

# Elektrikle Uyarılmanın ve K<sup>+</sup> Depolarizasyonunun Sıçan Striatal Dilimlerinde Asetilkolin ve Kolin Salıverilmesine ve Doku Düzeylerine Etkisi

İsmail Hakkı Ulus

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji, İstanbul, Türkiye

## ÖZET

**Amaç:** Elektrikle ya da yüksek potasyumla uzun süreli uyarılmanın sıçan striatal beyin dilimlerinde asetilkolin ve kolin metabolizmasına etkilerini belirlemek.

**Yöntemler:** Striatal dilimler dinlenme durumunda, elektrikle uyarılarak ya da yüksek potasyumla depolarize edilerek 120-dakika perfüze edildi. Perfüze ortamında ve dokudaki asetilkolin ve kolin radioenzimatik yöntemle ölçüldü.

**Bulgular:** Dinlenme koşullarındaki dilimlerden ortama 376±20 pmol/mg protein/120 dakika asetilkolin ve 2375±85 pmol/mg protein/120 dakika kolin salıverildi. Uyarılma ile asetilkolin salıverilmesi 5-6 kat artarak elektrikle uyarılmada 2830±174 pmol/mg protein/120 dakika, potasyumla depolarizasyonda ise, 2360±85 pmol/mg protein/120 dakika düzeyine ulaştı. Kolin salıverilmesi elektrikle uyarımda değişmedi. Potasyumla depolarizasyonda ise, kolin çıkışı ilk 20 dakikalık dönemde %50 artmakla (p<0,01) beraber, 120 dakikalık dönemin toplamında %25 kadar azaldı (p<0,05). Bazal koşullarda perfüzyon ile doku asetilkolin ve kolin düzeyleri değişmedi. Elektrikle uyarılma doku kolin düzeyi değişmedi. Doku asetilkolin düzeyinde ise sınırlı (%20; 485±25 pmol, P<0,05) bir azalma oldu. Potasyumla depolarizasyonda dokudan asetilkolin kaybı (1800±85 pmol/mg protein) ve kolin kaybı (602±28 pmol/mg protein) daha yüksekti. Dinlenmede şartlarında tutulan, elektrikle uyarılan ya da potasyumla depolarize edilen dilimler 120 dakikalık sürede, sırayla, 390±21, 2345±165 (p<0,001) ya da 960±65 (p<0,001) pmol/mg protein asetilkolin ve 2335±170, 2203±95 ya da 1241±105 pmol/mg (p<0,001) kolin sentez etti. Toplam kolin oluşumu (asetilkolin+kolin) bazala göre elektrikle uyarılma ile %60 arttı (p<0,001). Potasyumla depolarizasyonda ise, %25 baskılandı (p<0,05).

**Sonuçlar:** Bu bulgular elektrikle ve yüksek potasyumla uyarılmanın striatal dilimlerde asetilkolin ve kolin metabolizmasını farklı bir şekilde etkilediğini göstermektedir. Elektrikle uyarılma asetilkolin sentez ve salıverilmesini ve dokuda kolin oluşumunu arttırmaktadır. Potasyumla depolarizasyonda ise asetilkolin sentez ve salıverilmesi artarken yeni kolin oluşumu baskılanmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** striatal dilimler, kolin, asetilkolin, elektrikli uyarılma, K<sup>+</sup> depolarization

## EFFECTS OF ELECTRICAL STIMULATION AND K<sup>+</sup> DEPOLARIZATION ON THE RELEASE AND CONTENTS OF ACETYLCHOLINE AND CHOLINE IN SUPERFUSED SLICES FROM RAT STRIATUM

### ABSTRACT

Effects of electrical stimulation and potassium depolarization on acetylcholine and choline release and synthesis in rat brain striatal slices

**Objective:** The aim of the study was to determine effects of electrical stimulation and potassium depolarization on acetylcholine and choline release and synthesis in rat brain striatal slices

**Methods:** Striatal slices from rat brain were perfused with physiological medium under basal and stimulated conditions, either with electrically or high potassium medium, for 120 min. Acetylcholine and choline contents of the perfusate and tissue were assayed radioenzymatically.

**Results:** Striatal slices released 376±20 pmol/mg protein/120 min acetylcholine and 2375±85 pmol/mg protein/120 min choline into the perfusate at rest. When sliced stimulated by high potassium or electrically, acetylcholine release into the perfusate were increased by 5-6 folds and reached to 2360±85 or 2830±174 pmol/mg protein/120 min, respectively. Choline release into perfusate was not change during electrical stimulation. During high potassium depolarization, choline release increased by 50% at first 20-min period but decreased by 25% during the whole of 120-min period. The tissue contents of acetylcholine, but not choline, decreased slightly (by 20%; p<0.05) during electrical stimulation. While during high potassium depolarization the tissue acetylcholine and choline contents were both decreased (p<0.001), by greater extend, by about 80% and 50%, respectively. Acetylcholine and choline synthesis were 391±21 and 2435±170 pmol/mg protein, 2345±165 and 2203±95 pmol/mg protein or 960±65 and 1241±105 pmol/mg protein at rest, during electrical stimulation or high potassium depolarization, respectively.

**Conclusion:** These data show that electrical stimulation and potassium depolarization have different effect on acetylcholine and choline synthesis and release in striatal slices. Electrical stimulation enhances synthesis and release of acetylcholine and choline, while stimulation with high potassium results with increase in acetylcholine synthesis and release and decline in choline release and production.

**Key words:** striatal slices, acetylcholine, choline, electrical stimulation, K<sup>+</sup> depolarization

## Giriş

Beyin dilimleri tekniği tarif edildiğinden (1) beri, 50 yılı aşkın bir süredir, biyokimyasal, nörokimyasal, nörofizyolojik, nöroanatomik ve nörofarmakolojik çalışmalarda kullanılmıştır ve günümüzde de hala yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (1-5). Nörofarmakoloji bakımından ele alındığında beyin dilimleri yöntemi araştırmacılara ilaçların nörotransmitter sistemlerine fizyolojik ve nörokimyasal etkilerini incelemede geniş imkânlar sağlamaktadır. İlaçlar perfüzyon ortamına fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonlarda eklenebildiğinden konsantrasyon yanıt ilişkileri, reseptör ve reseptör üzerinden olmayan etkiler, agonist, antagonist etkileşimleri gibi klasik farmakoloji çalışmaları kolaylıkla ve güvenilir bir şekilde yürütülebilmektedir. Beyin dilimleri dinlenme koşullarında tutulabilmekte ya da uyarılarak ilaç etkileri bu koşullarda denenebilmektedir.

Beyin dilimleri tekniği laboratuvarımızda da uzun bir süredir kullanılmakta olup ağırlıklı olarak sıçan striatal, kortikal ve hippokampal dilimlerinde perfüzyon koşullarının (uzun süreli uyarılma gibi) ve ilaçların kolinerjik mekanizmalara, asetilkolin ve kolin metabolizmasına etkileri incelenmektedir (6-11). Bu çalışmalar sırasında elektriklerle uyarılan dilimlerde nörotransmitter asetilkolin salıverilmesinin sabite yakın bir şekilde sınırlı azalmalarla sürdürüldüğü (7,11), potasyumla uyarılmada ise asetilkolin salıverilmesinin başlangıçtaki düzeyde sürdürülemediği (10, 11) ve dokudan da asetilkolin kaybı olduğu gözlenilmiştir. Perfüzyon ortamına dışardan kolin eklenmesi ile elektriklerle ve yüksek potasyumla uyarılmanın neden olduğu asetilkolin salıverilmesinin belirgin bir şekilde arttığı (7,11, 12), potasyumla uyarılan dilimlerde asetilkolin salıverilmesindeki ve doku düzeyindeki azalmaların kolin tarafından önlediği saptanmıştır (10). Elektrikle uzun süreli uyarılan striatal dilimlerin asetilkolin sentezi ve salıverilmesinin sürdürülmesinin membran fosfolipidlerinden yeni serbest kolin oluşması ile bağlantılı olduğu ve bu koşullarda membran yıkımının ortaya çıktığı anlaşılmıştır (7,12). Nitekim dışardan kolin eklenmesi elektrikle uyarılmanın neden olduğu asetilkolin sentez ve salıverilmesini artırırken membran yıkımını da önlemektedir (7). Yüksek potasyumla uyarılma koşullarında asetilkolin salıverilme hızının ve doku düzeyinin uzun süreli korunması bu koşullarda membran fosfolipidlerinden yeni kolin molekül oluşumun elektrikle uyarılmaya göre daha yavaş olması ya da bu fenomenin yüksek potasyumla önlenmesi ile ilgili olabilir. Ancak bu olasılıklar daha önceki çalışmalarda detaylı bir şekilde incelenmemiştir.

Bu çalışmada yukarıda açıklanan bulguların ışığında elektrikle uyarılmanın ve yüksek potasyumla depolarizasyonun asetilkolin ve kolin metabolizmasına etkileri sıçan striatal dilimlerinde incelenmiştir. Esas olarak dilimler 120 dakika süreyle kesintisiz olarak ya elektrikle ya da yüksek potasyumla uyarılmışlar ve süre içinde; 1. Perfüzata salıverilen asetilkolin ve kolin, 2. Dokudan kaybedilen asetilkolin ve kolin ve 3. Doku tarafından sentez edilen yeni asetilkolin ve kolin miktarları belirlenmiştir. Bulgularımız striatal beyin dilimlerinde fosfolipidlerin yıkımı ile yeni kolin oluşumun elektrikle uyarılmada arttığını yüksek potasyumla depolarizasyonda ise azaldığını göstermektedir.

## Yöntem ve gereçler

### Deney hayvanı

Çalışmada 300-350 g ağırlığında erişkin erkek Sprague-Dawley sıçanlar (Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi, Bursa) kullanıldı. Sıçanlar 4-5 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.

### Striatal beyin dilimlerin hazırlanması

Sıçanlar beyin dilimleri daha önce tarif edildiği şekilde hazırlandı (11). Takiben 7-8 dilim bir perfüzyon odacığında olacak şekilde 37 °C'deki metabolik su banyosundaki 3 odacıklı perfüzyon sistemine alındı. Dilimler bu perfüzyon sisteminde %95 O<sub>2</sub> + %5 CO<sub>2</sub> gaz karışımı ile devamlı olarak havalandırılan Krebs 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, D-Glükoz, 10 ve fizostigmin, 0,02] ile 0,6 ml/dakika hızla 8 kanallı peristaltik pompa aracılığı ile 60 dakika süre ile denge ve toparlanma için süperperfüze edildi. Bu denge perüzyonu sırasında 40.-60. dakika arasındaki dönemde perfüze örnekleri kolin ve asetilkolin ölçümü için toplandı.

### Perfüzyon koşulları

Denge dönemi sonrası her üç perfüzyon odacığından 2 dilim "başlangıç doku örneği" olarak alındı. Takiben üç farklı perfüzyon odacığındaki striatal dilimler 3 farklı deneysel koşul altında ikinci bir 120 dakikalık dönem daha perfüze edildi. Birinci perfüzyon çemberindeki dilimler denge döneminde olduğu gibi bileşimi yukarıda belirtilen Krebs solüsyonu ile perfüze edildiler ("bazal koşullar"). İkinci perfüzyon çemberindeki dilimler ise yine aynı bileşimdeki Krebs solüsyonu ile perfüze edildi. Ancak bu dilimler 120 dakikalık süre boyunca sürekli elektrikle (15 Hz, 80 mA, 30 mV, 1 ms) uyarıldı ("elektrikle uyarılma"). Uyarılma için

perfüzyon odacıklarının zemininde ve kapağına yerleşik Ag/AgCl<sub>2</sub> elektroler ve "Grass 88" model stimülatör kullanıldı. Üçüncü perfüzyon odacığındaki dilimler ise potasyumu yükseltilmiş (50 mM) Krebs solüsyonu ile perfüze edildiler ("yüksek potasyumla depolarizasyon"). Bu Krebs solüsyonunda izotonisitesini muhafaza etmek için arttırılan potasyum iyonu kadar sodyum iyonu azaltılmıştır. Buna göre normal Krebs solüsyonundaki 3,5 mM olan K<sup>+</sup> 46,5 mM daha arttırılarak 50 mM çıkarılmış, 120 mM olan Na<sup>+</sup> konsantrasyonu ise, 46,5 mM daha azaltılarak 72,5 mM düzeyine indirilmiştir. Bu değişiklikler dışında Krebs solüsyonun geri kalan içeriği aynen muhafaza edilmiştir. Bu 120 dakikalık üç farklı deneysel koşulda (bazal, elektrikle uyarılma ve yüksek potasyumla depolarizasyon) perfüzyon boyunca 20-dakikalık dönemler halinde 6 ardışık perfüze örneği asetilkolin ve kolin içeriklerinin ölçülmesi için toplanmıştır. Deneyin sonunda dilimler perfüzyon çemberlerinden alınmış ("son doku örneği").ve asetilkolin, kolin içerikleri ve protein düzeyleri ölçümü yapılmıştır.

#### Perfüzattan asetilkolin ve kolin ölçümü

Her biri 20 dakikalık döneme ait 7 perfüze örneğinden bulunan asetilkolin ve kolin silisik asit kolon tekniği (12) kullanılarak daha önce tarif edildiği gibi (7, 11) silisik asit (Bio-Sil, Bio-Rad firması, CA, ABD) kolonları ile ekstrakte edildi. Kolin ve asetilkolin içeren asidik kolon süzüntüleri cam tüpler (12x75 mm) içinde toplandı ve vakum santrifüjünde kurutuldu. Kurutulmuş örneklerdeki kolin ve asetilkolin miktarları radioenzimatik yöntemle (13), daha önce anlatıldığı şekilde (7, 11), ölçüldü. Kolin ve asetilkolin standartları tüm aşamalarda (ekstraksiyon, kurutma ve enzimatik reaksiyonlar) örneklerle beraber yani işleme tabi tutuldular. Standartlara karşı elde edilen radyoaktiviteden yararlanarak örneklerdeki kolin ve asetilkolin miktarları belirlendi. Değerler dilimlerdeki proteine göre düzeltildi.

#### Doku kolin, asetilkolin ve protein miktarı ölçümü

Perfüzyonun başında uyarılmaya geçilmeden önce ve perfüzyon döneminin sonunda dilimler perfüzyon odacıklarından alındı. Dilimler 2-3 kez 0,02 mM fizostigmin içeren soğuk distile su ile yıkandılar. Takiben 1 ml soğutulmuş su içinde cam-teflon doku öğütücüsü ile homojenize edildiler. Doku homojenatında 0,2 ml, soğutulmuş 1 ml metil alkol ile karıştırıldı ve vortekle karıştırıldı. Takiben bunun üzerine sıra ile 2 ml kloroform ve 0,8 ml soğuk distile su eklendi. Karışım güçlü bir şekilde vortekslenildi. Karışım 4-6 saat kadar buzdolabında tutuldu. Karışım 10 dakika süreyle santrifüje edilerek (3000 g, 4 °C) iki faz oluşması sağlandı. Üstteki sulu fazdan 0,4 ml alınarak vakum altında kurutuldu. Kurutulmuş örneklerdeki kolin ve

asetilkolin, yukarıda perfüzetler için tarif edildi, ölçümleri yapıldı. Değerler doku protein düzeyine göre düzeltildi.

Doku homojenatlarından protein ölçümü fotometrik yöntemle (14) daha önce tarif edildiği şekilde (7, 11) yapıldı. Standart için sığır serum albumin solüsyonu (1 mg/ml) kullanıldı

#### İstatistik

Hesaplamalarda ve istatistik değerlendirmelerde "Pharmacological Calculations, Version 2" ve "Sigmastat, Version 11" bilgisayar yazılımları kullanılmıştır. Değerler, aksi belirtilmedikçe, ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası (SH) olarak verilmiştir. Ortalamalar arası farkların istatistiki olarak karşılaştırılmasında tek yönlü varians analizi (ANOVA) ve Tukey testi kullanılmıştır. Aynı dilimlerden ardışık olarak toplanan perfüzetlerdeki asetilkolin ve kolin düzey değişimlerinin karşılaştırılmasında ise tekrarlanan ölçümlü tek yönlü ANOVA ve Tukey testi kullanılmıştır. Doku kolin ve asetilkolin düzeylerinde değişimlerde eşleştirilmiş (paired) t-testi kullanılmıştır. P değeri 0,05'den daha küçük olduğunda farkın anlamlı olduğu kabul edilmiştir.

#### Sonuçlar

##### Striatal dilimlerden bazal ve uyarılma koşullarında asetilkolin saliverilmesi

Denge periyodunun sonunda 40.-60. dakikalar arasındaki 20-dakikalık dönemde dilimlerden ortama saliverilen asetilkolin miktarı  $72 \pm 2$  pmol/mg/protein (n = 18) ve kadardı. Bazal koşullarda perfüzyon 120 dakika daha sürdürüldüğünde asetilkolin saliverilmesi 20-dakikalık periyotlarda değişmeden [F (6,35) = 1,98; p = 0,331] sabite yakın şekilde devam etti (Şekil 1A).

Dilimlerin elektrikle uyarılması ortama saliverilen asetilkolin düzeyini 6-10 kat kadar arttırdı (Şekil 1A) ve ilk 20-dakikalık uyarılma döneminde asetilkolin çıkışını  $565 \pm 28$  pmol/mg protein/20 dakika düzeyine yükseltti (Şekil 1A). Uyarılma devam ettikçe asetilkolin saliverilmesi zamanla azaldı [F(5,30) = 7,53; p<0,001] ve son 20-dakikalık uyarılma döneminde  $308 \pm 24$  pmol/mg protein/20 dakika düzeyine kadar düştü. Ancak, 20-dakikalık uyarılma dönemlerinin tümünde de asetilkolin çıkışı bazala göre istatistik olarak anlamlı [F(6,35) = 21,08; p<0,001] bir şekilde yüksek seyretti (Şekil 1 A).

Yüksek potasyumla perfüzyon ortamına geçiş ile dilimlerden asetilkolin saliverilmesi 15 kat kadar  $1239 \pm 170$  pmol/mg protein/20 dakika (n = 6) düzeyine çıktı (Şekil

1A). Yüksek potasyumla perfüzyonun devamında ise, asetilkolin çıkışı hızlı ve anlamlı [ $F(5,30) = 11,27$ ;  $p < 0,001$ ] bir şekilde azaldı (Şekil 1A) ve son 20-dakikalık dönemde  $185 \pm 32$  pmol/mg/20 dakika düzeyine indi. Bu düşmeye karşın yüksek potasyumla depolarizasyonun sürdüğü 20-dakikalık 6 dönemin hepsinde asetilkolin çıkışı bazala göre anlamlı [ $F(6,35) = 12,63$ ;  $p < 0,001$ ] olarak yüksek düzeyde kaldı (Şekil 1A).

Şekil 1A'da da açık şekilde görüldüğü üzere striatal dilimlerden elektrikle uyarılma ve yüksek potasyumla depolarizasyona karşı asetilkolin saliverilme patterni çok farklıydı. İlk dönemde yüksek potasyumla depolarizasyonun yol açtığı asetilkolin çıkışı elektrikle olanın iki katından daha yüksekti ( $p < 0,001$ ). İkinci dönemde her iki uyarılma ile saliverilen asetilkolin miktarı eşitlendi ve sonraki dönemlerde (4.-7. dönemler) ise potasyum depolarizasyonu ile asetilkolin çıkışı elektrikle uyarılmadan daha düşüktü (Şekil 1A).

#### *Striatal dilimlerden bazal ve uyarılma koşullarında kolin saliverilmesi*

Denge periyodunun sonunda (1. dönem) dilimlerden kolin çıkış hızı  $468 \pm 11$  pmol/mg protein/20 dakika ( $n = 18$ ) kadardı. Bazal koşullarda perfüzyon sürdürüldüğünde perfüzata kolin çıkışı zamanla azaldı [ $F(6,35) = 116,9$ ,  $p < 0,001$ ] ve son 20-dakikalık dönemde  $320 \pm 15$  pmol/mg protein/20 dakika ( $n = 6$ ) düzeyine düştü (Şekil 1B).

Elektriksel uyarılma kolin saliverilmesini değiştirmede ve kolin çıkışı, bazal koşullardaki gibi tedrici olarak azaldı [ $F(6,35) = 6,39$ ;  $p < 0,001$ ] (Şekil 1B).

Potasyum depolarizasyonun ilk 20-dakikalık döneminde kolin çıkışı anlamlı ölçüde arttı ve  $675 \pm 40$  pmol/mg protein/20 dakika düzeyine yükseldi ( $p < 0,01$ ). Potasyumla perfüzyonun devamında ise kolin çıkışı hızlı bir şekilde düştü [ $F(5,30) = 41,71$ ;  $p < 0,001$ ] (Şekil 1B).

Potasyumla depolarizasyonda kolin çıkışı 2. dönemde bazal koşullarda tutulan ve elektrikle uyarılmaya dilimlere göre daha yüksek ( $p < 0,05$ ), 4.-7. dönemlerde ise daha düşük ( $p < 0,05$ ) oldu.

#### *Striatal dilimlerden bazal ve uyarılma koşullarında asetilkolin+kolin saliverilmesi*

Şekil 1C'de bazal koşullarda, elektrikle uyarılma ve yüksek potasyumla depolarizasyon koşullarında ortama çıkan asetilkolin ve kolin toplamının değişik dönemlerdeki durumu ve değişimi gösterilmektedir. Elektrikle uyarılan dilimlerde ortama çıkan asetilkolin ve kolin toplamı

uyarılma boyunca bazaldan daha yüksek olarak seyretmektedir (Şekil 1C). Potasyumla depolarize edilen dilimlerde ise asetilkolin+kolin çıkışı 2. ve 3. dönemlerde anlamlı olarak yüksek iken, 4.-7. dönemlerde bazal düzeyde inmektedir (Şekil 1C). Elektrikle ve yüksek potasyumla uyarılma karşılaştırıldığında ise yüksek potasyumla depolarize edilen dilimlerde asetilkolin+kolin çıkışı ilk dönemde (2. dönem) elektrikle uyarılmadan yüksek ( $p < 0,001$ ), 3. dönemde benzer ve 4., 5., 6. ve 7. dönemlerde ise daha düşük ( $p < 0,05$ ) oldu (Şekil 1A).

#### *Striatal dilimlerde bazal ve uyarılma koşullarında asetilkolin düzeyi değişimi*

Şekil 2A'da bazal koşullarda perfüze edilen, elektrikle uyarılan ya da yüksek potasyumla depolarize edilen dilimlerde doku asetilkolin düzeyleri değişimi gösterilmiştir. Bazal koşullarda 120-dakika perfüze edilen dilimlerde doku asetilkolin düzeyi değişmeden kalırken, elektrikle uyarılan dilimlerde %20 ( $p < 0,05$ ; paired t-test), potasyumla uyarılanlarda ise %80 ( $p < 0,001$ ; paired-test) kadar azalmaktadır (Şekil 2A). Yüksek potasyumla depolarizasyon sonrası doku asetilkolin düzeyi hem bazal koşullarda perfüze edilen ve hem de elektrikle uyarılan dilimlerdeki asetilkolin düzeylerinden belirgin şekilde ve istatistik olarak anlamlı derece [ $F(2,15) = 50,18$ ;  $p < 0,001$ ] düşük bulundu (Şekil 2A).

#### *Striatal dilimlerde bazal ve uyarılma koşullarında kolin düzeyi değişimi*

Bazal koşullarda ya da elektrikle 120 uyarılarak perfüze edilen dilimlerde doku kolin düzeyleri değişmedi (Şekil 2B). Buna karşın, yüksek potasyumla depolarize edilen dilimlerde doku kolin düzeyi yarı yarıya azaldı (Şekil 2B). Yüksek potasyumla depolarizasyon sonrası doku kolin düzeyi hem bazal koşullarda perfüze edilen ve hem de elektrikle uyarılan dilimlerdeki doku kolin düzeylerinden istatistik olarak anlamlı derece [ $F(2,15) = 7,07$ ;  $p < 0,01$ ] düşük bulundu (Şekil 2B).

#### *Striatal dilimlerde bazal ve uyarılma koşullarında asetilkolin+kolin düzeyi değişimi*

Şekil 2C'de bazal koşullarda perfüze edilen, elektrikle uyarılan ya da yüksek potasyumla depolarize edilen dilimlerde doku asetilkolin+kolin düzeyleri değişimi gösterilmiştir. Bazal koşullarda perfüze edilen ya da elektrikle uyarılan dilimlerde doku asetilkolin+kolin düzeyi anlamlı olarak değişmeden kalırken, potasyumla uyarılanlarda %70 kadar azaldı ( $p < 0,001$ ; paired-test). Yüksek potasyumla depolarizasyon sonrası doku asetilkolin+kolin düzeyi hem bazal koşullarda perfüze edilen ve hem de

**Tablo 1.** Dinlenme ve uyarılma koşullarında striatal dilimlerde dokudan asetilkolin ve kolin kaybı, perfüzatta asetilkolin ve kolin birikimi ve dokuda yeni asetilkolin ve kolin oluşması

<i>Parametre/ Perfüzyon koşulu</i>	<i>Dokudan eksilene (pmol/mg protein/120 d)</i>	<i>Perfüzatta birikenb (pmol/mg protein/120 d)</i>	<i>Dokuda yeni oluşanc (pmol/mg protein/120 d)</i>
<b>Asetilkolin</b>			
Bazal	-17 ± 6	376 ± 20	390 ± 21
Elektrikle uyarılma	485 ± 25*	2830 ± 174*	2345 ± 165*
Potasyumla uyarılma	1800 ± 85*#	2345 ± 165*#	960 ± 65*#
<b>Kolin</b>			
Bazal	-60 ± 12	2375 ± 85	2435 ± 170
Elektrikle uyarılma	157 ± 18*	2360 ± 85	2203 ± 95
Potasyumla uyarılma	602 ± 28*#	1850 ± 125*#	1241 ± 105*#
<b>Asetilkolin + Kolin</b>			
Bazal	-80 ± 35	2750 ± 115	2830 ± 170
Elektrikle uyarılma	645 ± 35*	5190 ± 195*	4545 ± 105*
Potasyumla uyarılma	2400 ± 92*#	4610 ± 205*#	2200 ± 125*#

Striatal dilimler Şekil 1'in altında açıklandığı gibi 3 farklı koşul altında 120 dakika perfüze edilmiştir. Asetilkolin ve kolin içeriklerini ölçmek için perfüzyon başlangıcında ve sonunda doku örnekleri alınmış ve 120 dakika boyunca perfüze toplanmıştır. Değerler doku protein içeriğine göre düzeltilmiştir ve ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir (N = 6). <sup>a</sup>Dokudan eksilen = 120 dakikalık perfüzyonun başında ve sonunda alınan doku örneklerindeki bulunan düzeyler arasındaki farkı göstermektedir. Negatif (-) işareti ile belirtilen rakamlar dokuda o miktarda bir artışı ifade etmektedir. <sup>b</sup>Perfüzatta biriken = 120 dakika süresince perfüzata salınan ve perfüzatta ölçülen toplam miktarı göstermektedir. <sup>c</sup>Dokuda yeni oluşan = Perfüzatta biriken miktardan, dokudan eksilen miktar çıkarılarak hesaplanmıştır. Diğer bir ifade ile "dokuda yeni oluşan miktar" = Perfüzatta biriken-dokuda eksilen formülüne göre hesaplanmıştır. \*p<0,05-0,001 uygun "bazal" değeri ile karşılaştırıldığında; #p<0,05-0,001 uygun "elektrikle uyarılma" değeri ile karşılaştırıldığında.

elektrikle uyarılan dilimlerdeki asetilkolin+kolin düzeylerinden belirgin şekilde [F (2,15) = 59,05; p<0,001] düşüktü (Şekil 2C).

#### *Striatal dilimlerde asetilkolin sentezi ve kolin üretimi*

İki saatlik (120 dakika) dönem sonrası striatal dilimlerden kaybedilen ve toplanan perfüzatta biriken asetilkolin, kolin ve asetilkolin+kolin miktarları arasındaki farklara dayanarak dilimlerde bu 120-dakikalık dönemde yeni sentez edilen asetilkolin ve üretilen kolin miktarları hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Her 3 farklı koşulda da perfüzatta yakalanan toplam asetilkolin, kolin ve asetilkolin+kolin miktarları aynı dönemde dokudan kaybedilen miktarlardan çok daha yüksek olmuştur (Tablo 1). Uyarılma ile asetilkolin sentezi anlamlı şekilde artmaktadır [F(2,15) = 95,09; p<0,001]. Elektrikle uyarılan dilimlerde asetilkolin sentezi bazalın 5,5 katı (p<0,001), potasyumla depolarize edilen dilimlere göre ise 2,5 kat kadar (p<0,01) daha yüksek bulunmuştur (Tablo 1). Potasyumla depolarize edilen dilimlerde asetilkolin sentezi bazalın 2,5 katı (p<0,001) kadar olmuştur (Tablo 1).

Kolin değerleri incelendiğinde de perfüzattaki serbest kolin miktarı dokuda kaybedilenden yüksektir. Bazal koşullarda perfüze edilen dilimlerde perfüzattaki kolinin tamamı (2435 ± 170 pmol/mg protein 120 dakika), elektrikle uyarılan dilimlerde perfüzattaki kolinin %90 kadarı (2200 ± 75 pmol/mg protein 120 dakika), yüksek potasyumla depolarize edilen dilimlerde ise perfüzattaki serbest kolinin %70 kadarı (1240 ± 105 pmol/mg protein/120 dakika) 120 dakikalık perfüzyon dönemi içinde oluşmaktadır. Bu üç farklı koşul altında kolin oluşma hızı istatistiksel olarak farklı olup [F(2,15) = 26,40; p<0,001] potasyumla depolarizasyon sırasında kolin oluşması, bazala ve elektrikle uyarılmaya göre, yarı yarıya azalmaktadır (Tablo 1) (p<0,001).

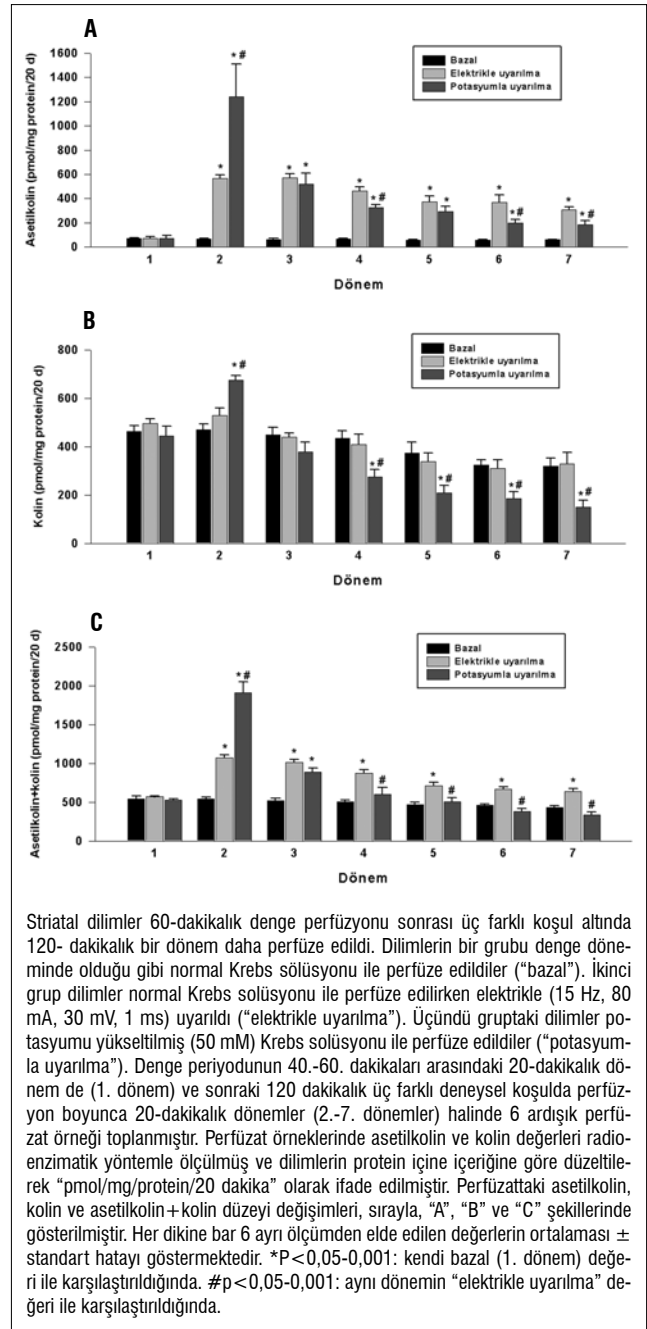
Toplam kolin (asetilkolin+serbest kolin) sentezi dikkate alındığında da bu üç farklı perfüzyon koşulunda çok belirgin fark [F(2,15) = 79,54; p<0,001] olduğu görülmektedir (Tablo1). Toplam kolin oluşması yüksek potasyumla depolarizasyonda %25 kadar azalmakta (p<0,05), elektrikle uyarılmada ise %60 kadar artmaktadır (p<0,001). Yüksek potasyumlu dilimlerde oluşan toplam kolin miktarı (2200 ± 125 pmol/mg protein/120 dakika) elektrikle uyarılan dilimlerdekinin (4545 ± 165 pmol/mg protein/60 dakika) yaklaşık yarısı kadardı (p<0,001).



## Tartışma

Bu bulgular striatal dilimlerde asetilkolin ve kolin metabolizmasının elektrikle uyarılma ve potasyumla depolarizasyon sırasında çok farklı şekilde etkilendiğini göstermektedir. Elektrikle uyarılma dilimlerden perfüze edilen asetilkolin ve asetilkolin+kolin miktarını arttırmakta, serbest kolin saliverilmesi ise değiştirmemektedir. Yüksek potasyumla depolarizasyon koşullarında ise perfüze edilen asetilkolin miktarı artarken, serbest kolin ve kolin+asetilkolin miktarı azalmaktadır. Elektrikle uyarılan dilimlerde doku asetilkolin ve serbest kolin düzeyleri sınırlı bir azalma ile muhafaza edilebilmektedir. Potasyumla depolarize edilen dilimlerde ise doku asetilkolin ve kolin düzeyleri ileri derecede azalmaktadır. Elektrikle uyarılma dokudan asetilkolin sentezi ve yeni kolin oluşumu artmaktadır. Yüksek potasyumla uyarılma sırasında ise asetilkolin sentezi hızlanmakta yeni kolin oluşumu ise baskılanmaktadır.

Gerek elektrikle uyarılma ve gerekse yüksek potasyumla depolarizasyon sonucu striatal dilimlerden perfüze edilen asetilkolin saliverilmesi artması beklenen bir durumdur ve daha önceki kendi çalışmalarımızla da uyumludur (7, 8, 10, 11). İki saatlik uyarılma döneminde ortama saliverilen asetilkolin miktarının benzer oluşu elektrikle ya da yüksek potasyumla uyarılma şiddetinin benzer olduğunu göstermektedir. Ancak asetilkolin saliverilmesi 20-dakikalık dönemler incelendiğinde (Şekil 1) iki tür uyarılmaya verilen saliverilme yanıtının çok farklı olduğu görülmektedir. Elektrikle uyarılmada ilk 20-dakika uyarılma döneminde ortaya çıkan asetilkolin saliverilmesi sonraki dönemlerde sınırlı oranlardaki (%6-9 gibi) azalmalarla sürdürülmüştür (Şekil 1A). Buna karşın yüksek potasyumla depolarize edilen dilimlerden ilk 20-dakikalık uyarılma döneminde aşırı bir saliverilme, sonraki dönemlerde ise çok daha sınırlı bir saliverilme gerçekleşmiştir (Şekil 1A). Yüksek potasyumla depolarizasyonda ortama saliverilen aynı miktarda asetilkoline karşı doku asetilkolin düzeyinde elektrikle uyarılmaya göre daha belirgin bir düşme (aşağıda tartışılmıştır) olmuştur. Bu bulgular yüksek potasyumla depolarizasyonda saliverilen asetilkolinin, esas olarak, dokuda önceden mevcut depolanmış asetilkolinin farklı mekanizmalarla saliverilmesinden (15, 16) kaynaklandığını düşündürmektedir. İlk uyarılma döneminde dokudaki mevcut asetilkolin büyük kısmını salivermekte ve bu dönemde aşırı (bazalın 15-20 katı kadar bir saliverilme gerçekleşmektedir (Şekil 1A). Dokudaki mevcut asetilkolin deposu boşaldıkça sonraki uyarılarda asetilkolin saliverilmesi de bu boşalmaya paralel şekilde azalmaktadır (Şekil 1A). Bilinmektedir beyin dilimlerindeki yeni asetilkolin sentezi



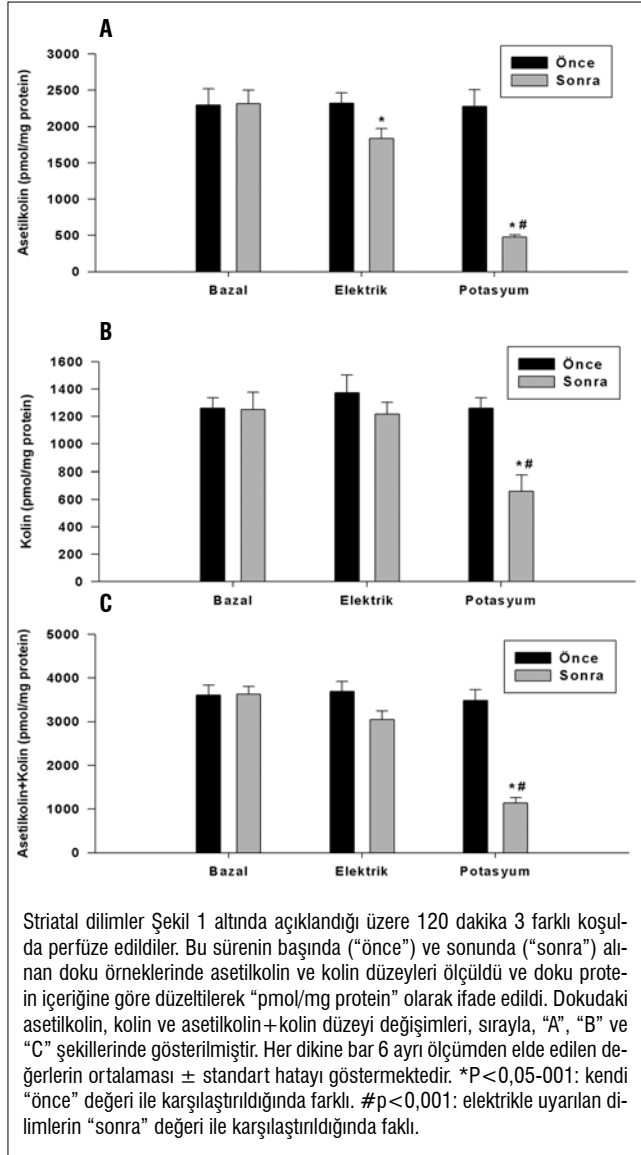
**Şekil 1.** Striatal dilimlerde elektrikle ve yüksek potasyumla uyarılmanın yol açtığı asetilkolin ve kolin saliverilme yanıtı.

hızı serbest kolin elde edilebilirliğine bağlıdır (7, 8, 10, 17-22) ve dışardan kolin verilmediğinde beyin dilimlerinden fosfolipid yıkımı ile oluşan yeni kolini kullanmaktadır (7). Fosfolipidlerden oluşan kolin miktarının potasyumla uyarılmada asetilkolin çıkışını başlangıçtaki düzeyde tutmada yetersiz kalmaktadır (Şekil 1A). Beyin dilimlerinde yapılan önceki çalışmalarda dışardan kolin verilmesinin potasyumla depolarizasyonda asetilkolin saliverilmesini artırdığı (10, 17-18) ve uyarılma devamındaki asetilkolin

saliverilmesindeki azalmalardan büyük oranda koruduğu gösterilmiştir (10). Elektrikle uyarımda ise, fosfolipidlerden oluşan kolin miktarı daha fazla olduğundan (aşağıda tartışılacaktır) uyarılmanın neden olduğu asetilkolin saliverilmesi ya aynen (7, 20) ya da çok daha sınırlı düşmelerle sürdürebilmektedir (Şekil 1A).

Striatal dilimlerden serbest kolin saliverilmesi de, asetilkolin saliverilmesinde olduğu gibi, elektrikle uyarımda ve yüksek potasyumla depolarizasyonda farklı şekilde etkilenmektedir. Daha önce de gösterildiği (7, 20) gibi kolin saliverilmesi elektrikle uyarılma ile değişmemektedir (7, 20). Potasyumla uyarımda ise, başlangıçta anlamlı düzeyde artmakta uyarılma sürdürüldüğünde daha sonraki dönemlerde azalmakta (11) ve bazaldaki ve elektrikle uyarılmadakinin yarısına kadar düşmektedir (Şekil 1C). Striatal dilimlerden perfüzata saliverilen kolin esas olarak dokuda zaten mevcut serbest kolinden ve perfüzyon sırasında membran fosfolipidlerinden kaynaklanmaktadır (6, 7, 20-23). Bu çalışmada elektrikle uyarımda doku kolin düzeyi değişmeden kalmış, potasyumla depolarizasyonda ise dokuda kolin düzeyi uyarı öncesinin yarısına düşmüştür (Şekil 2B). Bu bulgular beraber dikkate alındığında elektrikle uyarılma sırasında fosfolipidlerden kolin oluşumunun kolinin hem doku düzeyini muhafaza etmeye ve hem de perfüzyon ortamına bazal koşullardaki kadar bir serbest kolin saliverilmesine yettiğini, yüksek potasyumla depolarizasyonda ise kolin oluşum hızının doku ve perfüzattaki serbest kolin düzeyini korumakta yetersiz kaldığını göstermektedir.

İki saatlik perfüzyon dönemi içinde perfüzatta biriken asetilkolin ve kolinin dokuda başlangıçta bulunandan daha fazla olması, ve dokuda bu 120-dakikalık dönemin sonunda hala asetilkolin ve kolin kalması bu dönemde asetilkolin sentezinin ve dokuda yeni serbest kolin oluşumunun devam ettiğini göstermektedir. Asetilkolin sentezi dikkate alındığında yeni asetilkolin sentezinin en yüksek oranda elektrikle uyarılan dilimlerde, en düşük oranda ise bazal koşullarda perfüze edilen dilimlerde olduğu görülmektedir (Tablo 1). Potasyumla uyarılan dilimlerde ise asetilkolin sentezi bazaldakinin 2,5 katı oranında, elektrikle uyarılan dilimlerdekinin ise ancak yarısı kadar olmuştur. Kolin oluşumu serbest kolinin doku düzeyi ve perfüzattaki miktarları dikkate alınarak hesaplanır ise bazal koşullarda tutulan dilimlerle elektrikle uyarılan dilimlerde yeni serbest kolin oluşumu benzer miktarda gerçekleşmiştir. Potasyumla uyarılan dilimlerde ise, yeni oluşan serbest kolin miktarı bazalın ancak yarısı kadar gerçekleşmiştir (Tablo 1). Fosfolipidlerden oluşan yeni serbest kolinin bir kısmının dokuda asetilkoline dönüşür (6-11, 17-28). Oluşan toplam



Şekil 2. Striatal dilimlerde elektrikle ve yüksek potasyumla uyarılmanın doku asetilkolin ve kolin düzeylerinde yol açtığı değişim.

kolin miktarını belirlerken yeni sentezlenen asetilkolin'i de hesaba katmak gerekir. Bu husus dikkate alındığında ise, elektrikle uyarılan dilimlerde toplam oluşan yeni kolinin bazaldan 1,6 kat, potasyumla depolarizasyondan ise 2 kat kadar daha yüksektir. Potasyumla depolarize dilimlerde yeni oluşan kolin miktarı bazaldan da anlamlı olarak, %25 kadar daha düşüktür. Bu bulgular topluca dikkate alındığında elektrikle uyarılmanın fosfolipidlerden kolin oluşumunu arttırdığı yüksek potasyumla uyarımda ise kolin oluşumunun baskılandığını söylemek mümkündür. Bu görüş, *in vivo* beyin mikrodializ çalışmalarında yüksek potasyumla ekstrasellüler ortamda serbest kolin düzeyinin düşmesi bulgusu (24) ile de desteklenmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen bulgular sıçan striatal dilimlerinde iki farklı uyarılma koşullarında asetilkolin ve kolin metabolizmasının farklı şekilde etkilendiği gösterilmiştir. Elektrikle uyarılma asetilkolin sentez ve saliverilmesi artmaktadır. Elektrikle uyarılma dokuda fosfolipidlerden yeni kolin oluşumunu da artırmakta ve bu yolla kolinergik nöronlarda asetilkolin sentez ve saliverilmesi sürdürülebilmektedir. Potasyumla depolarisasyonda da asetilkolin sentez ve saliverilmesi uyarılmaktadır. Ancak bu koşullarda saliverilen asetilkolinin önemli bir kısmı dokuda mevcut

hazır asetilkolinden kaynaklanmakta ve uyarılma dokudan önemli bir kayıpla sonlanmaktadır. Kolin oluşumu ise potasyumla depolarizasyonda baskılanmaktadır. Oluşan kolin dokuda uyarılmanın yol açtığı asetilkolin saliverilmesini başlangıçtaki düzeyde tutmaya ve doku asetilkolin ve kolin düzeyini sürdürmede yetersiz kalmaktadır.

## Teşekkür

Bu makalede yer alan çalışmalar esas olarak Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı'nda ve Massachusetts Institute of Technology, Department of Brain and Cognitive Science, Laboratory of Neuroendocrine Regulation'da gerçekleştirilmiştir. İzinleri ve destekleri için Prof. Dr. Burhan K. Kıran ve Prof. Dr. Richard J. Wurtman'a, çalışmalarda yardımcıları için de Dr. R. Levent Büyükuysal ve Ahmet Demirbilek'e teşekkür ederim.

## Kaynaklar

1. Li C-L, McIlwain H. Maintenance of resting membrane potentials in slices of mammalian cerebral cortex and other tissues in vitro. *J Physiol* 1957; 139: 178-190.
2. Dunwiddie T, Mueller A, Basile A. The use of brain slice in central nervous system pharmacology. *Fed Proc* 1983; 42: 2891-2898.
3. McCormick DA. Refinements in the in-vitro slice technique and human neuropharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 53-56.
4. Collingridge GL. The brain slice preparation: a tribute to the pioneer Henry McIlwain. *J Neurosci Methods* 1995; 59: 5-9.
5. Cho S, Wood A, Bowlby MR. Brain slices as models for neurodegenerative disease and screening platforms to identify novel therapeutics. *Current Neuropharmacol* 2007; 5: 19-33.
6. Ulus IH, Wurtman RJ. Prevention by choline of the depletion of membrane phosphatidylcholine by a cholinesterase inhibitor. *N Eng J Med* 1988; 318: 191.
7. 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.
8. Ulus IH, Büyükuysal 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.
9. Büyükuysal RL, Ulus IH, Kıran BK. Age-related alterations in pre-synaptic and receptor-mediated cholinergic functions in rat brain. *Neurochem Res* 1998; 23: 719-726.
10. 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.
11. Ulus IH. Dopamin reseptör agonisti maddelerin sıçan beyni striatal dilimlerinde kolin ve asetilkolin saliverilmesine, doku kolin, asetilkolin ve fosfolipid düzeylerine etkisi. *Acibadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2010; 1:195-208.
12. Gilberstadt ML, Russell JA. Determination of picomole quantities of acetylcholine and choline in physiological salt solutions. *Anal Biochem* 1984; 138: 78-85.
13. Goldberg AM, McCaman RE. The determination of picomole amounts of acetylcholine in mammalian brain. *J Neurochem* 1973; 20: 1-8.
14. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
15. Raiteri L, Stigliani S, Zedda L, Raiteri M, Bonanno G. Multiple mechanisms of transmitter release evoked by "pathologically" elevated extracellular [K<sup>+</sup>]: involvement of transporter reversal and mitochondrial calcium. *J Neurochem* 2002; 80: 706-714.
16. Raiteri L, Zappettini S, Milanese M, Fedele E, Raiteri M, Bonanno G. Mechanisms of glutamate release elicited in rat cerebrocortical nerve endings by "pathologically" elevated extraterminal K<sup>+</sup> concentrations. *J Neurochem* 2007; 103: 952-961.
17. Wecker L, Cawley G, Rothermel S. Acute choline supplementation in vivo enhances acetylcholine synthesis in vitro when neurotransmitter release is increased by potassium. *J Neurochem* 1989; 52: 568-575.
18. Wecker L. The synthesis and release of acetylcholine by depolarized hippocampal slices is increased by increased choline available in vitro prior to stimulation. *J Neurochem* 1991; 57: 1119-1127.
19. Rauca C, Kammerer E, Matthies H. The influence of enhanced K<sup>+</sup>-concentration on the uptake and acetylation of choline in hippocampus slices of rat. *Biomed Biochim Acta* 1985; 44: 1621-1631.
20. Maire J-CE, Wurtman RJ. Effects of electrical stimulation and choline availability on the release and contents of acetylcholine and choline in superfused slices from rat striatum. *J Physiol (Paris)* 1985; 80: 189-195.
21. Büyükuysal RL, Wurtman RJ. 4-Aminopyridine increases acetylcholine release without diminishing membrane phosphatidylcholine. *J Neurochem* 1990; 54: 1302-1309.
22. Farber SA, Savci V, Slack BE, Wurtman RJ. Choline's phosphorylation in rat striatal slices is regulated by the activity of cholinergic neurons. *Brain Res* 1996; 723: 90-99.
23. Wurtman RJ. Choline metabolism as a basis for the selective vulnerability of cholinergic neurons. *TINS* 1992; 15: 117-122.
24. Klein J, Weichel O, Buhr J, Dvorak C, Löffelholz K. A homeostatic mechanism counteracting K<sup>+</sup>-evoked choline release in adult brain. *J Neurochem* 2002; 80: 843-849.