1993. p. 1145-1160.

26. Kayaalp SO, Ulus İH. Otonom sinir sistemi nörotransmitterleri ve ilaçları hakkında temel bilgiler. İçinde: Kayaalp SO, editör. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji.10. Baskı. Ankara: Hacettepe Taş; 2002. s. 1050-1051.

27. Thompson DG. Neuroanatomy and neurophysiology of the gastrointestinal tract and of chronic gut pain. In: Corazziari E ed. Approach to the patient with Chronic Gastrointestinal Disorders. 1st edition. Milano-Italy: Messaggi srl; 1999. p.143-151.

28. Delwaux M. Role of visceral sensitivity in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. Gut 2002; 51 (1): 67-71.

29. Furness JB, Clerc N, Vogalis F. The enteric nervous system and its extrinsic connections. In: Yamada T editor. Textbook of Gastroenterology. Fourth Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2003. p. 12-34.

30. Bygrave FL, Roberts HR. Regulation of cellular calcium through signaling cross talk involves an intricate interplay between the actions of receptors G proteins and second messengers. Faseb J 1995; 9: 1297-1303.

31. Dörje F, Wess J, Lambrecht G, Tacke R, Mutschler E, Brann MR, et al. Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. J Pharmacol Exp Ther 1991; 256: 727-733.

32. Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology: XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. Pharmacol Rev 1998; 50: 279-290.

33. Nelson DK, Pieramico O, Dahmen G, Dominguez-Munoz JE, Malfertheiner P, et al. M₁ muscarinic mechanisms regulate interdigestive cycling of motor and secretory activity in human upper gut. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 206-215.
34. Hammer R. Muscarinic receptors in the stomach. *Scan J Gastroenterol Suppl* 1980; 66: 5-11.
35. Braverman AS, Tallarida RJ, Ruggieri MR. The use of occupation isoboles for analysis of a response mediated by two receptors: M₂ and M₃ muscarinic receptor subtype-induced mouse stomach contractions. *JPET* 2008; 325: 954-960.
36. Wrzos HF, Tandon T, Quyang A. Mechanism mediating cholinergic antral circular smooth muscle contractions in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10(22): 3292-3298..
37. Lecler PG, Lefebvre RA. Characterization of pre and post synaptic muscarinic receptors in circular muscle of pig gastric fundus. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 1245-1254.
38. Soejima O, Katsuragi T, Furukawa T. Opposite modulation by muscarinic M₁ and M₃ receptors of Ach release from guinea-pig ileum as measured directly. *Eur J Pharmacol* 1993; 249: 1-6.
39. Dietrich C, Kilbinger H. Prejunctional M₁ and postjunctional M₃ muscarinic receptors in the circular muscle of the guinea-pig ileum. *Naunyn-Schmi Arch Pharmacol* 1995; 351: 237-243.

40. Ogishima M, Kaibara M, Veki S, Kurimato T, Taniyama K. Z-338 facilitates acetylcholine release from enteric neurons due to blockade of muscarinic otoreceptors in guinea-pig stomach. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 33-37.
41. Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr* 2006; 28: 153-157.
42. Pertwee RG. The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids. *Pharmacol Ther* 1988; 36: 189-261.
43. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 1964; 86: 1646.
44. Mechoulam R, editor. Cannabinoid chemistry. In: *Marijuana chemistry, Metabolism, Pharmacology and Clinical effects*. New York: Academic Press; 1973. p.1-99.
45. Agurell S, Halldin M, Lindgren JE, Ohlsson A, Widman M, Gillespie H, et al. Pharmacokinetics and metabolism of THC and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacol Rev* 1986; 38: 21-43.
46. Devane WA, Dysarz FA 3rd Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988; 34: 605-613.
47. Devane WA, Hanus L, Brever A. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258: 1946-1949.

48. Mechoulam R, Benshabat S, Hanus L. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 83-90.

49. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346: 561-564.

50. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365: 61-65.

51. Howlett AC, Barth F, Bonner TI. International Union of Pharmacology: XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 161-202.

52. Osei-Hyiaman D, De Pettillo M, Pacher P. Endocannabinoid activation at hepatic CB₁ receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005; 115: 1298-1305.

53. Batkai S, Pacher P, Osei-Hyiaman D, Radaeva S, Liu J, Harvey-White J, et.al. Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation* 2004; 110: 1996-2002.

54. Cota D, Marsicano G, Tschop M. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 2003; 112: 423-431.

55. Adami M, Frati P, Bertini S, Kulkarni-Narla A, Brown DR, Caro G, et al. Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 1598-1606.

56. Storr M, Gaffal E, Saur D, Schusdziarra V, Allescher HD. Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 67-76.

57. Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 567-575.

58. Johns DG, Behm DJ, Walker DJ, Ao Z, Shapland EM, Daniels DA, et al. The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 825-831.

59. Di Marzo V, De Petrocellis L, Sepe N, Buono A. Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem J* 1996; 316: 977-984.

60. Ullrich O, Merker K, Timm J, Tauber S. Immune control by endocannabinoids - new mechanisms of neuroprotection? *J Neuroimmunol* 2007; 184: 127-135.

61. Elphick MR, Egertová M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B. Biol Sci* 2001; 356: 381-408.

62. Guzman M. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 745-755.

63. Davies SN, Pertwee RG, Riedel G. Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. *Neuropharmacology* 2002; 42(8): 993-1007.

64. Gerdeman GL, Lovinger DM. Emerging roles for endocannabinoids in long-term synaptic plasticity. *Br J Pharmacol* 2003; 140(5): 781-789.

65. Pistis M, Ferraro L, Pira L, Flore G, Tanganelli S, Gessa GL, et al. Delta(9)-tetrahydrocannabinol decreases extracellular GABA and increases extracellular glutamate and dopamine levels in the rat prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 2002; 948:155-158.

66. Oropeza VC, Page ME, Van Bockstaele EJ. Systemic administration of WIN 55,212-2 increases norepinephrine release in the rat frontal cortex. *Brain Res* 2005; 1046: 45-54.

67. Pisanu A, Acquas E, Fenu S, Di Chiara G. Modulation of Delta(9)-THC-induced increase of cortical and hippocampal acetylcholine release by micro opioid and D(1) dopamine receptors. *Neuropharmacology* 2006; 50: 661-670.

68. Gessa GL, Casu MA, Carta G, Mascia MS. Cannabinoids decrease acetylcholine release in the medial-prefrontal cortex and hippocampus, reversal by SR 141716A. *Eur J Pharmacol* 1998; 355: 119-124.

69. Fujiwara M, Egashira N. New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: abnormal behaviors associate with CB1 cannabinoid receptor and development of therapeutic application. *J Pharmacol Sci* 2004; 96: 362-366.

70. Fernandez Ruiz J, Lastres Becker I, Cabranes A, Gonzalez A, Ramos JA. Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66(2-3): 257-267.

71. Lee J, Di Marzo V, Brotchie JM. A role for vanilloid receptor 1 (TRPV1) and endocannabinoid signalling in the regulation of spontaneous and L-DOPA induced locomotion in normal and reserpine-treated rats. *Neuropharmacology* 2006; 51: 557-565.

72. Kishimoto Y, Kano M. Endogenous cannabinoid signaling through the CB₁ receptor is essential for cerebellum-dependent discrete motor learning. *J Neurosci* 2006; 26: 8829-8837.

73. Pacher P, Batkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2006; 58(3): 389-462.

74. Glass M, Faull RL. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 2000; 97(3): 505-519.

75. Chen J, Paredes W, Lowinson JH, Gardner EL. Delta9-tetrahydrocannabinol enhances presynaptic dopamine efflux in medial prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol* 1990; 190(1-2): 259-262.

76. Leweke FM, Giuffrida A, Wurster U, Emrich HM, Piomelli D. Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia *Neuroreport* 1999; 10(8): 1665-1669.

77. Gambi F, De Berardis D, Sepede G, Quartesan R, Calcagni E, Salerno RM, et al. Cannabinoid receptors and their relationships with neuropsychiatric disorders. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005; 18(1): 15-19.

78. Solinas M, Zangen A, Thiriet N, Goldberg SR. Beta-endorphin elevations in the ventral tegmental area regulate the discriminative effects of Delta-9-tetrahydrocannabinol. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 3183-3192.

79. Valverde O, Noble F, Beslot F, Daugé V, Fournié-Zaluski MC, Roques BP. Delta9-tetrahydrocannabinol releases and facilitates the effects of endogenous enkephalins: reduction in morphine withdrawal syndrome without change in rewarding effect. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 1816-1824.

80. Maldonado R, Valverde O, Berrendero F. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neuro.*2006; 29: 225-232.

81. Williams CM, Kirkham TC. Observational analysis of feeding induced by Delta9-THC and anandamide. *Physiology and Behaviour* 2002; 1; 76(2): 241-250.

82. Plasse TF. Clinical use of dronabinol. *J Clin Oncol* 1991; 9(11): 2079-2080.

83. Whiteside GT, Lee GP, Valerizano KJ. The role of the cannabinoid CB₂ receptor in pain transmission and therapeutic potential of small molecule CB₂ receptor agonists. *Curr Med Chem* 2007; 14(8): 917-936.

84. Pacher P, Haskò G. Endocannabinoids and cannabinoid receptors in ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* 2008; 153(2): 252-262.

85. Bonz A, Laser M, Kullmer S, Kniesch S, Babin-Ebell J, Popp V, et al. Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41: 657–664.

86. Wagner JA, Abesser M, Karcher J, Laser M, Kunos G. Coronary vasodilator effects of endogenous cannabinoids in vasopressin-precontracted unpaced rat isolated hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46: 348–355.

87. Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, et al. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J* 2000; 346: 835–840.

88. Varga K, Lake KD, Huangfu D, Guyenet PG, Kunos G. Mechanism of the hypotensive action of anandamide in anesthetized rats. *Hypertension* 1996; 28: 682-686.
89. Calignano A, La Rana G, Beltramo M, Makriyannis A, Piomelli D. Potentiation of anandamide hypotension by the transport inhibitor, AM404. *Eur J Pharmacol* 1997; 337: 1-2.
90. Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature (Lond)* 1997; 390: 518–521.
91. Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J* 1998; 12: 1035–1044.
92. Wagner JA, Hu K, Bauersachs J, Karcher J, Wiesler M, Goparaju SK, et al. Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 2048–2054.
93. Lépicier P, Bouchard JF, Lagneux C, Lamontagne D. Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 805-815.
94. Lépicier P, Lagneux C, Sirois MG, Lamontagne D. Endothelial CB(1)-receptors limit infarct size through NO formation in rat isolated hearts. *Life Sci* 2007; 81: 1373-1380.

95. Shmest YA, Goncharov I, Eichler M, Shneyvays V, Isaac A, Vogel Z, et al. Delta-9-tetrahydrocannabinol protects cardiac cells from hypoxia via CB2 receptor activation and nitric oxide production. *Mol Cell Biochem* 2006; 283: 75-83.
96. Tashkin DP, Shapiro BJ, Frank IM. Acute effects of smoked marijuana and oral delta9-tetrahydrocannabinol on specific airway conductance in asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1974; 109: 420-428.
97. Tashkin DP. Airway effects of marijuana, cocaine, and other inhaled illicit agents. *Curr Opin Pulm Med* 2001; 7: 43-61.
98. Williams SJ, Hartley JP, Graham JD. Bronchodilator effect of Δ 1-tetrahydrocannabinol administered by aerosol of asthmatic patients. *Thorax* 1976; 31: 720–723.
99. Tashkin DP, Reiss S, Shapiro BJ, Calvarese B, Olsen JL, Lodge JW. Bronchial effects of aerosolized Δ 9-tetrahydrocannabinol in healthy and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115: 57–65.
100. Yoshihara S, Morimoto H, Ohori M, Yamada Y, Abe T, Arisaka O. Endogenous cannabinoid receptor agonists inhibit neurogenic inflammations in guinea pig airways. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 138: 80–87.
101. Calignano A, Kátóna I, Désarnaud F, Giuffrida A, La Rana G, Mackie K, et al. Bidirectional control of airway responsiveness by endogenous cannabinoids. *Nature* 2000; 408: 96-101.

102. Yousif MH, Oriowo MA. Inhibitory effects of cannabinoid receptor ligands on electrically-evoked responses in rat isolated tracheal ring segments. *Pharmacol Res* 1999; 40: 415-421.

103. Vizi ES, Katona I, Freund TF. Evidence for presynaptic cannabinoid CB(1) receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the guinea pig lung. *Eur J Pharmacol* 2001; 431: 237-244.

104. Maccarrone M. CB(2) receptors in reproduction. *Br J Pharmacol* 2008; 153(2): 189-198.

105. Rossato M, Ion Popa F, Ferigo M, Clari G, Foresta C. Human sperm express cannabinoid receptor Cb1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 984–991.

106. Melis MR, Succu S, Mascia MS, Sanna F, Melis T, Castelli MP, et al. The cannabinoid receptor antagonist SR-141716A induces penile erection in male rats: involvement of paraventricular glutamic acid and nitric oxide. *Neuropharmacology* 2006; 50: 219-228.

107. Vural IM, Ozturk GS, Sarioglu Y. Functional characterization of nonadrenergic noncholinergic neurotransmitter release via endocannabinoids: an in vitro study in rabbit corpus cavernosum. *J Sex Med* 2009 ; 6(3):717-729.

108. Pertwee RG, Fernando SR. Evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in mouse urinary bladder. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 2053-2058.

109. Tyagi P, Tyagi V, Yoshimura N, Chancellor, M. Functional role of cannabinoid receptors in urinary bladder. *Indian J Urol* 2010; 26: 26-35.
110. Cota D, Woods S. The role of the endocannabinoid system in the regulation of energy homeostasis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2005; 12: 338-351.
111. Ravinet Trillou C, Arnone M, Delgorge C, Menet C, Soubrie P. Anti-obesity effect of SR141716, a CB₁ receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: 345-353.
112. Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C. The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabetes Obes Metab* 2005; 7: 65-72.
113. Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ. Effects of the cannabinoid CB₁ receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice. *Int J Obesity* 2005; 29: 183-187.
114. Bermúdez-Siva FJ, Serrano A, Diaz-Molina FJ. Activation of cannabinoid CB₁ receptor induces intolerance in rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 531: 282-284.
115. Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, et al. The cannabinoid system and immune modulation. *Journal of Leukocyte Biology* 2003; 74, 486-496.

116. Kaminski NE. Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptors. *J Neuroimmunol* 1998; 83: 124-132.

117. Hsu SS, Huang CJ, Cheng HH, Chou CT, Lee HY, Wang JL, et al. Anandamide-induced Ca²⁺ elevation leading to p38 MAPK phosphorylation and subsequent cell death via apoptosis in human osteosarcoma cells. *Toxicology* 2007; 231: 21-29.

118. Melck D, Rueda D, Galve-Roperh I, De Petrocellis L, Guzman M, Di Marzo V. Involvement of the cAMP/protein kinase A pathway and of mitogen-activated protein kinase in the anti-proliferative effects of anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Lett* 1999; 463: 235–240.

119. Joseph J, Niggeman B, Zoenker KS, Entschladen F. Anandamide is an endogenous inhibitor for the migration of tumor cells and T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 723-728.

120. Blázquez C, Gonzalez-Feria L, Alvarez L, Haro A, Casanova ML, Guzman M. Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas. *Cancer Res* 2004; 64: 5617–5623.

121. Pertwee RG, Fernando SR, Nash JE. Further evidence for the presence of cannabinoids CB₁ receptors in guinea-pig small intestine. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 2199-2205.

122. Capasso R, Matias I, Lutz B, Borrelli F, Capasso F, Marsicano G, et al. Fatty acid amide hydrolase controls: Mouse intestinal motility *invivo*. *Gastroenterology* 2005; 129(3): 941-951.

123. Krowicki ZK, Moerschbaecher JM, Winsaver PJ, Divagalli SV, Hornby PJ. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol inhibits gastric motility in the rat through cannabinoid CB₁ receptors. *Eur J Pharmacol* 1999; 37: 187-196.

124. Mathison R, Ho W, Pittman QJM, Davison LS, Sharkley KA. Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 1247-1254.

125. Rivas JF, Garcia R. Inhibition of histamine-stimulated gastric acid secretion by THC in rat isolated stomach. *Eur J Pharmacol* 1980; 65: 317-318.

126. Coruzzi G, Adami M, Coppelli G, Frati P, Soldani G. Inhibitory effect of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on pentagastrin-induced gastric acid secretion in the anesthetized rat. *Naunyn Schmi Arch Pharmacol* 1999; 360: 715-718.

127. Warzecha Z, Dembinski A, Ceranowicz P, Dembinski M, Cieszkowski J, Kownacki P, et al. Role of sensory nerves in gastroprotective effect of anandamide in rats. *Journal of Physiol and Pharmacol* 2011; 62(2): 207-217.

128. Massa F, Marsicano G, Hermann H, Cannich A, Krisztina M, Cravatt BF, et al. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J Clin Invest* 2004; 113: 1202-1209.

129. Klein TW, Lane B, Newton CA, Friedman H. The cannabinoid system and cytokine network. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 1: 1-8.

130. Di Carlo G, Izzo AA. Cannabinoid for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert Opin Invest Drugs* 2003; 12: 29-49.

131. Lehmann A, Blackshaw LA, Branden L, Carlsson A, Jensen J, Nygren E, et al. Cannabinoid receptor agonism inhibits transient lower esophageal sphincter relaxations and reflux in dogs. *Gastroenterology* 2002; 123: 1129-1134.

132. İlhan SO, Vural IM, Dileköz E, Öztürk GS, Sarioğlu Y. Enhancement effects of nicotine on neurogenic contractile responses in rabbit gastric fundus. *Eur J Pharmacol* 2007; 561(1-3):182-188.

133. Anuvarbekova A, Fincan GS, Vural IM, Özger SI, Ercan ZS, Utkan T, et al. Investigation of enhancement effects of nicotine on cholinergic neurotransmission in isolated rabbit gastric fundus: role of antioxidants. *Auton Autacoid Pharmacol* 2010; 30(3):179-184.

134. Izzo AA, Mascolo N, Borrelli F, Capasso F. Defaecation, intestinal fluid accumulation and motility in rodents: implications of cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999; 359(1):65-70.

135. Colombo G, Agabio R, Lobina C, Reali R, Gessa GL. Cannabinoid modulation of intestinal propulsion in mice. *Eur J Pharmacol* 1998; 344(1):67-69.

136. McCallum RW, Soykan I, Sridhar KR, Ricci DA, Lange RC, Plankey MW. Delta-9-tetrahydrocannabinol delays the gastric emptying of solid food in humans: a double-blind, randomized study. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13(1):77-80.

137. Hinds NM, Ullrich K, Smid SD. Cannabinoid 1 (CB1) receptors coupled to cholinergic motorneurons inhibit neurogenic circular muscle contractility in the human colon. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 191-199.

138. Mulè F, Amato A, Baldassano S, Serio R. Involvement of CB1 and CB2 receptors in the modulation of cholinergic neurotransmission in mouse gastric preparations. *Pharmacol Res* 2007 ; 56(3):185-192.

139. Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, Shiloah S, Goldenberg D, Horowitz M et al. Hu-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 14228–14233.

140. Pinto L, Izzo AA, Cascio MG, Bisogno T, Hospodar-Scott K, Brown DR, et al. Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. *Gastroenterology* 2002; 123: 227–234.

10. EKLER



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Kararları

21.12/2006

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/25 - 18 429
KONU:

Sayın

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

G.Ü.ET-06.078 kod numaralı ve “İzole Tavşan Mide Fundusunda Kolinerjik Aşırım Üzerine Kannabinoidlerin Etkisi” başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-06.078 and entitled “Effects of Cannabinoids on the Cholinergic Neurotransmission in Isolated Rabbit Gastric Fundus” is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

Prof.Dr.Gökhan ALPAŞLAN
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı
Chairman
Gazi University Experimental Animals Ethical Council

Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER

Prof.Dr.Nedret KILIÇ

Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN

Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN

Prof.Dr.Deniz ERBAŞ

Prof.Dr.Fatma AKAR

Prof.Dr.Altan DOĞAN

Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU

Uz.Vet.Hek.Şeyda DİKER

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince engin bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, emeğini, hoşgörüsünü ve desteğini esirgemeyen öğrencisi olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Yusuf SARIOĞLU 'na, doktora eğitimim süresince verdiği değerli bilgiler, her konuda gösterdiği hoşgörü, güleryüzü, yardım ve destekleri için çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Sevim ERCAN'a, eğitimimde emekleri olan Anabilim Dalımızın bütün öğretim üyelerine, tez hazırlama aşaması başta olmak üzere tüm çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen, laboratuvar çalışmalarını öğrenmemde yardımcı olan ve her zaman yanımda hissettiğim arkadaşım Uzm. Dr. Gökçe Sevim ÖZTÜRK FİNCAN'a, laboratuvar çalışmalarında desteklerinden dolayı başta Arş. Gör. Dr. Fatma İŞLİ ve Arş. Gör. Dr. Şeniz YILDIRIM olmak üzere doktora eğitimim süresince birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, yoğun çalışma temposunda teşvik ve desteğiyle her an yanımda olan eşim ve aileme en içten duygularla teşekkür ederim.

11.ÖZGEÇMİŞ

Dr.Nuray IMIL DUYURAN

- Adı, Soyadı** : Nuray IMIL DUYURAN
- Doğum Yeri, Yılı** : Konya, 1975
- Medeni Hali** : Evli, 1 çocuk sahibi
- Ev Adresi** : Göksu Park Konutları J Blok Kat: 4 No: 17 Eryaman / ANKARA
- İş Adresi** : Kazan Toplum Sağlığı Merkezi Kazan/ANKARA
- Lisans** : 1993-1999, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Konya
- Doktora Eğitimi** : 2003-2011 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara

Katıldığı Bilimsel Toplantılar ve Kurslar

1. 'Gençlere Yönelik Üreme Sağlığı Hizmetleri ve Aile Planlaması Danışmanlığı', Ankara, 9-13 Mayıs 2011
2. 'Üreme Sağlığına Giriş ve Güvenli Annelik', Ankara, 14-18 Mart 2011
3. 'Aile Hekimliği 1.Aşama Uyum Eğitimi' Eğitici Sertifikası, Ankara, 5-14 Nisan 2010
4. 'Aile Hekimliği 1.Aşama Uyum Eğitimi' Eğitici Sertifikası, Ankara, 1-10 Mart 2010
5. 'Aile Hekimliği 1.Aşama Uyum Eğitimi' Eğitici Sertifikası, Ankara, 1-10 Şubat 2010
6. 'Aile Hekimliği 1.Aşama Uyum Eğitimi' Eğitici Sertifikası, Ankara, 2-11 Kasım 2009
7. 'Çocuğun Psikososyal Gelişimini Destekleme Programı', Ankara, 15-16 Ekim, 2009
8. 'Aile Hekimliği 1.Aşama Uyum Eğitimi' Eğitici Sertifikası, Ankara, 31 Ağustos-9 Eylül, 2009

9. 'Aile Hekimliği 1.Aşama Uyum Eğitimi' Eğitici Sertifikası, Ankara, 20-29 Temmuz, 2009
10. 'Aile Hekimliği 1.Aşama Uyum Eğitimi' Eğitici Sertifikası, Ankara, 8-17 Haziran, 2009
11. 'Aile Hekimliği 1.Aşama Uyum Eğitimi' Sertifikası, Ankara, 30 Nisan-06 Mayıs, 2009
12. Kardiyovasküler Risk Eğitim Toplantısı, Ankara, 20 Eylül, 2007
13. TFD Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklar Arası Bilimsel Programı Prof.Dr.R.Kazım TÜRKER Toplantısı, Antalya, 7-9 Mart, 2007
14. Epidemiyoloji Eğitim Programı 'Sağlık Hizmetleri Sunumunda Veri Toplama ve Verilerin Kullanımı Eğitimi', Ankara, 19-21 Eylül, 2006
15. Epidemiyoloji Eğitim Programı 'Salgın İncelemesi ve Kontrolü Eğitimi', Ankara, 14-16 Haziran, 2006
16. 'Evlilik Danışmanlığı Kursu', Ankara, 13-14 Mart, 2006
17. 18. Ulusal Farmakoloji Kongresi, İzmir, 28 Eylül-1 Ekim, 2005
18. 'Rahim İçi Araç Uygulama Kursu', Ankara, 30 Mayıs-17 Temmuz, 2005
19. 'Eğitim Becerileri Kursu', Ankara, 23-26 Mayıs, 2005
20. 'Birinci Basamağa Yönelik Zehirlenmeler Tanı ve Tedavi Rehberleri Geliştirme Toplantısı', Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara, 6-10 Aralık, 2004
21. 'Kontrollü Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu' Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ankara, 26-27 Şubat, 2004
22. 5. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, Antalya, 26-30 Eylül, 2003
23. Türk Tabipleri Birliği 'İş Hekimliği Sertifikası', Ankara, 11-21 Mayıs, 2003
24. 7.Pratisyen Hekim Kongresi, Antalya, 24-27 Eylül, 2002

Yayınlar:

1. Erişti HE, Özbay H, Arı HO, **İmil Duyuran N**, Öncül HG, Karaman Ö. Turkey National Health Accounts 1999-2000: Based on OECD System of Health Accounts. Kartal M, Mollahaliloğlu S, editors. Republic of Turkey The Ministry of Health; Ankara, 2004