

Dopamin Reseptör Agonisti Maddelerin Sıçan Beyni Striatal Dilimlerinde Kolin ve Asetilkolin Salıverilmesine, Doku Kolin, Asetilkolin ve Fosfolipid Düzeylerine Etkisi

İsmail Hakkı Ulus

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı dopamin reseptör agonisti maddelerin sıçan striatal beyin dilimlerinden asetilkolin ve kolin salıverilmesine ve doku asetilkolin, kolin ve fosfolipid düzeylerine etkilerini incelemektir.

Yöntemler: Başları kesilerek öldürülen 250-350 g ağırlığında erkek Sprague-Dawley türü sıçanlardan beyinler hızla çıkarıldı ve soğutulmuş fizyolojik solüsyon içinde striatal bölge çıkarıldı ve 0,3 mm kalınlığında dilimlendi. Dilimler oksijene edilen ve ısıtılan fizyolojik Krebs solüsyonu ile bazal koşullarda, elektrikle ya da yüksek potasyumla uyarılarak perfüze (0,6 ml/dakika) edildiler. Dopamin agonistleri perfüzyon ortamına değişik konsantrasyonlarda eklendi ve toplanan perfüzlarda asetilkolin ve kolin ölçüldü. Deneğin sonunda ve dopamin agonistleri eklenmeden önce dilimlerden örnekler alınarak doku asetilkolin, kolin, protein, DNA ve fosfolipid düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Perfüzyon ortamına değişik konsantrasyonlarda eklenen dopamin reseptör agonistleri (dopamin (1-100 mM), apomorfın (1-100 mM), bromokriptin (0,1-10 mM), pirişpedil (1-100 mM), kuinpirol (1-10 mM) ve SKF 38393 (1 ve 10 mM) bazal koşullarda salıverilen asetilkolin ve kolin miktarını değıştirmeydi. Secici D1 agonisti olan SKF 38393 ise, ortamda 100 mM düzeyde bulunduğunda asetilkolin salıverilmesini arttırdı. Elektrikle ya da yüksek potasyumla (50 mM) uyarılma durumunda dilimlerden asetilkolin salıverilmesi 7-20 kat kadar arttı. Ortamda apomorfın, pirişpedil ya da kuinpirol bulunması uyarılmanın yol açtığı asetilkolin salıverilmesini konsantrasyona bağılı olarak azalttı. Diğey agonistler (dopamin, bromokriptin ve SKF 38393) ise, uyarılmanın neden olduğı asetilkolin salıverilmesine etkisizdi. Dopamin reseptör agonistleri dilimlerden kolin çıkışını, doku asetilkolin, kolin ve fosfolipid düzeylerini etkilemedi.

Sonuçlar: Bu bulgular dopamin reseptör agonistlerinin bazal koşullarda striatal dilimlerden asetilkolin ve kolin çıkışına etkisizken, uyarılan dilimlerden asetilkolin çıkışının bazı agonistlerce (apomorfın, pirişpedil ve kuinpirol gibi) baskılandığı göstermektedir. Dopamin reseptör agonistlerinin striatal dilimlerde kolin çıkışını, doku asetilkolin, kolin ve fosfolipid düzeylerine etkisi yoktur.

Anahtar sözcükler: Dopamin, kolin, asetilkolin, fosfolipid, sıçan

EFFECTS OF DOPAMINE RECEPTOR AGONISTS ON THE RELEASE AND CONTENTS OF ACETYLCHOLINE AND CHOLINE IN SUPERFUSED BRAIN SLICES FROM RAT STRIATUM

ABSTRACT

Objective: The aim of the study was to determine effects of dopamine receptor agonist on acetylcholine and choline release from rat brain striatal slices and tissue levels of acetylcholine, choline and phospholipid.

Methods: Sprague-Dawley rats (250-350 g) were decapitated and their brains were rapidly removed, the striata were dissected and sliced with 0.3 mm thickness. Slices were perfused with heated (37 °C) and oxygenated (95% O₂ + 5% CO₂) Krebs medium (0.6 ml/min) under basal and stimulated (either with high K⁺ or electrically) conditions with presence of various concentrations of dopamine receptor agonists. Acetylcholine and choline contents of the perfusates, and tissue levels of acetylcholine, choline, protein, DNA and phospholipids were assayed

Results: Dopamine receptor agonists [apomorphine (1-100 mM), dopamine (1-100 mM), bromocriptine (0.1-10 mM), pirişpedil (1-100 mM), quinpirole (1 and 10 mM) and SKF 38393 (1 and 10 mM)] failed to alter amounts of acetylcholine and choline released into the perfusate from striatal slices under basal conditions. While selective D1 receptor agonist SKF 38393 increased acetylcholine release at 100 mM. When the slices depolarized by high K⁺ (50 mM) or stimulated electrically (15 Hz, 1 ms, 80 mA) release of acetylcholine increased by 7-20 folds. Apomorphine, pirişpedil or quinpirole, but not dopamine, bromocriptine or SKF 38393, decreased acetylcholine release, by concentration dependent manner, during K⁺ depolarization and electrical stimulation. Dopamine receptors agonists failed to alter choline release, tissue levels of acetylcholine, choline and phospholipids at used concentrations.

Conclusion: These data show that dopamine receptor agonists have no effects on acetylcholine and choline release from the striatal slices under basal perfusion conditions, while some of agonists (i.e., apomorphine, pirişpedil and quinpirole) suppressed acetylcholine release from the stimulated slices. Dopamine receptor agonists have no effect on choline release and tissue contents of acetylcholine, choline and phospholipids.

Key words: Dopamine, choline, acetylcholine, phospholipid, rat

Giriş

Kolin tüm hücreler için membranın temel yapı taşı olan fosfatidil-kolin gibi fosfolipidlerin yapımında kullanılan çok önemli bir maddedir. Kolinerjik nöronlar ise kolin'i membran sentezine ek olarak nörotransmitterleri olan asetilkolin'in sentezinde de kullanırlar. Kolinerjik nöronlarda kolin'in bu ikili kullanımının düzenlenmesi tam olarak bilinmemekle beraber, serbest kolin'in yetersiz olduğu durumlarda kolin'in asetilkolin sentezi için kullanımı artarken (1,2) fosfolipid sentezine doğru kullanımı yavaşlar (1, 2). Bunun da ötesinde serbest kolin'in artmış asetilkolin sentezini karşılamakta yetersiz olduğu durumlarda membran fosfolipidlerinden kolin serbestleşmesi olduğu ve membran kaynaklı kolin'in hızlanmış asetilkolin sentezini karşılamak için kullanıldığını göstermiştir (3). Sıçan striatal beyin dilimleri ile yapılan çalışmalarda kolinerjik nöronların, ortama dışardan serbest kolin eklenmediği durumlarda bile, uzun süre asetilkolin sentez ve saliverilmesini sürdürdüğü ancak bunun membran fosfolipidlerinde belirgin düzeyde bir azalma-yıkılma ile sonuçlandığı belirlenmiştir (3). Bu bulgular, kolinerjik nöronların nörotransmitter asetilkolin sentezi için yeterli serbest kolin bulamadıklarında kendi membranlarındaki fosfolipidleri yıkarak serbest kolin oluşturduklarını ve bu kolini nörotransmitter asetilkolin sentezinde kullandıklarını göstermektedir. Bu olay "otokannabilizm" olarak adlandırılmış olup (4, 5), insanda yaşlılık ve Alzheimer hastalığı gibi durumlarda kolinerjik nöronların, diğer nöronal sistemlere göre, seçici aşırı kaybının olası bir mekanizması olarak ileri sürülmüştür (5).

Beyinde membran fosfolipidlerinin asetilkolin sentezinde gerekli serbest kolin için bir rezervuar görevi görmeleri ve fosfolipidlerden serbest kolin oluşumu fizyolojik ve fizyopatolojik olarak çok önemli görünmekle beraber, bu olayın düzenlenmesi ile ilgili bilgilerimiz son derece sınırlıdır. Bu düzenlemede kolinerjik sinirlerle sinaptik bağlantıları olan ve kolinerjik fonksiyonu etkilediği bilinen diğer nörotransmitterlerin rolü olabilir. Çalışmamızda, bu olasılık, sıçan striatal dilimlerinde dopaminergik reseptör agonisti çeşitli maddeler kullanılarak *in vitro* koşullarda test edilmiştir. Striatumdaki Kolinerjik internöronların dopaminergik nöronlarla sinaptik bağlantılarının bulunduğu (6-8) ve dopaminergik nörotransmisyonu etkileyen ilaçların asetilkolin saliverilmesini değiştirdikleri uzun süredir bilinmektedir (9-14). Dopaminergik agonistlerin önceden radyoaktif kolinle (^3H -kolin) işaretlenmiş striatal beyin dilimlerinden radyoaktif asetilkolin saliverilmesini *in vitro* koşullarda değiştirdikleri gösterilmiştir (10-14). Ancak bu çalışmalarda dopaminergik agonistlerinin endojen kolin metabolizmasına etkileri incelenmemiştir. Çalışmamızda dopaminergik agonistlerin sıçan striatal beyin dilimlerinde kolin metabolizmasına etkileri; 1. ortama saliverilen asetilkolin ve kolin miktarları, 2. doku asetilkolin ve kolin düzeyleri ve 3. membran fosfolipid değişimleri ölçülerek incelendi.

Yöntem ve Gereçler

Deney hayvanı

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 karalık ve 12 aydınlık) yem ve su alımları serbest tutularak ve evrensel etik kurallara uyularak bakıldılar.

Striatal beyin dilimlerin hazırlanması ve perfüzyon koşulları

Sıçan striatal beyin dilimleri daha önce tarif edildiği şekilde hazırlandı (3). Kısaca beyinler hızla çıkarılarak korpus striatum bölgesi tüm olarak çıkarıldı ve önden arkaya doğru 0,3 mm kalınlıkta dikine olarak otomatik dilimleyici ile (McIlwain Tissue Chopper, The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomstall, İngiltere). Dilimlenmiş striatum hızla oksijenize edilmiş fizyolojik tuzlu su (Krebs Solüsyonu, yapısı aşağıda belirtilmiştir) içeren petri kaplarına alınarak dilimler yumuşak tüylü fırça ile tek tek ayrıldı. Takiben, 5-6 dilim bir perfüzyon odacığına (1 ml kadar) olacak şekilde perfüzyon sistemine alındı. Perfüzyon sistemi 37 °C kadar ısıtılmış su banyosu içinde %95 O₂ + %5 CO₂ gaz karışımı ile devamlı olarak havalandırılan ve içinde 20 µM asetilkolinesteraz inhibitörü fizostigmin bulunduran fizyolojik tuzlu su solüsyonu [Bileşimi (mM olarak): NaCl, 120; KCl, 3,5; CaCl₂, 1,3; MgSO₄, 1,2; Na₂HCO₃, 25 ve D-Glükoz, 10] ile 0,6 ml/dakika hızla 8 kanallı peristaltik pompa aracılığı ile perfüze edildi. Dilimler bu şekilde 40-60 dakika süre ile denge ve toparlanma için perfüze edildi. Bu denge perfüzyonunu takiben perfüzyon sıvısına etkisi denenecek dopamin reseptör agonisti maddeler çeşitli konsantrasyonlarda eklendi. Takiben, dilimler, ya bazal koşullarda ya da uyarılarak [yüksek potasyumlu (50 mM KCl) solüsyonla ya da elektrikle (15 Hz, 80 mA, 30 mV, 1 ms) Ag/AgCl₂ elektrolarla ve "Grass 88" model stimülatör kullanılarak] perfüze edildiler.

Striatal dilimlerden çeşitli koşullarda ortama saliverilen kolin ve asetilkolin miktarlarını belirlemek için denge perfüzyonu döneminin sonunda (50.-60. dakikalar arasında) ve sonraki 30 dakikalık deneme dönemi süresince (60.-90. dakikalar arasında) 10 dakikalık dönemlerle perfüze toplandı. Elektrikle uyarılma deneylerinde ise, denge dönemini takip eden tüm uyarılma dönemi boyunca (60 dakika) perfüze toplandı. Perfüze toplama ve analizi ile ilgili ayrıntı bulgular bölümünde Tablo altlarında ayrıntılı şekilde belirtilmiştir.

Perfüzattan asetilkolin ve kolin ekstraksiyonu ve ölçümü

Perfüzatta bulunan asetilkolin ve kolin silisik asit kolon tekniği kullanılarak (15) daha önce tarif edildiği şekilde (3) ekstrakte edildi. Kısaca, 2 ml perfüze cam pastör pipetlerine hazırlanmış 0,8X1,2 cm silisik asit kolonlarına (Bio-Sil, Bio-Rad firması, CA, ABD) tatbik edildi. Perfüze süzülerek kolonlardan geçince kolonlar 2 ml 0,001 N HCl solüsyonu ile yıkandılar. Perfüze süzülmesi sırasında silisik asitlere tutunmuş olan kolin ve asetilkolin kolonlar üzerine sırayla eklenen 0,75 ml 0,075 N HCl ve 1,25 ml 0,03 N HCl (%20 lik metanol içinde hazırlanmış) ile serbestleştirildi ve asit süzüntüler cam tüpler (12x75 mm) içinde toplandı.

Asit süzüntüler vakum santrifüjünde kurutuldu. İçerdikleri kolin ve asetilkolin miktarları radioenzimatik yöntemle (16) daha önce anlatıldığı şekilde (3) ölçüldü. Kısaca; kolin içeren kurutulmuş asit süzüntü örneklerine 25 ml ölçüm karışımı [5 µl kolin kinaz (2 mÜ), 10 µl Gly-glisin (GG) tamponu (pH = 8,5), 0,3 µl MgCl₂ (1 M), 2 µl DDT (10 mg/ml), 7,5 µl H₂O, 0,2 µl 32P-ATP (0,1 M ve 0,5 µCi)]

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 kolin'e kolin kinaz enziminin ATP den alınan radyoaktif fosfat gurubu ($^{32}\text{PO}_4$) eklenerek ^{32}P -fosfokoline'e dönüştürüldü.

Asetilkolin ölçümü ise iki basamaklı enzimatik reaksiyonla gerçekleştirilmiştir (3,16). İlk basamakta asetilkolin içeren örneklerdeki kolin uzaklaştırılmıştır. 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 dönüştürülmüştür. İkinci aşamada ise, ölçüm ortamına 10 µl içinde 2,5 ünite asetilkolinesteraz ve 0,5 µCi ^{32}P -ATP eklenmiştir. Takiben 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 örneklerdeki asetilkolin ortama eklenen 2,5 ünite asetilkolinesteraz enzimi ile koline hidrolize edilmiş ve oluşan serbest kolin ortamda ilk basamaktan kalan kolin kinaz enziminin radyoaktif fosfokoline (^{32}P -fosfokolin) dönüştürülmektedir.

Kolin ve asetilkolin örneklerindeki karışımı (25 µl inkübasyon ortamı + 0,5 ml H₂O) anyon değiştirici reçineden (AG-1 x8, format form, 200-400 mesh, Bio-Rad, CA, ABD) hazırlanmış kolonlara (0,8x1,5 cm) uygulandı. Karışım kolonlardan süzülükten sonra kolonlar üzerine önce 0,5 ml 5 N NaOH ve takibinde 1,25 ml amonyum asetat (75 mM, pH = 10) çözeltileri eklendi. Tüm kolon süzüntüsü 20 ml kapasiteli plastik radyoaktif sayım tüplerinde toplandı ve üzerine 10 ml H₂O eklenerek radyoaktivitesi ölçüldü (Tri-Carb 1600-TR, Packard Instrument Co., Inc., CT, ABD). Bu kolon işlemi sırasında enzimatik işlemler sırasında kullanılmamış ^{32}P -ATP tamamı kolona tutulmakta, radyoaktif fosfokolin ise kolondan tutunmayarak süzüntü içinde geçmektedir. Dolayısı ile toplanan kolon süzüntüsü içinde sadece kolinden sentez edilmiş ^{32}P -fosfokolin bulunmaktadır.

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

Doku kolin ve asetilkolin miktarı ölçümü

Deney bitiminde, ya da bulgular bölümünde yeri geldiğinde açıklandığı zamanda, perfüzyon odacıklarından dilimler alındı ve 2 kez 2-3 ml kadar soğuk Krebs solüsyonu ile yıkandılar. Takiben, 1 ml soğutulmuş su içinde (20 µM fizostigmin içeren) cam-teflon doku öğütücüsü ile homojenize edildiler. Doku homojenatlarından 0,2 ml alınarak içinde soğutulmuş 2 ml formik asit-aseton karışımı [15 ml formik asit (1 N) + 85 ml aseton karışımı] içeren cam tüplere (13x100 mm). Karışım güçlü bir şekilde vortekslenildi ve 20-30 dakika kadar bir süreyle buz dolabında tutuldu. Takiben karışım santrifüje edildi (10 dakika, 3000 g, 4 °C) ve üstteki berrak kısım cam tüplere aktararak vakum altında kurutuldu. Kurutulmuş örnekler üzerine 1 ml soğuk distile su ek-

lendi ve vortekslenildi ve bu çözelti yukarıda perfüzyonlar için tarif edildiği şekilde silisik asit kolonlarından geçirilerek kolin ve asetilkolin asit kolon süzüntüleri içinde toplandı. Kolon süzüntüleri vakum altında kurutuldu ve yukarıda perfüzyonlar için tarif edildiği üzere kolin ve asetilkolin ölçümleri yapıldı. Değerler doku protein düzeyine göre düzeltildi.

Dokuda fosfolipid, protein ve DNA tayini

Yukarıda belirtildiği şekilde striatal dilimlerinden hazırlanan doku homojenatlarından 10-50 µl örnekler alınarak fotometrik yöntemle protein (17) ve fluorometrik yöntemle DNA ölçümleri (18) daha önce tarif edildiği şekilde (3) yapıldı.

Fosfolipid tayini için alınan 400 µl doku homojenatı 6 ml metanol-kloroform karışımı (1 kısım metanol + 2 kısım kloroform) üstüne eklendi ve 10-20 saniye kadar bir süre ile vortekslenildi. Takiben, bu karışım üzerine 1,6 ml soğuk distile su eklenerek karışım yeniden 10-20 saniye kadar vortekslenildi. Karışım buzdolabında 4 saat kadar tutuldu ve takiben santrifüje edilerek (10 dakika, 3000 g, 4 °C) iki faz oluşması sağlandı. Üstteki sulu faz atıldı ve alttaki organik fazdan 0,6 ml alınarak cam tüpler içinde (13x100 mm) vakum altında kurutuldu. Takiben her tüpe 0,2 ml yoğun perklorik asit eklendi ve üstleri cam bilya ile kapatılarak 2 saat kadar 160 °C kaynatılarak fosfolipidler parçalandı. Asidik parçalanma sonucu ortaya çıkan inorganik fosfor daha önce tarif edildiği gibi (3) fotometrik yöntemle ölçüldü (18). Standart için potasyum fosfat solüsyonu kullanıldı.

İlaçlar

Apomorfine HCl, SKF 38393 HCL ve Kuinpirol HCl RBI'dan (Research Chemicals Incorporated, RBI, MA, ABD), Bromokriptin metan sulfonat ve Dopamin HCl ise Sigma'dan (Sigma Chemical Company, MO, ABD) satın alınmıştır. Pripedil ise yerel firmalardan (Servier, Türkiye) temin edilmiştir.

İstatistik

Hesaplamalarda ve istatistik değerlendirmelerde "Pharmacological Calculations, Version 2" ve "Sigmastat" bilgisayar yazılımları kullanılmıştır. Değerler, aksi belirtilmedikçe, ortalama ± ortalamının standart hatası (SH) olarak verilmiştir. P değeri 0,05'den daha küçük olduğunda ortalamalar arası fark anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Bazal koşullarda striatal dilimlerden asetilkolin ve kolin salıverilmesine dopamin reseptör agonistlerinin etkisi

Yöntem bölümünde bahsedildiği gibi striatal dilimler Krebs çözeltisi ile 0,6/dakika hızla 40-60 dakika kadar denge perfüzyonuna tabi tutuldu. İlaç etkileri ise bu denge periyodunu takiben 30-60 dakikalık dönemde 10. dakikalık dönemlerle toplanan perfüzyon örneklerinde asetilkolin ve kolin ölçümü ile incelenmiştir. Dilimlerden bazal koşullarda (uyarılmadan) 10 dakikada 20-100 pmol/mg protein kadar asetilkolin ve 120-600 pmol/mg protein kadar kolin salıverilmekteydi.

Dopamin reseptör agonistlerinin (dopamin, apomorfin, bromokriptin, pipedil, kuinterol ve SKF 38393) bazal koşullarda asetilkolin ve kolin çıkışına etkilerini test etmek için dilimlerden 50.-60. dakikalar arası kontrol perfüze toplanmış ve 60. dakikadan itibaren perfüzyon ortamına ortama dopamin reseptör agonisti maddeler çeşitli konsantrasyonlara (0-100 μ M arasında) eklenmiş ve 60.-90. dakikalar arasında on dakikalık dönemler 3 perfüze örneği toplanmıştır.

Dopamin (1-100 μ M), apomorfin (0,1-100 μ M), bromokriptin (0,1-10 μ M), priedil (1-100 μ M) ve kuinperol (0,1-10 μ M) 60.-90 dakikalar arasındaki ardışık onar dakikalık 3 dönemin hiç birinde asetilkolin saliverilmesini anlamlı şekilde etkilememişlerdir (Tablo 1). Ortama 100 μ M SKF 38393 eklenmesi ise ilk iki toplama döneminde (60.-70. ve 70-80. dakikalar arası) asetilkolin çıkını artırdı. SKF 38393 daha düşük konsantrasyonlarda (1 μ M ve 10 μ M) ise bazal asetilkolin çıkışını değiştirmedir (Tablo 1).

Dopamin agonistlerin hiç birisi, bu çalışmada kullanılan tüm konsantrasyonlarında, striatal dilimlerden kolin çıkışını anlamlı derecede etkilemedi (Tablo 2).

Yüksek potasyumla depolarize edilen striatal dilimlerden asetilkolin ve kolin saliverilmesine dopamin reseptör agonistlerinin etkisi

Striatal dilimler normal Krebs solüsyonu ile denge perfüzyonunu takiben yüksek potasyumlu (50 mM) ortam ile perfüze dilirse, dilimlerden perfüzyon ortamına (perfüzata) asetilkolin çıkışı ilk 10 dakikalık dönemde 12-20 kat kadar artmaktadır. Asetilkolin çıkışındaki yüksek potasyuma bağlı artış sonraki (2. ve 3.) toplama dönemlerinde birinciye göre belirgin bir şekilde azalmaktadır (Tablo 3).

Yüksek potasyumla perfüzyon sırasında ortamda dopamin (1-100 μ M), bromokriptin (0,1-10 μ M) ve SKF 38393 (1-100 μ M) bulunması asetilkolin çıkışını etkilemedi (Tablo 3). Potasyumla perfüzyon sırasında ortamda 100 μ M apomorfin (Tablo 3) ya da priedil (Tablo 3) bulunması ise, asetilkolin saliverilmesini belirgin olarak baskılamıştır (Tablo3). Benzer şekilde ortama eklenen 10 μ M kuinperol da (Tablo 3) asetilkolin çıkışını baskılamaktadır. Apomorfin, priedil ve kuinperol'ün daha düşük konsantrasyonları yüksek potasyumla uyarılmış asetilkolin saliverilmesini değiştirmemektedir (Tablo 3).

Yüksek potasyumlu perfüzyon artımına geçiş, perfüzata çıkan kolin miktarını da ilk dönemde bazale göre, 1,2-1,6 kat kadar, artırmaktadır (Tablo 4). Sonraki toplama dönemlerinde ise perfüzata çıkan kolin hızla düşmekte ve 3. dönemde bazal düzeyin de altına inmektedir (Tablo 4).

Dopamin agonistlerin hiçbiri, kullanılan konsantrasyonlarında, yüksek potasyumla perfüzyon sırasında ortama kolin çıkışını değiştirmediler (Tablo 4).

Dopamin reseptör agonistlerinin striatal dilimlerde doku asetilkolin ve kolin düzeylerine etkileri

Yüksek potasyumlu (50 mM) Krebs solüsyonu ile 30 dakika süreyle perfüzyon doku asetilkolin düzeylerinde %65-80 arasında doku kolin düzeylerinde ise %15-45 arasında bir azalmaya neden

oldu (Tablo 5). Dopamin reseptör agonistlerinin hiç biri, kullanılan konsantrasyonlarında, doku asetilkolin ve kolin düzeylerinde azalmaları etkilemedi (Tablo 5).

Elektrikle uyarılan striatal dilimlerden asetilkolin ve kolin saliverilmese dopamin reseptör agonistlerinin etkileri

Bu seri çalışmalarda dilimler 60 dakika süreyle ya bazal koşullarda ya da elektrikle uyarılarak perfüze edilmişlerdir ve 60 dakikalık perfüze toplanarak asetilkolin ve kolin ölçümü için kullanıldı. Dopamin agonistleri bu 60 dakikalık bölümdeki ortamda bulunurularak asetilkolin ve kolin saliverilmesine etkileri incelendi.

Tablo 6'de de görüldüğü gibi dopamin (50 ve 100 μ M) ve SKF 38393 (10, 50 ve 100 μ M) asetilkolin saliverilmesini değiştirmemektedir. Diğer taraftan elektrikle uyarılmış asetilkolin saliverilmesi apomorfin (10, 50 ve 100 μ M), ve priedil (10, 25, 50, ve 100 μ M) tarafından konsantrasyonla bağlantılı şekilde baskılandı (Tablo 6). Kuinperol de (10 mM) asetilkolin saliverilmesini yarıya azalttı (Tablo 6).

Dopamin reseptör agonistlerinin hiç biri kullanılan konsantrasyonlarda striatal dilimlerden kolin çıkışını değiştirmedir (Tablo 6).

Elektrikle uyarılan striatal dilimlerde doku asetilkolin ve kolin düzeyine dopamin reseptör agonistlerinin etkileri

Striatal dilimlerin elektrikle uyarılma doku asetilkolin ve kolin düzeylerini etkilemedi (Tablo 7). Dopamin reseptör agonistlerinin hiç biri, kullanılan konsantrasyonlarında, elektrikle uyarılmış dilimlerde doku asetilkolin ve kolin düzeylerinde azalmaları etkilemedi (Tablo 7).

Dopamin reseptör agonistlerinin striatal dilimlerde doku total fosfolipid düzeylerine etkileri

Tablo 8'de bazal koşullarda, yüksek potasyumla ve elektrikle uyarılan striatal dilimlerde çalışma sonrası total fosfolipid düzeyleri görülmektedir. Potasyumla uyarılan dilimlerde fosfolipid düzeylerinde her hangi bir değişme olmazken, elektrikle uyarılmış dilimlerde doku total fosfolipid düzeyleri sınırlı (%5-15) bir şekilde azaldı. Perfüzyon koşullarında ortamda dopamin reseptör agonistlerinin bulunması fosfolipid düzeylerinde ek bir değişmeye neden olmadı (Tablo 8).

Tartışma

Bu bulgular dopamin reseptör agonistlerinin bazal koşullar altında perfüze edilen striatal beyin dilimlerinden asetilkolin ve kolin saliverilmesini ve doku asetilkolin kolin düzeylerini değiştirmediklerini göstermektedir. Uyarılma durumunda (elektrikle ya da yüksek potasyumla) ise, apomorfin, priedil ve kuinpirol, dozları ile ilişkili olarak, asetilkolin saliverilmesini baskılamaktadır. Dopamin ve bromokriptin asetilkolin saliverilmesine etkisiz olmuş, SKF 38393 ise bazı konsantrasyonlarında asetilkolin saliverilmesini arttırmıştır. Denenen dopamin reseptör agonistleri elektrikle ya da yüksek potasyumla uyarılan dilimlerden kolin çıkışını etkilemiştir. Dopamin reseptör agonistleri dilimlerdeki doku asetilkolin, kolin ve fosfolipid düzeylerinde uyarılmaya bağlı değişimleri de etkilemediler.

Striatal dilimlerden bazal koşullarda perfüzyon sırasında ortama kolin ve asetilkolin saliverilmesi ve bu iki bileşiğin birbirlerine göre göreceli saliverilme hızı (örneğin; kolin çıkışının başlangıçta asetilkoline göre 5-8 kere daha yüksek olması gibi) daha önceki striatal beyin dilimleri çalışmaları ile uyumludur (3, 19-21). Daha önceki çalışmalarda olduğu gibi (3), bu çalışmada da kolin çıkışında zaman içinde tedrici bir azalma gözlenmiştir ve son dönemde (80.-90. dakikalar arasındaki toplanan perfüzatta) kolin çıkışı başlangıca göre %15-20 kadar daha düşük olmuştur. Kolin çıkışı elektrikle uyarılma ile değişmezken (3), bu çalışmada ilk kez gözlemlendiği gibi yüksek potasyumla depolarizasyon sırasında başlangıçta sınırlı bir artış göstermekte (Tablo 4) yüksek potasyumla perfüzyonun devamında ise sonraki dönemlerde kolin çıkışı kontrole göre %30-40 kadar azalmaktadır. Ancak, gerek bazal koşullarda ve gerekse elektrikle ya da yüksek potasyumla uyarılma koşullarında striatal dilimler başlangıçta içerdiklerinden daha fazla serbest kolinin ortama salmaktadır. Bu fazladan serbest kolinin kaynağı membran fosfolipidleridir (3). Önceki çalışmalarda fosfolipidlerinden kolin oluşmasının muskarinik agonistlerce arttığı (22), NMDA agonistlerinden etkilenmediğini (21), magnezyum iyonlarının baskılandığı (21, 23), potasyum kanal blokörleri ile (20), yüksek potasyumla depolarizasyonda olduğu gibi (Tablo 4), bifazik şekilde etkilendiği (önce arttığı ve daha sonra ise baskılandığı) gösterilmiştir (20). Bu çalışmada ise, çok farklı yapıdaki ve özellikteki dopamin reseptör agonistleri kullanılan çok çeşitli konsantrasyonlarında kolin çıkışını bazal ve uyarılma koşullarında etkilememişlerdir. Bu bulgular striatal dokuda fosfolipidlerden serbest kolin oluşmasında dopaminergik uyarılmanın belirgin bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Kolin çıkışından farklı olarak striatal dilimlerden asetilkolin çıkışı üzerine dopamin reseptör agonistlerinin etkileri dilimlerin uyarılma durumları ile ilişkili görünmektedir. Şöyle ki, bazal koşullar altında incelenen 6 farklı dopamin agonistinden yalnızca SKF 38393 ancak 100 μ M gibi çok yüksek konsantrasyonda asetilkolin çıkışını arttırmış, diğerleri ise, incelenen 10-100 kat gibi farklı konsantrasyonlarında bile etkisiz olmuşlardır (Tablo 2). Uyarılma durumunda ise, apomorfin, pirişpedil ve kuinpirol asetilkolin çıkışını yüksek konsantrasyonlarında büyük ölçüde (30-65% gibi) baskılamışlardır (Tablo 3 ve Tablo 6). Dopamin ve bromokriptin ise, uyarılma koşullarındaki asetilkolin saliverilmesini etkilemedi (Tablo 3). Radyoaktif kolin (3 H-Choline) kullanılarak yapılan beyin dilimleri çalışmalarında da potasyum depolarizasyonunun ya da elektriksel uyarılmanın yol açtığı 3 H saliverilmesinin (ölçülen radyoaktivitenin tamamının 3 H-asetilkolin olduğu varsayılıyor) ve seçici D2 reseptör agonisti kuinpirol (11-14) ve bromokriptinin (10) tarafından baskılandığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda 10 μ M kuinpirol ile olan baskılanma (Tablo 3, ve 6) öncekilerle (11-14) uyumlu olmakla beraber, bromokriptinin etkisiz bulunması öncekilerle (10) çelişiktir. Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle beraber, bizim çalışmamızda perfüzyon ortamına bromokriptin eklenmesi solüsyonun bulanıklaşmasına neden olduğu gözlemlendi. Bu bulanıklık bromokriptinin kullanılan fizyolojik perfüzyon ortamında eriliğinin azalması ile çökmesinden ya da bazı tuzlarla çözünmeyen kompleksler oluşmasından olabilir. Dolayısı ile gözlenen etkisizlik bromokriptinin dilimlere etki edecek yeterli düzeyde ulaşmamasından kaynaklanmış olabilir.

Radyoaktif kolin kullanılan çalışmalarda D1 reseptörlerinin seçici agonisti olan SKF 38393'ün 3 H-asetilkolin çıkışını arttırdığı (10, 11, 12, 14) ya da değiştirmediği (24) bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise, D1 seçici agonist olan SKF 38393'ün düşük konsantrasyonda (0,1 μ M) yüksek potasyumla uyarılan asetilkolin saliverilmesini arttırırken daha yüksek konsantrasyonlarda (1, 10 ve 100 μ M) kullanıldığında etki etmedi (Tablo 3). Bizim çalışmamızda D2 seçici agonist kuinpirol ile uyarılma koşullarında asetilkolin çıkışında baskılanma ve D1 seçici agonisti SKF 38393'ün düşük konsantrasyonunda asetilkolin çıkışındaki artma bulguları radyoaktif kolin çalışmalarındaki bulguları da berabercede dikkate alınarak değerlendirildiğinde, D2 reseptör uyarılmasının asetilkolin saliverilmesini baskıladığı, D1 uyarılmasının ise saliverilmeyi arttırdığı ileri sürülebilir. Ancak hem elektriksel ve hem de yüksek potasyumla asetilkolin saliverilmesinin D1 ve D2 reseptörler bakımından seçici agonistik etkili olmayan apomorfin ve pirişpedil tarafından baskılanması bu varsayımın tam uyumlu değildir. Uyarılmış asetilkolin saliverilmesinde D2 reseptörler uyarılması üzerinden gerçekleşen baskılanmanın daha hakim bir etki olduğunu anlaşılmaktadır. Apomorfin ve pirişpedil örneklerinde olduğu gibi, eğer D1 ve D2 reseptörleri beraberce uyarılırsa, D1 reseptörünün asetilkolin saliverilmesinin arttırıcı etkisi D2 uyarılmasının yol açtığı baskılanması ile maskelenmektedir. D1 reseptör uyarılması üzerinden gözlenen asetilkolin saliverilmesindeki artış, ancak, D2 reseptör uyarılması ile baskılanma olmadığında ortaya çıkmaktadır.

Beyin dilimlerinden *in vitro* perfüzyon koşullarında perfüzata başlangıçta dokuda bulunan toplam kolin (kolin+ asetilkolin) daha fazla miktarda kolinin (kolin+asetilkolin olarak) saliverildiği, yukarıda da belirtildiği gibi, çok uzun süreden beri bilinmektedir (3, 19, 20, 21, 24, 25, 26). Bu fazladan kolin'in kaynağının membrandaki kolin içeren fosfolipidler olduğu (3, 24, 26) ve uzun süre uyarılma koşullarında membran yıkımının oluştuğu gösterilmiştir (3). Bu çalışmada da yüksek potasyumla 30 dakikalık uyarılma döneminde dilimlerden perfüzata mg protein başına 2300-2500 pmol kadar kolin (1200 pmol kadar asetilkolin ve 1100 pmol kadar da kolin olmak üzere) saliverilmiştir. Depolarizasyon başlamadan önce dokuda yaklaşık 2300 pmol kadar asetilkolin ve 1200 pmol kadar da kolin bulunmaktaydı (Tablo 5). Otuz dakikalık yüksek potasyumla uyarılma sonrası dokuda mg protein başına 500-700 pmol kadar asetilkolin ve 700-800 pmol kadar da kolin kaldığı görülmektedir. Buna göre 30 dakikalık süre içinde membran fosfolipidlerinden yaklaşık olarak mg protein başına 1000-1500 pmol kadar daha serbest kolin oluştuğu anlaşılmaktadır. Bir saat süreyle elektrikle uyarılan dilimlerden ise ortama saliverilen toplam kolin (kolin+asetilkolin) miktarı yaklaşık olarak mg protein başına 5000-6000 pmol kadardır (Tablo 6). Bu dilimlerde elektrikle uyarılma sonrası doku asetilkolin ve kolin düzeyleri de, çok az bir kayıpla (Tablo 7), nerede ise değişmeden kalmıştır. Bu nedenle, elektrikle uyarılan dilimlerden membran fosfolipidlerinden serbest kolin oluşumu yüksek potasyumlu uyarılma koşullarına göre 8-10 kat fazlasıyla mg protein başına 5000-6000 pmol kadar olmuştur. Nitekim, Tablo 8'de ki fosfolipid değerlerinden de açık şekilde görüldüğü gibi, biz bu çalışmada uyarılma sonucu bir azalma görmezken, elektrikle 60 dakika uya-

rılma sonrası %7 oranında bir azalma gözleddik. Dopamin reseptör agonistlerinin ortamda bulunduğu dilimlerde de elektrikle uyarılma sonrası membran fosfolipid düzeyleri %5-12 oranlarında düşük bulunmuştur. Bu bulgular dopamin reseptör agonistlerinin uyarılma sırasında fosfolipidlerden serbest kolin oluşumunu ve fosfolipid yıkılımını değiştirmediklerini göstermektedir. Ancak fosfolipid düzeylerindeki düşmenin sınırlı ve anlamlı olmayışı bu konuda daha fazla ek yorum yapmayı engellemektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen sonuçlar ilk kez olarak dopamin reseptör agonistlerinin dokudan ortama serbest kolin sa-

liverilmesini, doku serbest kolin ve membran fosfolipid düzeylerini değiştirmediklerini göstermektedir. Dopamin agonistleri doku asetilkolin düzeyini de bazal ve uyarılma koşullarında değiştirmemektedir. Secici D2 (kuinpirol) ve D1+D2 reseptör agonistleri (apomorfin ve piri pedal) uyarılma koşullarında asetilkolin salıverilmesi baskılamaktadır. Secici D1 agonisti SKF 38393 ise, bazı konsantasyonlarında, asetilkolin çıkışını bazal ve uyarılmış koşullarda arttırmaktadır. Bu bulgular bazal ganglionların fonksiyonları ve hastalıklarında son derece önemli olan striatal nöral şebekede içindeki (28, 29) dopaminergik-kolinerjik etkileşim hakkındaki bilgilerimize önemli katkı sağlamaktadır.

Tablo 1. Dopamin reseptör agonistlerinin bazal perfüzyon koşullarında asetilkolin çıkışına etkileri

Agonistler	N	Asetilkolin (pmol/mg protein/10 dakika)			
		1. Dönem	2. Dönem	3. Dönem	4. Dönem
Dopamin (mM)					
0	8	37 ± 4	35 ± 5	37 ± 3	34 ± 7
1	8	29 ± 8	29 ± 6	37 ± 8	35 ± 8
10	4	37 ± 4	44 ± 4	37 ± 4	43 ± 6
100	10	35 ± 5	35 ± 5	41 ± 4	37 ± 3
Apomorfin (mM)					
0	6	46 ± 6	46 ± 7	44 ± 5	49 ± 8
1	8	39 ± 5	40 ± 8	43 ± 7	33 ± 4
10	8	52 ± 6	52 ± 5	48 ± 7	54 ± 9
100	8	51 ± 5	48 ± 8	44 ± 7	50 ± 9
Bromokriptin (mM)					
0	6	46 ± 3	49 ± 7	49 ± 9	47 ± 6
0,1	8	53 ± 4	48 ± 5	52 ± 7	51 ± 5
1	7	48 ± 6	52 ± 4	59 ± 8	41 ± 7
10	8	45 ± 5	44 ± 4	47 ± 3	42 ± 4
Pripedil (mM)					
0	7	48 ± 9	56 ± 9	47 ± 9	56 ± 6
1	6	46 ± 3	38 ± 9	44 ± 3	42 ± 6
10	6	40 ± 6	37 ± 5	45 ± 9	41 ± 6
100	6	40 ± 7	38 ± 8	34 ± 4	40 ± 3
SKF 38393 (mM)					
0	8	48 ± 9	46 ± 5	47 ± 4	46 ± 6
1	6	45 ± 4	52 ± 7	47 ± 8	47 ± 4
10	8	47 ± 8	56 ± 4	58 ± 9	57 ± 6
100	8	46 ± 7	85 ± 9*	72 ± 9*	57 ± 6
Kuinpirol (mM)					
0	8	49 ± 9	56 ± 9	47 ± 9	56 ± 8
1	4	47 ± 7	46 ± 4	42 ± 2	42 ± 2
10	5	47 ± 8	58 ± 9	51 ± 7	59 ± 9

Tablo 2. Dopamin reseptör agonistlerinin bazal koşullarda perfüze edilen striatal dilimlerden kolin çıkışına etkileri

Agonistler	Kolin (pmol/mg protein/10 dakika)				
	N	1. Dönem	2. Dönem	3. Dönem	4. Dönem
Dopamin (mM)					
0	8	349 ± 15	316 ± 25	304 ± 18	298 ± 18
1	8	343 ± 27	347 ± 40	344 ± 35	332 ± 29
10	4	330 ± 28	321 ± 30	329 ± 15	322 ± 15
100	10	337 ± 34	353 ± 21	341 ± 26	333 ± 23
Apomorfin (mM)					
0	6	358 ± 26	353 ± 21	326 ± 20	333 ± 35
1	8	339 ± 12	338 ± 12	338 ± 25	296 ± 14
10	8	346 ± 37	343 ± 16	370 ± 30	316 ± 32
100	8	324 ± 34	344 ± 27	338 ± 38	306 ± 32
Bromokriptin (mM)					
0	6	362 ± 34	337 ± 32	321 ± 43	338 ± 17
0,1	6	342 ± 23	348 ± 43	342 ± 35	311 ± 28
1	7	357 ± 32	341 ± 23	368 ± 41	319 ± 35
10	7	338 ± 19	347 ± 14	351 ± 33	311 ± 31
Pripedil (mM)					
0	7	323 ± 28	346 ± 31	321 ± 46	298 ± 35
1	7	338 ± 32	328 ± 21	324 ± 18	287 ± 39
10	7	352 ± 19	340 ± 22	328 ± 41	308 ± 21
100	7	372 ± 34	333 ± 37	354 ± 54	308 ± 46
SKF 38393 (mM)					
0	4	307 ± 63	342 ± 32	293 ± 26	302 ± 60
1	6	326 ± 36	377 ± 43	339 ± 28	382 ± 27
10	8	364 ± 36	376 ± 43	340 ± 28	403 ± 7
100	8	336 ± 34	436 ± 37	340 ± 21	444 ± 47
Kuinpirol (mM)					
0	6	333 ± 23	321 ± 41	318 ± 27	298 ± 38
1	4	354 ± 47	349 ± 32	328 ± 29	336 ± 17
10	5	328 ± 18	321 ± 32	311 ± 32	293 ± 24

Sıçan striatal dilimleri (0,3 mm) 20 µM fizostigmin içeren Krebs solüsyonu ile 60 dakika perfüze edildiler. Bu denge perfüzyonu sırasında 50.-60. dakikalar arasında perfüze toplandı (1. dönem). 60. dakikadan başlanarak perfüzyon ortamına 1. sütunda belirtilen dopamin reseptör agonistleri ("agonistler" başlığı altındaki ilaçlar) belirtilen düzeylerde eklendi ve dilimler ilaç içeren ortamla 30 dakika perfüze edildiler. Bu süre içinde 10 dakikalık dönemlerde (2., 3. ve 4. dönemler) 3 perfüze örneği toplandı. Asetilkolin silisik asit kolonları ile ayrıldı ve radio-enzimatik yöntemle ölçüldü. Perfüzeattaki asetilkolin miktarları dilimlerde protein miktarına göre düzeltilerek, "pmol/mg protein/10 dakika" ola-

rak ifade edildi. Değerler ortalama ± ortalamının standart hatası olarak verilmiştir. Her gruptaki deney (ölçüm) sayıları Tablo'da 2. sütunda gösterilmiştir. *p<0.05: kendi bazal (1. dönem) değeri ile karşılaştırıldığında.

Striatal dilimler Tablo 1'de anlatıldığı şekilde perfüze edildiler ve belirtilen dönemlerde perfüze toplandı. Kolin silisik asit kolonu ile ayrıldı ve radio-enzimatik yöntemle ölçüldü. Perfüze kolin düzeyleri dilimlerdeki doku protein düzeyine göre düzeltildi ve "pmol/mg protein/10 dakika" olarak verildi. Değerler ortalama ±

Tablo 3. Dopamin reseptör agonistlerinin yüksek potasyumla perfüze edilen striatal dilimlerden asetilkolin çıkışına etkileri.

Agonistler	N	Asetilkolin (pmol/mg protein/10 dakika)			
		Kontrol	Yüksek potasyum depolarizasyon dönemi		
		dönem	1. Dönem	2. Dönem	3. Dönem
Dopamin (mM)					
0	8	38 ± 4	665 ± 55	328 ± 34	201 ± 13
1	8	39 ± 8	772 ± 65	361 ± 26	222 ± 67
10	4	47 ± 9	786 ± 65	292 ± 44	217 ± 35
100	8	38 ± 9	698 ± 95	301 ± 43	233 ± 18
Apomorfın (mM)					
0	8	36 ± 8	730 ± 96	318 ± 19	205 ± 19
1	8	39 ± 6	706 ± 47	327 ± 29	234 ± 15
10	8	44 ± 6	713 ± 77	270 ± 32	165 ± 28
100	8	47 ± 6	408 ± 65*	205 ± 22*	151 ± 18
Bromokriptin (mM)					
0	4	45 ± 8	765 ± 96	371 ± 75	189 ± 31
0,1	6	48 ± 8	993 ± 54	467 ± 44	238 ± 32
1	4	45 ± 6	708 ± 94	367 ± 61	201 ± 27
10	4	45 ± 9	709 ± 76	400 ± 17	216 ± 16
Pripedil (mM)					
0	7	48 ± 9	721 ± 98	326 ± 29	249 ± 26
1	6	46 ± 3	772 ± 98	327 ± 90	140 ± 18
10	6	40 ± 6	625 ± 57	333 ± 39	170 ± 26
100	6	40 ± 7	237 ± 24*	216 ± 30*	196 ± 23
SKF 38393 (mM)					
0	8	38 ± 7	724 ± 38	342 ± 49	238 ± 16
0,1	4	40 ± 6	913 ± 36*	526 ± 24*	430 ± 33*
1	6	44 ± 4	796 ± 48	449 ± 49	283 ± 50
10	8	47 ± 8	769 ± 50	302 ± 59	192 ± 23
100	8	36 ± 6	832 ± 70	328 ± 42	252 ± 32
Kuinpirol (mM)					
0	6	39 ± 9	725 ± 45	355 ± 43	235 ± 34
1	4	37 ± 5	810 ± 28	382 ± 39	226 ± 22
10	5	40 ± 6	375 ± 97*	178 ± 40*	122 ± 17*

ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. Her gruptaki deney (ölçüm) sayıları Tablo'da 2. sütunda gösterilmiştir.

Siçan striatal dilimleri (0,3 mm) 20 µM fizostigmin içeren Krebs solüsyonu ile 60 dakika perfüze edildiler. Bu denge perfüzyonu

sırasında 50.-60. dakikalar arasında perfüze toplandı (kontrol dönem). 60. dakikadan başlanarak perfüzyon ortamı yüksek potasyum içeren (50 mM) Krebs ile değiştirildi ve ortama 1. sütunda belirtilen dopamin reseptör agonistleri ("agonistler" başlığı altındaki ilaçlar) belirtilen düzeylerde eklendi. Dilimler ilaç ve yüksek

Tablo 4. Dopamin reseptör agonistlerinin yüksek potasyumla perfüze edilen striatal dilimlerden kolin çıkışına etkileri.

Agonistler	N	Kolin (pmol/mg protein/10 dakika)			
		Kontrol dönem	Yüksek potasyum depolarizasyon dönemi		
			1. Dönem	2. Dönem	3. Dönem
Dopamin (mM)					
0	8	329 ± 25	462 ± 34*	366 ± 56	301 ± 24
1	8	343 ± 27	562 ± 27*	318 ± 21	196 ± 14
10	4	330 ± 28	495 ± 28*	376 ± 28	206 ± 18
100	8	337 ± 34	462 ± 34*	293 ± 26	197 ± 17
Apomorfın (mM)					
0	8	348 ± 31	418 ± 29*	380 ± 35	255 ± 19
1	8	349 ± 25	447 ± 31*	399 ± 41	178 ± 28
10	8	341 ± 35	424 ± 32*	309 ± 28	206 ± 18
100	8	337 ± 39	462 ± 34*	293 ± 26	197 ± 17
Bromokriptin (mM)					
0	4	351 ± 41	456 ± 55*	373 ± 53	209 ± 33
0,1	6	342 ± 23	548 ± 49*	302 ± 30	254 ± 27
1	4	357 ± 32	541 ± 51*	305 ± 34	222 ± 25
10	4	338 ± 19	509 ± 34	384 ± 41	211 ± 34
Pripedil (mM)					
0	7	344 ± 38	474 ± 32*	376 ± 43	221 ± 42
1	6	357 ± 38	504 ± 33*	394 ± 46	207 ± 29
10	6	348 ± 31	467 ± 23*	309 ± 38	187 ± 36
100	6	365 ± 27	509 ± 37*	384 ± 41	211 ± 34
SKF 38393 (mM)					
0	4	345 ± 43	473 ± 25*	385 ± 24	244 ± 31
1	6	333 ± 32	431 ± 32*	316 ± 34	142 ± 39
10	8	351 ± 38	540 ± 32*	348 ± 26	228 ± 40
100	8	326 ± 32	528 ± 49*	287 ± 42	235 ± 47
Kuinpirol (mM)					
0	6	344 ± 35	418 ± 31*	297 ± 18	195 ± 23
1	4	354 ± 47	458 ± 41*	346 ± 25	219 ± 18
10	5	328 ± 18	498 ± 37*	287 ± 41	179 ± 28

potasyum içeren ortamlarla 30 dakika süre ile perfüze edildiler. Bu süre içinde 10 dakikalık dönemlerde (1., 2., ve dönemler) 3 perfüze örneği toplandı. Perfüze örneklerinde (2 ml) asetilkolin silisik asit kolonları ile ayrıldı ve radio-enzimatik yöntemle ölçüldü. Perfüzattaki asetilkolin miktarları dilimlerde protein miktarına göre düzeltilerek, "pmol/mg protein/10 dakika" olarak ifade edildi. Değerler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. Her gruptaki deney (ölçüm) sayıları Tablo'da 2. sü-

tunda gösterilmiştir. *p<0.05, kendi kontrol ("0 konsantrasyon") değeri ile karşılaştırıldığında.

Striatal dilimler Tablo 3'de anlatıldığı şekilde önce normal Krebs ile, sonrada yüksek potasyumlu Krebs solüsyonu ile perfüze edildiler. Denge perfüzyonu sonunda 50.-60. dakikası arası (kontrol dönem) ve 60.-90. dakikalar arasında 10 dakikalık periyodlarla (1., 2., ve 3. dönemler) perfüze örneği toplandı.

Tablo 5. Dopamine reseptör agonistlerinin yüksek potasyumla perfüze edilen striatal dilimlerde doku asetilkolin ve kolin düzeylerine etkileri.

Agonistler	N	Asetilkolin (pmol/mg protein)		Kolin (pmol/mg protein)	
		Önce	Sonra	Önce	Sonra
Dopamin (mM)					
0	8	2237 ± 234	635 ± 55*	1237 ± 121	834 ± 78*
1	8	2100 ± 185	544 ± 76*	1137 ± 181	735 ± 109*
10	4	2237 ± 195	540 ± 95*	1309 ± 145	745 ± 96*
100	10	2335 ± 205	635 ± 95*	1241 ± 144	737 ± 98*
Apomorfın (mM)					
0	8	2557 ± 342	517 ± 56*	1207 ± 187	821 ± 76*
1	8	2817 ± 149	475 ± 34*	1146 ± 76	658 ± 122*
10	4	2818 ± 160	497 ± 43*	1408 ± 118	728 ± 107*
100	8	2657 ± 142	454 ± 42*	1178 ± 128	738 ± 118*
Bromokriptin (mM)					
0	4	2538 ± 259	569 ± 56*	1248 ± 228	856 ± 83*
0,1	4	2353 ± 224	569 ± 29*	1198 ± 208	688 ± 126*
1	4	2148 ± 226	611 ± 65*	1255 ± 175	871 ± 78*
10	4	2018 ± 225	552 ± 42*	1171 ± 189	854 ± 60*
Pripedil (mM)					
0	8	1952 ± 261	557 ± 82*	1047 ± 108	686 ± 78*
1	6	2538 ± 358	468 ± 98*	1244 ± 136	742 ± 109*
10	4	2200 ± 323	407 ± 77*	1189 ± 146	784 ± 114*
100	5	2604 ± 391	563 ± 89*	1183 ± 197	778 ± 131*
SKF 38393 (mM)					
0	7	2134 ± 234	597 ± 82*	1165 ± 110	784 ± 81*
1	5	2066 ± 296	539 ± 49*	1090 ± 107	701 ± 92*
10	8	2294 ± 210	486 ± 64*	1158 ± 118	735 ± 97*
100	6	2102 ± 225	443 ± 55*	1248 ± 135	785 ± 85*
Kuinpirol (mM)					
0	5	2225 ± 245	578 ± 69*	1247 ± 109	806 ± 87*
1	5	2153 ± 196	443 ± 96*	1086 ± 128	736 ± 45*
10	5	2008 ± 178	584 ± 82*	1351 ± 165	727 ± 92*

Perfüzât örneklerinden (2 ml) silisik asit kolonu ile ayrılan kolin radio-enzimatik yöntemle ölçüldü. Perfüzât kolin düzeyleri dilimlerdeki doku protein düzeyine göre düzeltildi ve "pmol/mg protein/10 dakika" olarak verildi. Değerler ortalama ± ortalamının standart hatası olarak verilmiştir. Her guruptaki deney (ölçüm) sayıları Tablo'da 2. sütunda gösterilmiştir. *p<0.05: kendi "1. dönem" değeri ile karşılaştırıldığında.

Striatal dilimler Tablo 3'de anlatıldığı şekilde önce 60 dakika normal Krebs ile sonra da 30 dakika yüksek potasyumlu Krebs

solüsyonu ile perfüze edildiler. Potasyumlu Krebs ile perfüzyona başlamadan önce ("önce") ve 30 dakikalık yüksek potasyumla perfüzyon sonrası ("sonra") dilimlerden örnek alındı ve doku asetilkolin ve kolin düzeyleri radio-enzimatik yöntemle ölçüldü. Doku asetilkolin ve kolin düzeyleri doku protein düzeyine göre düzeltildi ve "pmol/mg protein" olarak ifade edildi. Değerler ortalama ± ortalamının standart hatası olarak verilmiştir. Her guruptaki deney (ölçüm) sayıları Tablo'da 2. sütunda gösterilmiştir. *p<0.05-0.001: kendi "önce" değeri ile karşılaştırıldığında.

Tablo 6. Dopamin reseptör agonistlerinin elektrikle uyarılan striatal dilimlerden asetilkolin ve kolin çıkışına etkileri

Tedavi	N	Asetilkolin	Kolin
		(pmol/mg protein/saat)	(pmol/mg protein/saat)
Bazal	6	317 ± 34	1785 ± 197
Uyarılma	6	4261 ± 272	1875 ± 155
Uyarılma + Dopamin (10 mM)	6	4335 ± 205	1779 ± 233
Uyarılma + Dopamin (50 mM)	6	4247 ± 171	1655 ± 170
Uyarılma + Dopamin (100 mM)	6	4335 ± 214	2017 ± 171
Bazal	10	333 ± 36	2166 ± 263
Uyarılma	9	4882 ± 521	1720 ± 196
Uyarılma + Apomorfin (10 mM)	7	4035 ± 566	1779 ± 233
Uyarılma + Apomorfin (50 mM)	7	1900 ± 521*	2098 ± 214
Uyarılma + Apomorfin (100 mM)	7	1409 ± 294*	1901 ± 212
Bazal	13	323 ± 34	2115 ± 218
Uyarılma	12	4261 ± 243	1975 ± 108
Uyarılma + Piripedil (10 mM)	7	3582 ± 336	2058 ± 205
Uyarılma + Piripedil (25 mM)	7	3266 ± 227*	1883 ± 221
Uyarılma + Piripedil (50 mM)	7	2572 ± 228*	1875 ± 195
Uyarılma + Piripedil (100 mM)	7	2327 ± 262*	1925 ± 216
Bazal	8	348 ± 43	1965 ± 158
Uyarılma	8	3915 ± 333	2085 ± 172
Uyarılma + SKF 38393 (10 mM)	5	4583 ± 380	1938 ± 237
Uyarılma + SKF 38393 (50 mM)	4	3667 ± 292	2017 ± 132
Uyarılma + SKF 38393 (100 mM)	8	4088 ± 335	1786 ± 157
Bazal	5	338 ± 52	1865 ± 258
Uyarılma	5	4415 ± 450	2085 ± 205
Uyarılma + Kuinpirol (10 mM)	6	2258 ± 213*	1807 ± 278

Strital dilimler 20 µM fizostigmin içeren Krebs solüsyonu ile 60 dakika süre ile denge için perfüze edildiler. Bu sürenin sonunda dilimler ya bazal koşullarda ya da elektrikle uyarılarak tekrar 60 dakika süre ile perfüze edildi. Bu ikinci 60 dakikalık perfüzyon döneminde uyarılan dilimlerden bazılarının perfüzyon ortamına 1. sütunda belirtilen dopamin reseptör agonistleri belirtilen düzeylerde eklendi. İkinci dönem süresince (60 dakika) doku perfüzyonları toplandı ve silisik asit kolon işlemlerinden sonra asetilkolin ve kolin içerikleri radio-enzimatik yöntemle ölçüldü. Perfüzyon asetilkolin ve kolin düzeyleri doku protein miktarlarına göre düzeltildi ve "pmol/mg protein/saat" olarak bildirildi. Değerler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. Deney sayıları (N) 2. sütunda gösterilmiştir. *p<0.05-0.001: Kendi "uyarılma" değeri ile karşılaştırıldığında.

Strital dilimler Tablo 6'da açıklandığı şekilde dopamin agonistleri varlığında ve yokluğunda elektrikle uyarıldılar. Deney sonrası dilimler alındı ve asetilkolin ve kolin düzeyleri radio-enzimatik yöntemle ölçüldü ve proteine göre düzeltildi. Doku asetilkolin ve kolin düzeyleri "pmol/mg protein" olarak bildirilmiştir. Değerler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir. Deney (ölçüm) sayıları (N) Tabloda 2. sütunda görülmektedir.

Strital dilimler 20 µM fizostigmin içeren Krebs solüsyonu ile 60 dakika denge perfüzyonuna tabi tutuldular. Bu sürenin sonunda bazı dilimler bazal koşullarda perfüzyona devam ederken, bazıları da ya elektrikle ya da yüksek potasyumla (50 mM) uyarıldılar ve bu koşullarda 60 dakika süreyle perfüze edildiler. Elektrikle uyarılan ya da potasyumla depolarize edilen dilimler-

Tablo 7. Dopamin reseptör agonistlerinin elektrikle uyarılan striatal dilimlerde doku asetilkolin ve kolin düzeylerine etkisi.

<i>Tedavi</i>	<i>N</i>	<i>Asetilkolin</i>	<i>Kolin</i>
		<i>(pmol/mg protein)</i>	<i>(pmol/mg protein)</i>
Bazal	6	2455 ± 143	1123 ± 87
Uyarılma	6	1843 ± 178	1090 ± 45
Uyarılma + Dopamin (10 mM)	6	1735 ± 212	1009 ± 135
Uyarılma + Dopamin (50 mM)	6	1743 ± 202	987 ± 70
Uyarılma + Dopamin (100 mM)	6	1677 ± 167	1125 ± 45
Bazal	10	2880 ± 270	1397 ± 268
Uyarılma	10	1603 ± 190	1222 ± 90
Uyarılma + Apomorfin (10 mM)	4	2145 ± 220	1165 ± 140
Uyarılma + Apomorfin (50 mM)	4	2260 ± 105	1120 ± 344
Uyarılma + Apomorfin (100 mM)	6	2005 ± 105	1455 ± 140
Bazal	12	2304 ± 160	1127 ± 90
Uyarılma	12	1825 ± 180	980 ± 90
Uyarılma + Piripedil (10 mM)	4	1685 ± 260	890 ± 135
Uyarılma + Piripedil (25 mM)	7	1875 ± 170	950 ± 50
Uyarılma + Piripedil (50 mM)	4	1970 ± 150	955 ± 35
Uyarılma + Piripedil (100 mM)	12	1860 ± 160	1020 ± 75
Bazal	8	2318 ± 145	1175 ± 130
Uyarılma	8	1830 ± 80	1218 ± 254
Uyarılma + SKF 38393 (10 mM)	5	1860 ± 125	1325 ± 200
Uyarılma + SKF 38393 (50 mM)	4	1605 ± 100	935 ± 120
Uyarılma + SKF 38393 (100 mM)	8	1740 ± 45	1428 ± 167
Bazal	5	2508 ± 175	1265 ± 160
Uyarılma	5	1815 ± 150	985 ± 205
Uyarılma + Kuinpirol (10 mM)	6	2020 ± 140	1293 ± 160

den bazalarına perfüzyon ortamına 1. sütunda belirtilen dopamin agonistleri belirtilen düzeylerde eklendi. İkinci 60 dakikalık bazal ya da uyarılma koşullarında perfüzyon sonrası, dilimler alındı total fosfolipid düzeyleri ölçüldü ve doku DNA düzeyine göre düzeltildi.

Total fosfolipid düzeyi "nmol/µg DNA" olarak ifade edilmiştir. Değerler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak bildirilmiştir. Deney (ölçüm) sayıları (N) tabloda 2. sütunda gösterilmiştir.

Tablo 8. Dopamin reseptör agonistlerinin yüksek potasyumla ya da elektrikle uyarılan striatal dilimlerde doku total fosfolipid düzeylerine etkisi.

Tedavi-Perfüzyon durumu	Total Fosfolipid		
	N	(nmol/mg DNA)	(% Bazal)
1. Yüksel Potasyumla Depolarizasyon			
Bazal	20	35,8 ± 0,7	100 ± 2
Depolarizasyon	25	36,2 ± 0,6	101 ± 2
Depolarizasyon + Dopamin (100 mM)	6	35,5 ± 1,5	98 ± 4
Depolarizasyon + Apomorfin (100 mM)	6	35,8 ± 1,3	100 ± 4
Depolarizasyon + Piripedil (10 mM)	6	34,9 ± 1,8	97 ± 5
Depolarizasyon + Piripedil (25 mM)	6	36,5 ± 2,0	102 ± 6
Depolarizasyon + Piripedil (50 mM)	6	35,4 ± 1,0	98 ± 3
Depolarizasyon + Piripedil (100 mM)	6	36,1 ± 1,0	101 ± 3
Depolarizasyon + SKF 38393 (100 mM)	6	36,1 ± 1,1	101 ± 6
Depolarizasyon + Kuinpirol (10 mM)	6	36,2 ± 1,5	101 ± 5
2. Elektriksel Uyarılma			
Bazal	23	35,2 ± 0,9	100 ± 3
Uyarılma	21	31,0 ± 1,0	93 ± 3
Uyarılma + Dopamin (100 mM)	6	31,0 ± 1,5	88 ± 5
Uyarılma + Apomorfin (100 mM)	6	29,8 ± 1,3	85 ± 4
Uyarılma + Piripedil (10 mM)	5	34,5 ± 2,2	98 ± 6
Uyarılma + Piripedil (25 mM)	8	33,5 ± 2,0	95 ± 6
Uyarılma + Piripedil (50 mM)	6	33,4 ± 1,0	95 ± 3
Uyarılma + Piripedil (100 mM)	10	32,1 ± 1,0	91 ± 3
Uyarılma + SKF 38393 (100 mM)	8	33,1 ± 2,1	94 ± 6
Uyarılma + Kuinpirol (10 mM)	6	32,0 ± 1,3	91 ± 4

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. Çok

değerli destekleri için çalışmanın yapıldığı dönemde anabilim dalı başkanı olan Prof. Dr. Burhan K. Kıran'a ve çalışmalarda teknik yardımları olan Dr. R. Levent Büyükuysal, Dr. Nezahat Kaya ve Ahmet Demirebilek'e teşekkür ederim.

Kaynaklar

1. Anda M, Iwara M, Takahama K, Nagata Y. Effects of extracellular choline concentration and K4 depolarization on choline kinase and choline acetyltransferase activities in superior cervical sympathetic ganglia excised from rats. *J Neurochem* 1987; 48: 1448-1453.
2. 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.
3. 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.
4. Blusztajn JK, Holbrook PG, Lakher M, Liscovitch M, Maire JC, Mauron C, Richardson UI, Tacconi M, Wurtman RJ. "Autocannibalism" of membrane choline-phospholipids: physiology and pathology. *Psychopharmacological Bull* 1986; 22: 781-786.
5. Wurtman RJ. Choline metabolism as a basis for the selective vulnerability of cholinergic neurons. *TINS* 1992; 15: 117-122.
6. Tan CO, Bullock D. A dopamine-acetylcholine cascade: stimulating learned and lesion-induced behaviour of striatal cholinergic interneurons. *J Neurophysiol* 2008; 100: 2409-2421.

7. 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.
8. Exley R, Cragg SJ. Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 5283-5297.
9. 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.
10. Stoof JC, Keabian JW. Independent in vitro regulation by the D-2 dopamine receptor of dopamine-stimulated efflux of cyclic AMP and K+-stimulated release of acetylcholine from rat striatum. *Brain Res* 1982; 250: 263-270.
11. Gorell JM, Czarnecki B. Pharmacological evidence for direct dopaminergic regulation of striatal acetylcholine release. *Life Sci* 1986; 38: 2239-2246.
12. Gorell JM, Czarnecki B, Hubbell S. Functional antagonism of D1 and D2 dopaminergic mechanism affecting striatal acetylcholine release. *Life Sci* 1986; 38: 2247-2254.
13. Drukarch B, Schepens E, Schoffelmeer AN, Stoof JC. Stimulation of D-2 dopamine receptors decreases the evoked in vitro release of [3H] acetylcholine from rat neostriatum: role of K+ and Ca2+. *J Neurochem* 1989; 52: 1680-1685.
14. Wang H-Y, Zhou L-W, Friedman E, Weiss B. Differential regulation of release of acetylcholine in the striatum in mice following continuous exposure to selective D1 and D2 dopaminergic agonists. *Neuropharmacol* 1993; 32: 85-91.
15. Gilberstadt ML, Russell JA. Determination of picomole quantities of acetylcholine and choline in physiological salt solutions. *Anal Biochem* 1984; 138: 78-85.
16. Goldberg AM, McCaman RE. The determination of picomole amounts of acetylcholine in mammalian brain. *J Neurochem* 1973; 20: 1-8.
17. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
18. Savanborg A, Svennerholm L. Plasma total lipids, cholesterol, triglycerides, phospholipids and free fatty acids in a healthy Scandinavian population. *Acta Med Scand* 1961; 169: 43-49.
19. 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.
20. Buyukuyal RL, Wurtman RJ. 4-Aminopyridine increases acetylcholine release without diminishing membrane phosphatidylcholine. *J Neurochem* 1990; 54: 1302-1309.
21. Ulus IH, Buyukuyalş 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.
22. Corradetti R, Lindmar R, Loffelholz K. Mobilization of cellular choline by stimulation of muscarinic receptors in isolated chicken heart and rat cortex in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 226: 826-832.
23. Zeisel S. Formation of unesterified choline by rat brain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1985; 835: 331-343.
24. Suarez-Roca H, Lovenberg T, Cubeddu LX. Comparative dopamine-cholinergic mechanism in the olfactory mechanism in the olfactory tubercle and the striatum: effects of metoclopramide. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 243: 840-851.
25. Browning ET. Free choline formation by cerebral cortical slices from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 45: 1985-1990.
26. Freeman JJ, Jenden DJ. The source of choline for acetylcholine synthesis in brain. *Life Sci* 1976; 19: 949-962.
27. Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *TINS* 1995; 18: 527-535.
28. 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. *Neurobiol Dis* 2009; 34: 545-552.