

# Sıçan Striatal Dilimlerinden Bazal ve Uyarılma Koşullarında Asetilkolin ve Kolin Saliverilmesine Dopamin Reseptör Antagonistlerinin Etkisi

İsmail H. Ulus

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji, İstanbul, Türkiye

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı dopamin reseptör antagonisti maddelerin sıçan striatal beyin dilimlerinden asetilkolin ve kolin metabolizmasına etkilerini incelemektir.

**Yöntemler:** Sıçan beyninden striatal bölgeden hazırlanmış dilimler değişik düzeylerde dopamin reseptör antagonisti içeren fizyolojik sıvı solüsyonla bazal ve uyarılma koşullarında perfüze edildi. Perfüze edilen ve dokuda bulunan asetilkolin ve kolin radioenzimatik yöntemle ölçüldü.

**Bulgular:** Striatal dilimlerden bazal ve uyarılma koşullarında perfüze edilen asetilkolin ve kolin saliverilme hızları, sırayla,  $49 \pm 5$  pmol/mg protein/10 dakika ve  $321 \pm 14$  pmol/mg protein/10 dakika oldu. Ortamda dopamin reseptör antagonistlerin [flufenazin (0,1-100  $\mu$ M), haloperidol (1-10  $\mu$ M), thioridazin (1-10  $\mu$ M), sulpirid (1-10  $\mu$ M) ve etikloprid (1-10  $\mu$ M)] bulunması perfüze edilen asetilkolin ve kolin'in bazal saliverilme hızını etkilemedi. Striatal dilimler yüksek  $K^+$  (50  $\mu$ M) ya da elektrikle (15 Hz, 1 ms ve 80 mA) uyarıldığında asetilkolin saliverilme hızı artarak, sırayla,  $938 \pm 108$  pmol/mg protein/10 dakika ya da  $398 \pm 22$  pmol/mg protein 10 dakika'ya çıktı. Sulpirid (100  $\mu$ M) ve etikloprid (10  $\mu$ M) yüksek potasyumla ya da elektrikle uyarılma sırasındaki asetilkolin saliverilmesini %50 kadar baskılamakta, flufenazin (0,1-100  $\mu$ M) haloperidol (1-10  $\mu$ M), thioridazin (1-10  $\mu$ M) etkisiz oldu. Flufenazin (10  $\mu$ M) dopamin reseptör agonisti piri pedal'in yüksek potasyumla uyarılma sırasında asetilkolin saliverilmesinde neden olduğu baskılanmayı önledi. Sulpirid (100  $\mu$ M) ve etikloprid (10  $\mu$ M) piri pedal'in yüksek  $K^+$  uyarılma sırasında asetilkolin saliverilmesine olan etkisini bloke edemediler ve arttırıcı yönde etki gösterdiler. Dopamin nöronlarının 6-hidroksidopamin tarafında kimyasal tahribi striatal dilimlerden bazal ve uyarılma koşullarında dopamin saliverilmesini azalttı, fakat asetilkolin ve kolin saliverilmesini etkilemedi.

**Sonuçlar:** Bu bulgular bazı dopamin reseptör antagonistlerinin (sulpirid ve etikloprid gibi) uyarılan striatal dilimlerden kolin saliverilmesini etkilemeden asetilkolin saliverilmesini baskıladıklarını, diğerlerinin (flufenazin, thioridazin, haloperidol gibi) ise böyle bir etkisi olmadığını göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** Asetilkolin, kolin, striatum, dopamin reseptör antagonist, sıçan

## EFFECTS OF DOPAMINE RECEPTOR ANTAGONISTS ON ACETYLCHOLINE AND CHOLINE RELEASE FROM RAT BRAIN STRIATAL SLICES

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of the study was to determine the effects of dopamine receptor antagonists on acetylcholine and choline metabolism in rat brain striatal slices.

**Methods:** Striatal slices from rat brain were perfused with physiological medium under basal and stimulated conditions in the presence of various concentrations of dopamine receptor antagonists. Acetylcholine and choline contents of the perfusate and tissue were assayed radioenzymatically.

**Results:** Under resting conditions the rate of acetylcholine and choline release into the perfusate were  $49 \pm 5$  pmol/mg protein/10 min and  $321 \pm 14$  pmol/mg protein/10 min, respectively. Presence of dopamine receptor antagonists [Flufenazin (0,1-100  $\mu$ M), haloperidol (1-10  $\mu$ M), thioridazine (1-10  $\mu$ M), sulpride (1-100  $\mu$ M) and eticlopride (1-10  $\mu$ M)] in the perfusion medium failed to alter the basal rate of acetylcholine and choline release. When the slices were stimulated by high  $K^+$  (50  $\mu$ M) or electrically (15 Hz, 1 ms ve 80 mA), the release of acetylcholine increased to  $938 \pm 108$  pmol/mg protein/10 min or  $398 \pm 22$  pmol/mg protein/10 min, respectively. Sulpride (100  $\mu$ M) and eticlopride (10  $\mu$ M), but not flufenazin (0,1-100  $\mu$ M), haloperidol (1-10  $\mu$ M) or thioridazine (1-10  $\mu$ M), decreased acetylcholine release by about 50%, during electrical or high  $K^+$  stimulation. Flufenazine (10  $\mu$ M) attenuated the decrease in acetylcholine release induced by piri pedal (100  $\mu$ M), an agonist of dopamine receptors, during  $K^+$  depolarization. Sulpride (100  $\mu$ M) or eticlopride (10  $\mu$ M) failed to block the effect of piri pedal on acetylcholine release during electrical or high  $K^+$  stimulation, contrarily they showed tendency to enhance it. Chemical destruction of dopamine neurons by 6-hydroxydopamine decreased dopamine release but failed to alter acetylcholine and choline release from the striatal slices either at rest or during stimulation.

**Conclusion:** These data show that some dopamine receptor antagonists (e.g., sulpride and eticloprid), but not others (e.g., flufenazine, haloperidol and thioridazine), decrease acetylcholine release from stimulated striatal slices without altering choline release, and tissue contents of acetylcholine and choline.

**Key words:** Acetylcholine, choline, striatum, dopamine receptor antagonist, rat

## Giriş

Striatal nöronal şebeke içinde yer alan kolinerjik ve dopaminerjik nöronların bazal ganglionların temel fizyolojik fonksiyonlarının (sensorimotor öğrenme, motor ve bilişsel fonksiyonlar gibi) düzenlenmesinde ve bu bölge ile ilgili bazı nöro-psikiyatrik bozukluklarda (Parkinson hastalığı gibi) önemli rolleri vardır (1-10). Striatumdaki kolinerjik nöronlar, internöron yapısında olup (gövdeleri ve aksonal uzantıları da striatumda bulunur) striatal internöronların %5 kadarını oluşturur (1, 3, 5, 7, 8, 10). Striatal kolinerjik internöronlar yaygın aksonal dallanma gösterirler ve spontan tonik aktiviteleri (2-10 Hz) vardır (1, 3, 5, 7, 8, 10). Kolinerjik internöronlardan farklı olarak striatal dopaminerjik nöronların gövdeleri mezensefalonda substansiya nigra da bulunur ve buradan başlayan aksonlar striatumda yaygın şekilde dağılırlar (2, 4, 6, 8, 10). Dopaminerjik nöronların striatal aksonal sonları striatal kolinerjik internöronlarla sinaptik bağlantı yaparlar (1-10). Dopaminerjik nörotransmisyonu etkileyen tedaviler striatal kolinerjik nöronal aktiviteyi ve nörotransmitter asetilkolin'in salıverilmesini değiştirirler (6, 8-20).

Biz önceki çalışmamızda dopamin reseptör agonisti maddelerin bazal ve uyarılma koşullarında striatal dilimlerden asetilkolin ve kolin salıverilmesine etkilerini inceledik ve dopamin reseptör agonisti apomorfine, piripidil ve kuinpirol'ün striatal dilimlerde elektrikle ve yüksek potasyumla uyarılmanın neden olduğu asetilkolin çıkışını baskıladıkları bildirdik (21). Bu çalışmada ise, striatal dilimlerden kolin ve asetilkolin çıkışına endojen dopaminerjik nörotransmisyonun baskılanmasının etkisi denenmiştir. Çalışmada: 1. dopamin reseptör antagonistlerinin striatal dilimlerde bazal ve uyarılma koşullarında asetilkolin ve kolin salıverilmesinin değiştirip değiştirmediği, 2. dopamin reseptör antagonistlerinin doku asetilkolin ve kolin düzeylerini etkileyip etkilemediği, ve 3. uyarıya bağlı asetilkolin salıverilmesinde dopamin reseptör agonisti piripidil ile ortaya çıkan baskılanmanın dopamin reseptör antagonistlerince geri döndürülüp döndürülmediği incelenmiştir. Ek olarak, intraserebroventriküler 6-hidroksidopamin tedavisi ile nigra-striatal dopaminerjik nöronlarının tahrip edilmesinin striatal dilimlerden asetilkolin çıkışını değiştirip değiştirmediği incelenmiştir.

## Yöntem ve gereçler

### Deney hayvanı ve bakım koşulları

Çalışmada 250-350 g ağırlığında erkek Sprague-Dawley sıçanlar (Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi, Bursa) kullanıldı. Deney öncesi ve sırasında sıçanlar 4-6 tanesi bir kafeste olmak üzere, standart koşullarda (18-22 °C, 12 saat karanlık ve 12 aydınlık) yem ve su alımları serbest tutularak ve evrensel etik kurallara uyularak bakıldılar.

### Intraserebroventriküler 6-hidroksidopamin zerk

Nigra-striatal dopamin nöronlarını tahrip etmek için 12 sıçanda intraserebroventriküler 6-hidroksidopamin enjeksiyonu yapıldı (22, 23). Sıçanlara 30 dakika önceden, 6-hidroksidopamin ile nigra-striatal dopamin nöron kaybını arttırmak için 5 mg/kg tranilsipromin, ve beyin noradrenalin nöronlarını korumak için de 25 mg/kg desipramin periton içi yolla zerk edildi. 6-Hidroksidopamin hidrobromür 0,5 mg/ml askorbik asid içeren ve buzda tutulan tuzlu su içinde çözündü (250 µg/ 20 µl). Sıçanlar eterle anesteziye edildiler ve kafatası kemiğinde bregmanın 1,5 mm sağ yanında ve 1 mm arkasında yaklaşık 1 mm çapında küçük bir delik açıldı (22, 23). Kafatasında açılan bu delikten hamilton mikroenjektör aracılığı ile kafatasında dik olarak ve kafatası kemiği yüzeyinden 5 mm derinliğe (sağ serebral ventrikül içine) inildi ve 250 µg 6-hidroksidopamin 20 µl içinde enjekte edildi. Enjektör yaklaşık 1 dakika kadar yerinde tutuldu ve takiben yavaşça geri çekildi. Kontrol sıçanlara aynı şekilde 20 µl taşıyıcı solüsyon (0,5 mg/ml askorbik asid içeren tuzlu su solüsyonu) enjeksiyonu yapıldı.

### Striatal beyin dilimlerin hazırlanması ve perfüzyon koşulları

Her iki taraf korpus striatum bölgesi tüm olarak çıkarıldı ve otomatik dilimleyici ile (McIlwain Tissue Chopper, The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomstall, İngiltere) önden arkaya doğru 0,3 mm kalınlıkta dikine olarak dilimlendi. Dilimler yumuşak tüylü fırça ile tek tek ayrıldı ve 5-6 dilim bir perfüzyon odacığına (1 ml ) olacak şekilde "beyin dilimleri perfüzyon sistemine" alındı. Dilimler 37 °C kadar ısıtılmış ve %95 O<sub>2</sub> + %5 CO<sub>2</sub> gaz karışımı ile devamlı olarak havalandırılan fizyolojik tuzlu su solüsyonu [Bileşimi (mM olarak): NaCl, 120; KCl, 3,5; CaCl<sub>2</sub>, 1,3; MgSO<sub>4</sub>, 1,2; Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>, 25 ve D-Glükoz, 10] ile 0,6 ml/dakika hızla 8 kanallı peristaltik pompa aracılığı ile perfüze edildi. Perfüzyon sıvısına asetilkolin'in enzimatik parçalanmasını önlemek için asetilkolinesteraz inhibitörü fizostigmin (20 µM) eklendi. Dilimler bu şekilde 60 dakika süre ile denge ve toparlanma için perfüze edildi.

### Deneyel işlemler

Dopamin reseptör antagonistlerinin bazal ve uyarılma koşullarda asetilkolin ve kolin salıverilmesine etkisini incelemek için denge perfüzyonunu takiben perfüzyon sıvısına etkisi denenecek dopamin reseptör antagonisti maddeler çeşitli konsantrasyonlarda eklendi ve dilimler 30 dakika daha perfüze edildiler. Bu 30 dakikalık dönemin son 10 dakikasında bazal koşullarda asetilkolin ve kolin salıverilmesini belirlemek için perfüze toplandı.

Takiben, dilimler ortamda dopamin antagonistlerinin varlığında ya yüksek potasyumlu solüsyonla ya da elektrikle

10 dakika süreyle uyarıldı. Yüksek potasyumla uyarılma için fizyolojik sıvıdaki KCl düzeyi 3,5 mM dan 50 mM çıkarıldı. Bu solüsyonun osmolaritesini normal sınırlarda tutmak için NaCl düzeyi 73,5 mM indirildi. Elektrikle uyarı (15 Hz, 1 ms ve 80 mA) için perfüzyon odacıkların taban ve tavanına yerleştirilmiş Ag/AgCl<sub>2</sub> elektrotlar ve 4 kanallı stimülatör (Grass 88 Model; Grass Inc, MA, ABD) kullanıldı.

Uyarılma dönemi süresince (10 dakika) asetilkolin ve kolin salıverilmesine dopamin reseptör antagonistlerinin etkilerini belirlemek için perfüzyat toplandı.

#### *Perfüzyat ve dokudan asetilkolin ve kolin ekstraksiyonu*

Bazal ve uyarılma dönemlerinde toplanan 10 dakikalık döneme ait perfüzyat örneklerinden asetilkolin ve kolin silisik asit kolon tekniği kullanılarak (24) daha önce tarif edildiği şekilde (21) ekstrakte edildi. Bu amaçla, 2 ml perfüzyat cam pastör pipetlerine hazırlanmış 0,8x1,2 cm silisik asit kolonlarından (Bio-Sil, Bio-Rad firması, CA, ABD) süzülerek geçirildi. Bu süzülme sırasında kolona tutunmuş olan kolin 0,75 ml 0,075 N HCl ile asetilkolin ise, 1,25 ml 0,03 N HCl (%20 lik metanol içinde hazırlanmış) ile serbestleştirildi ve asit süzüntüler ayrı ayrı cam tüpler (12x75 mm) içinde toplandı.

Uyarılma dönemine geçmeden ve deneyin sonunda perfüzyon odacıklarından dilimler alındı ve 2-3 kez soğuk Krebs solüsyonu ile yıkandı. Dilimler 1 ml soğuk distile su içinde su içinde (20 µM fizostigmin içeren) cam-teflon doku öğütücüsü ile homojenize edildi. Doku homojenatında 0,2 ml homojenat 3 ml kloroform+metil alkol karışımı (2 kısım kloroform+ 1 kısım metilalkol) ile cam tüpler içinde karıştırıldı ve güçlü bir şekilde vortekslendi. Karışım üzerine 0,8 ml soğuk distile su eklendi ve yeniden 10-20 saniye kadar vortekslendi ve 2-4 saat kadar bir süreyle buz dolabında tutuldu. Karışım santrifüje edilerek (10 dakika, 3000 g, 4 °C) iki fazın (organik ve sulu fazlar) ayrıldı. Asetilkolin ve kolinin bulunduğu üstteki sulu fazdan 0,4 ml cam tüplere aktararak vakum altında kurutuldu. Kurutulmuş örnekler üzerine 1 ml soğuk distile su eklendi ve vortekslendi ve bu çözelti yukarıda perfüzyatlar için tarif edildiği şekilde silisik asit kolonlarından geçirilerek kolin ve asetilkolin asit kolon süzüntüleri içinde toplandı. Kolon süzüntüleri vakum altında kurutuldu ve aşağıda perfüzyatlar için tarif edildiği üzere kolin ve asetilkolin radio-enzimatik yöntemle ölçüldü.

#### *Asetilkolin ve kolin ölçümü*

Perfüzyat ve dokudan yukarıda açıklandığı şekilde ekstrakte edilen ve ölçüme hazır hale getirilen asetilkolin ve kolin radioenzimatik yöntemle (25) daha önce anlatıldığı

şekilde (21) ölçüldü. Kısaca; kolin içeren kurutulmuş asit süzüntü örneklerine kolin'i radyoaktif fosfokoline dönüştürecek 2 mÜ kolin kinaz (Sigma Chemical Company, MO, ABD) ve 0,5 µCi <sup>32</sup>P-γ-ATP (Amersham, Londra, İngiltere) içeren 25 ml ölçüm karışımı-tamponu (pH = 8,5) eklendi ve 20 dakika süre ile 37 °C su banyosunda inkübe edildi. Sürenin sonunda üzerlerine 0,5 ml soğuk su eklenerek enzimatik reaksiyon durduruldu. Bu inkübasyon sırasında örneklerdeki serbest kolinin tümü eklenen kolin kinaz enziminin <sup>32</sup>P-fosfokoline'e dönüştürüldü.

Asetilkolin ölçümü ise iki basamaklı enzimatik reaksiyonla gerçekleştirilmiştir. İlk basamakta asetilkolin içeren örneklerdeki kolin uzaklaştırıldı. Bu maksatla asetilkolin örnekleri üzerine 25 µl radyoaktif ATP içermeyen kolin ölçüm karışımı elenmiş ve 20 dakika süreyle 37 °C inkübe edilmiştir. Bu aşamada örneklerde buluna tüm serbest kolin radyoaktif olmayan fosfokoline dönüştürüldü. İkinci aşamada ise, ölçüm ortamına 10 µl içinde 2,5 ünite asetilkolinesteraz ve 0,5 µCi <sup>32</sup>P-γ-ATP eklendi. Örnekler tekrar 20 dakika süreyle 37 °C su banyosunda inkübe edildi ve enzimatik reaksiyon 0,5 ml soğuk su eklenmesi ile sonlandırıldı. Bu ikinci aşamada ise, örneklerdeki asetilkolin ortama eklenen 2,5 ünite asetilkolinesteraz enzimi ile koline hidrolize edilmiş ve bu reaksiyondan oluşan serbest kolin ortamda ilk basamaktan kalan kolin kinaz enziminin radyoaktif fosfokoline (<sup>32</sup>P-fosfokolin) dönüştürüldü.

Kolin ve asetilkolin örneklerindeki karışımı anyon değiştirici reçineden (AG-1 x8, format form, 200-400 mesh, Bio-Rad, CA, ABD) hazırlanmış kolonlara (0.8x1,5 cm) uygulandı. Karışım kolonlardan süzüldükten sonra kolonlar üzerine önce 0,5 ml 5 N NaOH ve takiben de 1,25 ml amonyum asetat (75 mM, pH = 10) çözeltileri eklendi. Tüm kolon süzüntüsü radyoaktif sayım tüplerinde toplandı ve üzerine 10 ml H<sub>2</sub>O eklenerek radyoaktivitesi likit skintilasyon spektrometresinde ölçüldü (Tri-Carb 1600-TR, Packard Instrument Co., Inc., CT, ABD). Bu kolon işlemi sırasında enzimatik işlemler sırasında kullanılmamış <sup>32</sup>P-ATP tamamı kolona tutulmakta, <sup>32</sup>P-fosfokolin ise kolonda tutunmayarak süzüntü ile beraber akmaktadır. Dolayısı ile toplanan kolon süzüntüsü içinde sadece kolinden sentez edilmiş <sup>32</sup>P-fosfokolin bulunmaktadır.

Kolin ve asetilkolin standartları tüm aşamalarda (ekstraksiyon, kurutma ve enzimatik reaksiyonlar) örneklerle beraber aynı işleme tabi tutuldular. Bu standartlardaki radyoaktiviteden yararlanarak örneklerdeki kolin ve asetilkolin miktarları belirlendi. Değerler dilimlerdeki proteine göre düzeltildi.

**Tablo 1.** Dopamin reseptör antagonisti bazı maddelerin bazal koşullarda perfüze edilen ya da yüksek potasyumla uyarılan striatal dilimlerden asetilkolin salıverilmesine etkileri

Tedavi –İlaç	N	Asetilkolin (pmol/mg protein/10 dakika)	
		Bazal	K <sup>+</sup> uyarılma
Kontrol	10	49 ± 5	938 ± 108*
Flufenazin (0,1 µM)	7	35 ± 5	813 ± 99*
Flufenazin (1 µM)	7		865 ± 51*
Flufenazin (10 µM)	8		780 ± 80*
Flufenazin (100 µM)	8	52 ± 5	980 ± 140*
Sulpirid (1 µM)	7	43 ± 4	934 ± 108*
Sulpirid (10 µM)	8	44 ± 6	777 ± 87*
Sulpirid (100 µM)	8	38 ± 7	440 ± 24*, #
Haloperidol (1 µM)	6	48 ± 6	817 ± 86*
Haloperidol (10 µM)	6	41 ± 5	756 ± 81*
Thioridazin (1 µM)	6	53 ± 7	776 ± 68*
Thioridazin (10 µM)	6	56 ± 5	803 ± 86*
Etiklopirid (1 µM)	6	38 ± 7	698 ± 48*
Etiklopirid (10 µM)	6	47 ± 6	491 ± 63*, #

Striatal dilimler 60 dakika süreyle fizostigmin (20 mM) içeren Krebs solüsyonu ile perfüze edildiler. Takiben perfüzyon ortamına 1. sütunda yer alan dopamin reseptör antagonistleri belirtilen düzeylerde eklendi ve 30 dakika daha bazal koşullarda perfüzyona devam edildi. Bu sürenin sonunda aynı düzeyde dopamin reseptör antagonist içeren yüksek potasyumlu (50 mM) Krebs solüsyonu ile perfüzyon başlatıldı. Dilimler yüksek potasyumlu Krebs ile 10 dakika daha perfüze edildiler ve bu süre içinde perfüze toplanarak asetilkolin ölçümleri yapıldı. Değerler doku protein düzeyine göre düzeltildi ve "pmol/mg protein/10 dakika" olarak ifade edildi. Değerler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak belirtilmiştir. \*P<0,001; kendi "bazal" değeri ile karşılaştırıldığında; #p<0,001 "kontrol" değeri ile karşılaştırıldığında.

### Dokuda protein ölçümü

Yukarıda belirttiği şekilde striatal dilimlerinden hazırlanan doku homojenatlarından (10-50 µl) protein düzeyi ölçümü fotometrik yöntemle (26) yapıldı.

### İlaçlar

Flufenazin HCl, (±)-Sulpirid ve Etiklopirid HCl RBI'dan (Research Chemicals Incorporated, RBI, MA, ABD), 6-Hidroksidopamin HBr ise Sigma'dan (Sigma Chemical Company, MO, ABD) satın alındı. Pripedil, Haloperidol ve Thioridazin ise, Türkiye'de bu ilaçları üreten firmalardan temin edilmiştir.

### İstatistik

Hesaplamalarda ve istatistiki değerlendirmelerde "Pharmacological Calculations, Version 2" ve "Sigmatat" bilgisayar yazılımları kullanılmıştır. Aynı dilimlerden bazal ve uyarılma koşullarında perfüzatta bulunan asetilkolin ve

**Tablo 2.** Dopamin reseptör antagonisti bazı maddelerin bazal ve yüksek potasyumla uyarılma koşullarında striatal dilimlerden kolin salıverilmesine etkileri

Tedavi-Antagonist	N	Kolin (pmol/mg protein/10 dakika)	
		Bazal	K <sup>+</sup> Uyarılma
Kontrol	10	321 ± 14	455 ± 12*
Flufenazin (0,1 µM)	7	350 ± 26	460 ± 24*
Flufenazin (1 µM)	7	315 ± 24	458 ± 25*
Flufenazin (10 µM)	8	315 ± 26	475 ± 31*
Flufenazin (100 µM)	8	347 ± 19	517 ± 25*
Sulpirid (1 µM)	7	319 ± 26	495 ± 36*
Sulpirid (10 µM)	8	347 ± 38	507 ± 28*
Sulpirid (100 µM)	8	298 ± 17	458 ± 27*
Haloperidol (1 µM)	6	312 ± 32	509 ± 22*
Haloperidol (10 µM)	6	366 ± 21	524 ± 31*
Thioridazin (1 µM)	6	322 ± 35	505 ± 25*
Thioridazin (10 µM)	6	387 ± 28	555 ± 38*
Etiklopirid (1 µM)	6	356 ± 23	501 ± 33*
Etiklopirid (10 µM)	6	408 ± 27	555 ± 37*

Striatal dilimler Tablo 1'de açıklandığı şekilde bazal ve yüksek potasyumla (50 mM) uyarılarak dopamin reseptör antagonistleri varlığında perfüze edildi. Potasyumla depolarizasyon öncesi ve sonrasında 10 dakikalık dönemde perfüze toplandı ve kolin düzeyi ölçüldü. Değerler doku protein düzeyine göre düzeltildi ve "pmol/mg protein/10 dakika" olarak ifade edildi. Değerler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak belirtilmiştir. \*p<0,05; kendi "bazal" düzeyi ile karşılaştırıldığında (eşleştirilmiş t-testi).

kolin değerleri arasındaki fark "eşleştirilmiş t-testi" ile karşılaştırıldı. İki'den fazla farklı ortalama karşılaştırılmalarında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı, anlamlılık durumunda bu ortalamalar "Tukey Testi" ile belirlendi. Değerler, aksi belirtilmedikçe, ortalama ± ortalamanın standart hatası (SH) olarak verilmiştir. P değeri 0,05'den daha küçük olduğunda ortalamalar arası fark anlamlı kabul edilmiştir.

### Bulgular

#### Dopamin reseptör antagonistlerinin striatal dilimlerden asetilkolin salıverilmesine etkileri

Striatal dilimlerden bazal koşullarda asetilkolin salıverilmesi 49 ± 5 pmol/mg protein/10 dakika idi (Tablo 1) ve yüksek potasyumla depolarizasyona geçince asetilkolin salıverilmesi 20-kat kadar artarak 938 ± 108 pmol/mg protein/10 dakika düzeyine çıktı (Tablo 1). Bazal asetilkolin çıkışı flufenazin (0,1-100 µM), sulpirid (1-100 µM), haloperidol (1-10 µM), thioridazin (1-10 µM) ve etiklopirid (1-10

$\mu\text{M}$ ) tarafından etkilenmezken [ $F(13,85) = 1,03$ ;  $p = 0,43$ ], yüksek potasyumla artmış olan asetilkolin saliverilmesi 100  $\mu\text{M}$  sulpirid ( $p < 0,01$ ) ve 10  $\mu\text{M}$  etiklopirid ( $p < 0,05$ ) tarafından %50 oranında baskılandı (Tablo 1). Daha düşük konsantrasyonlarında sulpirid (1 ve 10  $\mu\text{M}$ ) ve etiklopirid (1  $\mu\text{M}$ ) ve diğer dopamin reseptör angonsitleri incelenen düzeylerinde [flufenazin (0,1-100  $\mu\text{M}$ ) haloperidol (1-10  $\mu\text{M}$ ) ve thioridazin (1-10  $\mu\text{M}$ )] yüksek potasyumla artmış asetilkolin çıkışını anlamlı düzeyde etkilemedi (Tablo 1).

#### *Dopamin reseptör antagonistlerinin striatal dilimlerden kolin saliverilmesine etkileri*

Striatal dilimlerden bazal koşullarda kolin saliverilmesi  $321 \pm 14$  pmol/mg protein/10 dakika kadardı (Tablo 2). Yüksek potasyumla depolarizasyona geçince 1,4 -kat kadar artarak ( $p < 0,05$ ),  $455 \pm 12$  pmol/mg protein/10 dakika düzeyine çıktı (Tablo 2). İncelenen dopamin reseptör antagonistlerinin hiç biri, denenen tüm konsantrasyonlarında [flufenazin (0,1-100  $\mu\text{M}$ ), sulpirid (1-100  $\mu\text{M}$ ), haloperidol (1-10  $\mu\text{M}$ ), thioridazin (1-10  $\mu\text{M}$ ) ve etiklopirid (1-10  $\mu\text{M}$ )] gerek bazal [ $F(13,85) = 1,40$ ;  $p = 0,18$ ] ve gerekse uyarılmış [ $F(13,85) = 1,38$ ;  $p = 0,19$ ] koşullardaki kolin çıkışını etkilemediler (Tablo 2).

#### *Dopamin reseptör antagonistlerinin striatal dilimlerden doku asetilkolin ve kolin düzeyine etkileri*

Tablo 3'de de görüldüğü gibi dopamin reseptör antagonistleri doku asetilkolin [ $F(13,85) = 0,91$ ;  $p = 0,55$ ] ve doku kolin düzeyini [ $F(13,85) = 1,52$ ;  $p = 0,13$ ] anlamlı olarak de-ğiştirmediler (Tablo 3).

#### *Dopamin reseptör antagonistlerinin elektrikle uyarılan striatal dilimlerden asetilkolin saliverilmesine etkileri*

Elektrikle uyarılan striatal dilimlerden asetilkolin saliverilmesi 10-kat kadar artarak,  $55 \pm$  pmol/mg protein/10 dakika düzeyden  $398 \pm 22$  pmol/mg protein/10 dakika düzeyine çıktı (Tablo 4). Flufenazin (10 ve 100  $\mu\text{M}$ ), sulpirid (10 ve 100  $\mu\text{M}$ ), haloperidol (10  $\mu\text{M}$ ), thioridazin (10  $\mu\text{M}$ ) ve etiklopirid (10  $\mu\text{M}$ ) bazal asetilkolin çıkışını anlamlı oraka etkilemezken [ $F(7,46) = 0,42$ ;  $p = 0,88$ ], elektrikle uyarılmış asetilkolin çıkışı ise, 100  $\mu\text{M}$  sulpirid tarafında %35 ( $p < 0,05$ ) ve 10  $\mu\text{M}$  etiklopirid tarafından da %22 ( $p < 0,05$ ) kadar baskılandı.

#### *Dopamin reseptör antagonistlerinin potasyumla depolarize edilen striatal dilimlerden piriipedil varlığında ve yokluğunda asetilkolin saliverilmesine etkileri*

Yüksek potasyumla depolarize edilen dilimlerden asetilkolin çıkışı bir dopamin reseptör agonisti olan piriipedil (100  $\mu\text{M}$ ) tarafından anlamlı olarak ( $p < 0,001$ ) %40-50

**Tablo 3.** Dopamin reseptör antagonistlerinin striatal dilimlerde doku asetilkolin ve kolin düzeyine etkileri

Tedavi	N	Asetilkolin (pmol/mg protein) (pmol/mg protein)	
Kontrol	10	2195 $\pm$ 155	1140 $\pm$ 40
Flufenazin (0,1 $\mu\text{M}$ )	7	2060 $\pm$ 262	987 $\pm$ 43
Flufenazin (1 $\mu\text{M}$ )	7	2142 $\pm$ 124	963 $\pm$ 66
Flufenazin (10 $\mu\text{M}$ )	8	2122 $\pm$ 213	1060 $\pm$ 67
Flufenazin (100 $\mu\text{M}$ )	8	2218 $\pm$ 227	876 $\pm$ 108
Sulpirid (1 $\mu\text{M}$ )	7	1962 $\pm$ 121	963 $\pm$ 72
Sulpirid (10 $\mu\text{M}$ )	8	2140 $\pm$ 93	1103 $\pm$ 42
Sulpirid (100 $\mu\text{M}$ )	8	1870 $\pm$ 187	1009 $\pm$ 108
Haloperidol (1 $\mu\text{M}$ )	6	2418 $\pm$ 245	1266 $\pm$ 132
Haloperidol (10 $\mu\text{M}$ )	6	2178 $\pm$ 178	1173 $\pm$ 143
Thioridazin (1 $\mu\text{M}$ )	6	1949 $\pm$ 142	1076 $\pm$ 126
Thioridazin (10 $\mu\text{M}$ )	6	2370 $\pm$ 258	947 $\pm$ 107
Etiklopirid (1 mM)	6	1975 $\pm$ 150	1218 $\pm$ 101
Etiklopirid (10 mM)	6	1690 $\pm$ 275	982 $\pm$ 105

Striatal dilimler 60 dakika süreyle fizostigmin (20  $\mu\text{M}$ ) içeren Krebs solüsyonu ile perfüze edildiler. Takiben perfüzyon ortamına 1. sütunda yer alan dopamin reseptör antagonistleri belirtilen düzeylerde ortama eklendi ve 30 dakika daha bazal koşullarda perfüzyona devam edildi. Bu sürenin sonunda perfüzyon odacıklarından dilimler alındı ve dokuda asetilkolin ve kolin ölçümü yapıldı. Değerler doku protein düzeyine göre düzeltilildi ve "pmol/mg protein" olarak ifade edildi. Değerler ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası olarak belirtilmiştir. Ölçüm sayıları "N" sütunu altında gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Dopamin reseptör antagonisti bazı maddelerin bazal koşullarda perfüze edilen ya da elektrikle uyarılan striatal dilimlerden asetilkolin saliverilmesine etkileri

Tedavi -İlaç	N	Asetilkolin (pmol/mg protein/10 dakika)	
		Bazal	Elektrikle Uyarılma
Kontrol	10	55 $\pm$ 5	398 $\pm$ 22*
Flufenazin (10 $\mu\text{M}$ )	6		385 $\pm$ 42*
Flufenazin (100 $\mu\text{M}$ )	6	46 $\pm$ 8	365 $\pm$ 28*
Sulpirid (10 $\mu\text{M}$ )	7	46 $\pm$ 6	402 $\pm$ 32*
Sulpirid (100 $\mu\text{M}$ )	7	58 $\pm$ 9	265 $\pm$ 34*; #
Haloperidol (10 $\mu\text{M}$ )	6	51 $\pm$ 7	432 $\pm$ 34*
Thioridazin (10 $\mu\text{M}$ )	6	50 $\pm$ 8	415 $\pm$ 32*
Etiklopirid (10 $\mu\text{M}$ )	6	57 $\pm$ 9	310 $\pm$ 19*; #

Striatal dilimler 60 dakika süreyle fizostigmin (20  $\mu\text{M}$ ) içeren Krebs solüsyonu ile perfüze edildiler. Takiben perfüzyon ortamına 1. sütunda yer alan dopamin reseptör antagonistleri belirtilen düzeylerde eklendi ve 30 dakika daha bazal koşullarda perfüzyona devam edildi. Bu sürenin sonunda dilimler elektrikle (15 Hz, 1 ms, 80 mA) 10 dakika süreyle uyarıldılar. Uyarılma öncesi (bazal) ve sırasında 10 dakika perfüzyat toplandı ve asetilkolin ölçümleri yapıldı. Değerler doku protein düzeyine göre düzeltilildi ve "pmol/mg protein/10 dakika" olarak ifade edildi ve ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası olarak belirtildi. \* $p < 0,001$ ; kendi "bazal" değeri ile karşılaştırıldığında; # $p < 0,001$  "kontrol" değeri ile karşılaştırıldığında.

**Tablo 5.** Dopamin reseptör agonistleri flufenazin, sulpirid ve etiklopirid'in yüksek potasyumla uyarılan striatal dilimlerden dopamin agonisti piri pedal ile baskılanan asetilkolin salıverilmesine etkileri

Tedavi	N	Asetilkolin
		(pmol/mg protein/10 dakika)
Kontrol	7	781 ± 40
Piripediil (100 µM)	7	476 ± 27*
Flufenazin (10 µM)	7	835 ± 34
Flufenazin (10 µM) + Piripediil (100 µM)	7	670 ± 37#
Kontrol	7	734 ± 32
Piripediil (100 µM)	7	344 ± 19*
Sulpirid (10 µM)	7	707 ± 39
Sulpirid (10 µM) + Piripediil (100 µM)	7	371 ± 33*
Sulpirid (100 µM)	7	324 ± 23*
Sulpirid (100 µM) + Piripediil (100 µM)	7	217 ± 22*,#
Kontrol	7	754 ± 37
Piripediil (100 µM)	7	385 ± 29*
Etiklopirid(10 µM)	7	491 ± 30*
Etiklopirid (10 µM) + Piripediil (100 µM)	7	353 ± 29*

Striatal dilimler 60 dakika süreyle fizostigmin (20 µM) içeren Krebs solüsyonu ile perfüze edildiler. Takiben perfüzyon ortamına 1. sütunda yer alan dopamin reseptör antagonistleri belirtilen düzeylerde eklendi ve 30 dakika daha bazal koşullarda perfüzyona devam edildi. Takiben perfüzyon ortamına 1. sütunda yer alan dopamin reseptör antagonistleri, pipediil ya da antagonist + pipediil belirtilen düzeylerde eklendi ve 30 dakika daha bazal koşullarda perfüzyona devam edildi. Bu sürenin sonunda aynı düzeyde dopamin reseptör antagonisti ve pipediil içeren yüksek potasyumlu (50 mM) Krebs solüsyonu ile 10 dakika süre için perfüzyon başlatıldı. Kontrol dilimler ise 60.-90. arasında normal Krebs ile ve sonraki dönemde de dopamin agonisti ya da antagonist içermeyen yüksek potasyumlu Krebs ile perfüze edildiler. Yüksek potasyumlu Krebs ile 10 dakika daha perfüzyon sırasında perfüzyat toplanarak asetilkolin ölçümleri yapıldı. Değerler doku protein düzeyine göre düzeltildi ve "pmol/mg protein/10 dakika" olarak ifade edildi. Değerler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak belirtilmiştir. \*p<0,001; kendi "kontrol" değeri ile karşılaştırıldığında; #p<0,001 "piripediil (100 µM)" değeri ile karşılaştırıldığında.

oranında azaltıldı (Tablo 5). Piripediil'in bu baskılayıcı etkisi, 10 µM flufenazin tarafından önlenirken (Tablo 5), 10 µM sulpirid tarafından değiştirilmedi (Tablo 5). Asetilkolin çıkışı ortama eklenen 100 µM sulpirid ve 10 µM etiklopirid tarafından baskılandı (Tablo 5). Piripediil (100 µM) ve sulpirid (100 µM) kombinasyonunda ise asetilkolin çıkışında gözlenen baskılanma, bu iki maddenin ayrı ayrı etkilerine göre daha belirgin oldu (Tablo 5). Piripediil'in (100

**Tablo 6.** Dopamin reseptör agonistleri sulpirid ve etiklopirid'in elektrikle uyarılan striatal dilimlerden dopamin agonisti piri pedal ile baskılanan asetilkolin salıverilmesine etkileri

Tedavi	N	Asetilkolin
		(pmol/mg protein/10 dakika)
Kontrol	7	453 ± 31
Piripediil (100 µM)	6	243 ± 18*
Sulpirid (100 µM)	6	289 ± 34*
Sulpirid (100 µM) + Piripediil (100 µM)	6	97 ± 10*,#
Etiklopirid(10 µM)	6	299 ± 39*
Etiklopirid (10 µM) + Piripediil (100 µM)	6	196 ± 20*

Striatal dilimler 60 dakika süreyle fizostigmin (20 µM) içeren Krebs solüsyonu ile perfüze edildiler. Takiben perfüzyon ortamına 1. sütunda yer alan dopamin reseptör antagonistleri belirtilen düzeylerde eklendi ve 30 dakika daha bazal koşullarda perfüzyona devam edildi. Takiben perfüzyon ortamına 1. sütunda yer alan dopamin reseptör antagonisti (sulpirid ve etiklopirid) ya da agonisti (piripediil) ilaçlar yalnız ya da kombine olarak belirtilen düzeylerde eklendi ve 30 dakika daha bazal koşullarda perfüzyona devam edildi. Bu sürenin sonunda dilimler elektrikle 10 dakika uyarıldı ve perfüzyat toplanarak asetilkolin ölçümleri yapıldı. Değerler doku protein düzeyine göre düzeltildi ve "pmol/mg protein/10 dakika" olarak ifade edildi. Değerler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak belirtilmiştir. \*p<0,001; kendi "kontrol" değeri ile karşılaştırıldığında; #p<0,001 "Piripediil (100 µM)" ya da "Sulpirid (100 µM)" değeri ile karşılaştırıldığında.

µM) ve etiklopirid (10 µM) kombinasyonunda ise, ek bir baskılanma görülmedi (Tablo 5).

#### *Dopamin reseptör antagonistlerinin elektrikle uyarılan striatal dilimlerden piri pedal varlığında ve yokluğunda asetilkolin salıverilmesine etkileri*

Elektrikle uyarılan dilimlerden asetilkolin çıkışı ortamda 100 µM piri pedal, 100 µM sulpirid ve 10 µM etiklopirid varlığında, sırayla, %47, %37, ve %34 oranında baskılandı (Tablo 5). Piripediil (100 µM) + sulpirid (100 µM) kombinasyonunda asetilkolin çıkışındaki baskılanma %80 kadar yükseldi (Tablo 5). Piripediil (100 µM) + sulpirid (100 µM) kombinasyonunda da ise, asetilkolin çıkışındaki baskılanma %57 kadar oldu (Tablo 5). Verilerin topluca istatistikî analizinde kontrol asetilkolin salıverilme değerinin tüm diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek olduğunu [F(5,31) = 19,54; p<0,001], piri pedal + sulpirid ve bu ilaçların tek başlarına neden oldukları baskılanmadan daha yüksek (p<0,05-0,01) bir baskılanma yaptığını göstermektedir (Tablo 5).

#### *Endojen dopamin nöronları tahrip edilmiş sıçanlardan elde edilen striatal dilimlerden asetilkolin kolin ve dopamin salıverilmesi*

Endojen dopamin salıverilmesinin striatal dilimlerden bazal ve uyarılma koşullarında asetilkolin salıverilmesini

**Tablo 7.** Dopamin nöronları 6-OHDA ile tahrip edilmiş sıçanlardan hazırlanan striatal dilimlerden bazal ve uyarılma koşullarında asetilkolin, kolin ve dopamin saliverilmesi

Ölçülen parametre-Gurup	N	Bazal	Uyarılma
<b>Asetilkolin (pmol/mg protein/10 dakika)</b>			
Kontrol	6	54 ± 6	730 ± 55*
6-OHDA	12	50 ± 6	638 ± 52*
<b>Kolin (pmol/mg protein/10 dakika)</b>			
Kontrol	6	378 ± 12	395 ± 22
6-OHDA	12	387 ± 26	365 ± 28
<b>Dopamin (pmol/mg protein/10 dakika)</b>			
Kontrol	6	14 ± 2	148 ± 18*
6-OHDA	12	6 ± 1#	30 ± 6*,#

Kontrol ya da 6-OHDA ile dopamin nöronları tahrip edilmiş sıçanlardan hazırlanan striatal dilimler 60 dakika süreyle fizostigmin (20 µM) içeren normal Krebs solüsyonu ile perfüze edildiler. Bu sürenin sonunda dilimler 10 dakika süreyle yüksek potasyumlu (50 mM) Krebs solüsyonu ile uyarıldılar. Uyarılma öncesi (bazal) ve sırasında (uyarılma) 10 dakika perfüze toplandı. Bazal ve potasyumla uyarılma koşullarında toplanan perfüze örneklerinde asetilkolin ve kolin radioenzimatik yöntemle, dopamin ise HPLC-EC yöntemi kullanılarak ölçüldü. Değerler doku protein düzeyine göre düzeltildi ve "pmol/mg protein/10 dakika" olarak ifade edildi ve ortalama ± ortalamının standart hatası olarak belirtildi. \*p<0,001; kendi "bazal" değeri ile karşılaştırıldığında; #p<0,001 kendi "kontrol" değeri ile karşılaştırıldığında.

etkileyip etkilemediği dopaminerjik nöronları 3 hafta önce intraserebroventriküler yolla 6-OHDA zerki ile tahrip sıçanlarda denendi. Bulgular toplu halde Tablo 6'da gösterilmiştir. 6-OHDA enjeksiyonu yapılmış sıçanlardan elde edilen dilimlerden bazal ve yüksek potasyumla depolarizasyon koşullarında dopamin çıkışının büyük oranda (bazal koşullarda %60, uyarılmada %80 gibi) azaldığı görülmektedir (Tablo 6). Buna karşın, dilimlerden kolin ve asetilkolin çıkışı ne bazal ne de uyarılma koşullarında 6-OHDA ile etkilenmedi (Tablo 7).

## Tartışma

Bu bulgular dopamin reseptör antagonistleri flufenazin, haloperidol, thioridazin, sulpirid ve etiklopirid tarafından bazal koşullar altında perfüze edilen striatal dilimlerde doku asetilkolin ve kolin düzeylerini ve ortama saliverilen asetilkolin ve kolin miktarını etkilemediğini göstermektedir. Yüksek potasyumla ya da elektrikle uyarılan dilimlerde ise, uyarılmanın neden olduğu asetilkolin saliverilmesi artışı 100 µM sulpirid ve 10 µM etiklopirid tarafından %20-50 oranında baskılanırken, kolin çıkışı etkilenmemektedir. Flufenazin, haloperidol ve thioridazin ise uyarılmada da hem asetilkolin ve hem de kolin saliverilmesi üzerinde etkisiz olmaktadır. Dopamin reseptör agonisti piriipidil'in (100 mM) yüksek potasyumla uyarılmanın yol

açtığı asetilkolin saliverilmesindeki %40 kadar olan azalmayı önlemektedir. Sulpirid (100 µM) ve etiklopirid (10 µM) ise 100 mM piriipidil etkisini önlemedikleri gibi, beraberce ortamda bulduklarında asetilkolin saliverilmesindeki baskılanma şiddetlenmektedir. Endojen dopamin nöronlarının önceden 6-hidroksidopamin tarafından tahrip edilmesi de striatal dilimlerde bazal ve uyarılma koşullarında dopamin çıkışını büyük oranda önlerken asetilkolin ve kolin saliverilmesini etkilememektedir.

Bazal ve uyarılma koşullarında striatal dilimlerden asetilkolin ve kolin saliverilme hızı daha önceki benzer çalışmalarımızla uyumludur (21, 27-30). Ortamda dopamin reseptör antagonistleri varken bazal asetilkolin ve kolin saliverilme hızının değişmemesi, endojen dopaminerjik tonusun bu koşullarda etkisiz olduğunu düşündürmektedir. Uyarılma durumunda ise, sulpirid ve etiklopirid gibi antagonistler asetilkolin çıkışını baskılamışlar, diğerleri (örneğin; haloperidol, flufenazin ve thioridazin) ise etkisiz olmuştur. Sulpirid ve etiklopirid tarafından asetilkolin saliverilmesinde gözlenen baskılanma uyarılma durumunda artmış endojen dopaminerjik tonusun asetilkolin saliverilmesini arttırdığı ve bu uyarıcı tonusun kalmasıyla da asetilkolin saliverilmesinin baskılandığı ileri sürülebilir. Striatumda asetilkolin saliverilmesinin birbirine zıt yönlü iki etki altında olduğu genellikle kabul edilmektedir (11, 13-16, 18). *In vivo* koşullarda yapılan çalışmalarla (örneğin *in vivo* beyin mikrodializi gibi) D1 reseptör uyarılmasının striatumda asetilkolin saliverilmesi uyardığı D2 reseptör uyarılmasının ise asetilkolin saliverilmesini baskıladığı gösterilmiştir (21). Bu görüşle uyumlu olarak bizim striatal dilimlerindeki *in vitro* çalışmamızda da D1 agonisti SCH 38393'ün asetilkolin çıkışını arttırdığını, D2 agonisti piriipidil'in ve kuintero'l'ün ise uyarılmanın yol açtığı asetilkolin çıkışını baskıladığını gösterdik (21). Bu bilgilerle beraber sulpirid ve etiklopirid'in secici güçlü D2 antagonistleri olduğu gerçeği göz önüne alınırsa, bu ilaçların asetilkolin saliverilmesini baskılamaları değil, tersine, D2 üzerinden olan asetilkolin saliverilmesini üzerinde baskılanmayı kaldırmaları ve bu yolla asetilkolin saliverilmesini arttırmaları beklenirdi. Bu beklentiye tamamen ters bu gözlemin mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, *in vivo* koşullarda dopaminerjik reseptör uyarılması ve blokajının asetilkolin saliverilmesi üzerindeki etkisinin *in vitro* koşullardan tamamen farklı olabileceği üzerinde durmak gerekir. Eldeki deliller striatumda kolinerjik internöronlar üzerinde D2 reseptör etkisinin bu nöronlarının tonik deşarjlarını baskıladığı ve bu yolla asetilkolin saliverilmesini baskıladığı bilinmektedir (8-10). Dopamin reseptör antagonistleri ise fizyolojik olarak mevcut bu baskıyı kaldırdıklarında kolinerjik nöronların deşarj frekansı artmakta ve bu yolla

asetilkolin saliverilmesi artmaktadır. Görüldüğü kadarı ile, nigra-striatal bağlantının kopmuş olması nedeniyle, kolinerjik internöronlar üzerinde baskılayıcı bir dopaminerjik tonus yoktur ve dopamin reseptör antagonistleri asetilkolin saliverilmesini arttırmamaktadır. Sulpirid ve etiklopiridin ile uyarılma koşullarında uyarı başına saliverilen asetilkolin'i azaltıcı etkileri tamamen bu ilaçların D2 reseptörlerini bloke etmeleri ile ilgili midir, yoksa bu iki antagonistin başka özellikleri (31) bu baskılanmada rol oynamakta mıdır şimdilik belli değildir ve ek deneylere ihtiyaç göstermektedir. Ancak, kolin saliverilme hızının ve doku kolin ve asetilkolin düzeyinin sulpirid ve etiklopirid ile değişmesi (Tablo 2) bu ilaçlarla gözlenen baskılanmanın kolin elde edilebilirliğinin azalması, asetilkolin sentezi ve depolanmasının bozulması ile ilgili olmadığını göstermektedir.

Beyin dilimlerinden *in vitro* perfüzyon koşullarında perfüzyata asetilkolin ile beraber büyük miktarda serbest kolin de saliverilmektedir (21, 27-29). Bu kolin'in kaynağının dokudaki mevcut serbest kolin'e ek olarak membrandaki kolin içeren fosfolipidler olduğu gösterilmiştir (27, 28, 32). Bu çalışmada, daha önceki bulgularla uyumlu olarak (21) yüksek potasyumla uyarılma sırasında kolin çıkışı artmış (Tablo 2), elektrik uyarılma sırasında ise bir değişme olmamıştır. Ancak kolin çıkışı her iki koşulda da dopamin reseptör antagonistlerince etkilenmemiştir. Bu bulgular kolin çıkışının düzenlenmesinde dopamin reseptörleri üzerinden seyreden bir mekanizmanın olmadığını düşündürmektedir.

Uyarılma sırasında saliverilen asetilkolin miktarının seçici D2 reseptör agonisti piriipedil tarafından baskılanması daha önceki bulgularımızla uyumludur (21). Bu çalışmada piriipedil ile olan baskılanma D2 reseptör antagonisti tarafından önlenmiştir. Bu bulgu beklenen bir etkidir ve piriipedil'in asetilkolin saliverilmesini baskılamasının D2 reseptör aracılığı ile olduğunu göstermektedir. Piriipedil'in D2 antagonistleri sulpirid ve etiklopirid ile kombinasyonunda ise

asetilkolin saliverilmesindeki baskılanma azalmamış tersine etki şiddetlenmiştir. Bu bulgular sulpirid ve etiklopirid'in, yukarıda da ileri sürüldüğü gibi, uyarılma sırasında asetilkolin saliverilmesi baskılayıcı etkilerinde D2 reseptörlerini bloke etmek dışında başka mekanizmaların daha rolü olabileceğini düşündürmektedir (31).

Endojen dopamin nöronlarının 6-hidroksidopaminle büyük oranla ortadan kaldırıldığı sıçanlardan elde edilen striatal dilimlerde bazal ve uyarılmış koşullarda kolin ve asetilkolin çıkışının kontrol dilimlerinde olduğu gibi oluşu, bu deney koşullarında endojen dopaminerjik tonusun kolin ve asetilkolin saliverilmesinde etkilerinin, eğer bir etki varsa, sınırlı olduğu görüşüne ek delil getirmektedir. Bulgularımız 6-hidroksidopamin ile tedavi edilmiş sıçanlardan elde edilen dilimlerden bazal ve uyarılmış dopamin saliverilmesinin sırası ile %60 ve %80 oranında baskılandığını ve 6-hidroksidopamin tedavisi ile endojen dopamin tonusunun büyük oranda devre dışı kaldığını, daha önceki bulgularla uyumlu olarak (22, 23), göstermektedir. Eğer endojen dopamin tonusu asetilkolin ve kolin çıkışına belirgin bir etkiye sahip olsaydı, bu sıçanlardan elde edilen dilimlerden kolin ve asetilkolin çıkışında da endojen dopamin azlığına uygun bir değişme olması beklenirdi. Daha önceki 6-hidroksidopamin kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda da bizim bu çalışmamızdaki bulgularla uyumlu gözlemler bildirilmiştir (33-35).

Sonuç olarak bu *in vitro* çalışmadan elde edilen veriler dopamin reseptör blokajının ya da endojen dopaminerjik tonusun düşürülmesinin striatal dilimlerde asetilkolin ve kolin metabolizmasını belirgin şekilde değiştirmede göstermektedir. Sulpirid ve etiklopirid ile uyarılmanın yol açtığı asetilkolin saliverilmesinin azaltılması D2 reseptör blokajının düzenlemede etkili olduğunu düşündürmekle beraber başka mekanizmalar da bu baskılanmada rol oynamış olabilir.

## Teşekkür

Bu makalede yer alan çalışmalar TUBİTAK'tan alınan proje (TAG-0774) desteği ile Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın gerçekleşmesindeki destekleri için hocam Prof. Dr. Burhan K. Kıran'a ve çalışmalarda teknik yardımları olan Dr. R. Levent Büyükuysal, Dr. Nezahat Kaya ve Ahmet Demirbilek'e teşekkür ederim.



## Kaynaklar

1. Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *TINS* 1995; 18: 527-535.
2. Catabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G. Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci* 2000; 23: 120-126.
3. Pollack AE. Anatomy, physiology, and pharmacology of the basal ganglia. *Neurol Clin* 2001; 19: 523-534.
4. Affii AK. The basal ganglia: a neural network with more than motor function. *Semin Pediatr Neurol* 2003; 10: 1-10.
5. Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P. Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: focus on metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 2003; 45: 45-56.
6. Calabresi P, Di Filippo M. ACh/dopamine crosstalk in motor control and reward: a crucial role for alpha 6-containing nicotinic receptors? *Neuron* 2008; 60: 4-7.
7. Tan CO, Bullock D. A dopamine-acetylcholine cascade: stimulating learned and lesion-induced behaviour of striatal cholinergic interneurons. *J Neurophysiol* 2008; 100: 2409-2421.
8. Salin P, Lopez IP, Kachidian P, Barroso-Chinea P, Rico AJ, Gomez-Bautista V, Coulon P, Kerkerian-Le GL, Lanciego JL. Changes to interneuron-driven striatal microcircuits in a rat model of Parkinson's disease. *Nurobiol Dis* 2009; 34: 545-552.
9. Cebrian C, Prensa L. Basal ganglia and thalamic input from neurons located within the ventral tier cell cluster region of the substantia nigra pars compacta in the rat. *J Comp Neurol* 2010; 518: 1283-1300.
10. Lester DB, Rogers TD, Blaha CD. Acetylcholine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther* 2010; 16:137-162.
11. Stoof JC, Keibanian JW. Independent in vitro regulation by the D-2 dopamine receptor of dopamine-stimulated efflux of cyclic AMP and K<sup>+</sup>-stimulated release of acetylcholine from rat striatum. *Brain Res* 1982; 250: 263-270.
12. Gorell JM, Czarnecki B. Pharmacological evidence for direct dopaminergic regulation of striatal acetylcholine release. *Life Sci* 1986; 38: 2239-2246.
13. Damsma G, de Boer P, Westerink BHC, Fibiger HC. Dopaminergic regulation of striatal cholinergic interneurons: an in vivo microdialysis study. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1990; 342: 523-527.
14. Drukarch B, Schepens E, Schoffelmeyer AN, Stoof JC. Stimulation of D-2 dopamine receptors decreases the evoked in vitro release of [<sup>3</sup>H]acetylcholine from rat neostriatum: role of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. *J Neurochem* 1989; 52: 1680-1685.
15. Ikarashi Y, Tkahashi A, Ishimaru H, Arai T, Maruyama Y. Regulation of dopamine D1 and D2 receptors on striatal acetylcholine release in rats. *Brain Res Bull* 1997; 43: 107-115.
16. Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Calabresi P, Bernardi G. Activation of D2-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 2000; 20: RC69 (1-6).
17. Ding Y-S, Logan J, Bermel R, Garza V, Rice O, Fowler JS, Volkow ND. Dopamine receptor-mediated regulation of striatal cholinergic activity: Positron emission tomography studies with norchloro[<sup>18</sup>F]fluoroepibatidine. *J Neurochem* 2000; 74: 1514-1521.
18. Acquas E, Di Chiara G. Role of dopamine D1 receptors in the control of striatal acetylcholine release by endogenous dopamine. *Neurol Sci* 2001; 22: 41-42.
19. Adachi YU, Watanabe K, Higushi H, Satoh T, Zsilla G. Halothane enhances acetylcholine release by decreasing dopaminergic activity in rat striatal slices. *Neurochem Int* 2002; 40: 189-193.
20. Rakovska A, Raichev JD, Ang R, Balla A, Aspromonte J, Vizi S. Physiological release of striatal acetylcholine (in vivo): effect of somatostatin on dopaminergic-cholinergic interaction. *Brain Res Bull* 2003; 61: 529-536.
21. Ulus IH. Dopamin reseptör agonisti maddelerin sıçan beyni striatal dilimlerinde kolin ve asetilkolin saliverilmesine, doku kolin, asetilkolin ve fosfolipid düzeylerine etkisi. *Acibadem Dergisi* 2010; 3: 145-158.
22. Ulus IH, Kiran BK. The effect of 6-hydroxydopamine on the tolerance development to the hyperthermic effect of (+)-amphetamine in rat. *J Pharm Pharmacol* 1975; 27: 205-206.
23. Ulus IH, Kiran BK, Ozkurt S. Involvement of central dopamine in the hyperthermia in rats produced by d-amphetamine. *Pharmacology* 1975; 13: 309-316.
24. Gilberstadt ML, Russell JA. Determination of picomole quantities of acetylcholine and choline in physiological salt solutions. *Anal Biochem* 1984; 138: 78-85.
25. Goldberg AM, McCaman RE. The determination of picomole amounts of acetylcholine in mammalian brain. *J Neurochem* 1973; 20: 1-8.
26. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
27. Ulus IH, Wurtman RJ, Mauron C, Blusztajn JK. Choline increases acetylcholine release and protects against the stimulation-induced decrease in phosphatide levels within membranes of rat corpus striatum. *Brain Res* 1989; 484: 217-227.
28. Buyukuysal RL, Wurtman RJ. 4-Aminopyridine increases acetylcholine release without diminishing membrane phosphatidylcholine. *J Neurochem* 1990; 54: 1302-1309.
29. Ulus IH, Buyukuysal RL, Wurtman RJ. N-Methyl-D-Aspartate increases acetylcholine release from rat striatum and cortex: Its effect is augmented by choline. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 261: 1122-1128.
30. Ulus IH, Watkins CJ, Cansev M, Wurtman RJ. Cytidine and uridine increase striatal CDP-choline levels without decreasing acetylcholine synthesis or release. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26: 563-577.
31. Martelle JL, Nader MA. A review of the discovery, pharmacological characterization, and behavioral effects of the dopamine D2-like receptor antagonist eticlopride. *CNS Neurosci Ther* 2008; 14: 248-262.
32. Wurtman RJ. Choline metabolism as a basis for the selective vulnerability of cholinergic neurons. *TINS* 1992; 15: 117-122.
33. MacKenzie RG, Stachowiak MK, Zigmond MJ. Dopamine inhibition of striatal acetylcholine release after 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol* 1989; 168: 43-52.
34. Löschmann PA, De Groote C, Albrecht C, Darstein M, Deransart C, Landwehrmeyer GB, Lücking CH, Feurstein TJ. [<sup>3</sup>H]acetylcholine release in rat striatal slices is not subject to dopamine heteroreceptor supersensitivity 30 months after 6-hydroxydopamine lesion of substantia nigra. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2001; 363: 414-421.
35. Fenu S, Acquas E, Di Chiara G. Role of striatal acetylcholine on dopamine D1 receptor agonist-induced turning behavior in 6-hydroxydopamine lesioned rats: a microdialysis-behavioral study. *Neurol Sci* 2001; 22: 63-64.