

Kolinerjik Fötal Septal Greftlerde Muskarinik Reseptör Bağlanması

Muammer DOYGUN*
Nezihat KAYA**
Sait UYSAL***
Ender KORFALI****
İ. Hakkı ULUS*****

ÖZET

Fimbria rezeksiyonu yapılarak septo-hipokampal kolinerjik sistemde lezyon meydana getirilen erişkin sıçanlarda (n: 34) kavite açılmasından 10 gün sonra 15-16 günlük sıçan fetuslarının ventral önbeyinlerinden alınan nöral dokular implante edildi (n: 10). Nöral greftlerin ve diyetle verilen kolinin muskarinik reseptörler üzerindeki etkileri araştırıldı. Greftlemeden 3 ay sonra yapılan dekapitasyonda sham kontrol grupta boş kavite gözlenirken, greft grubunda bütün sıçanlarda kavite içinde greft dokusu gözlemlendi. Tüm gruplardaki sıçanların sağ ve sol hipokampusları çıkarılarak maksimum ³H-QNB bağlanma kapasitesi incelendi. Sham gruptaki sıçanlar normal gruba göre ³H-QNB bağlanması düşük bulunurken, greft grubunda normal değerlere yükseldiği saptandı. Diyetle kolin vermekle ³H-QNB bağlanma kapasitesinde artma olmadı.

* Yrd. Doç. Dr.; U.Ü. Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı

** Araş. Gör.; U.Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

*** Uzm. Dr.; Fevzi Çakmak Hastanesi Nöroşirürji Uzmanı

**** Prof. Dr.; U.Ü. Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı

***** Prof. Dr.; U.Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

SUMMARY

Muscarinic Receptor Binding in Cholinergic Fetal Septal Grafts

Fetal ventral forebrain tissues obtained from 15-16 day old fetuses were implanted into cavities 10 days after fimbria resection for destruction of septo-hippocampal cholinergic pathways. 3 months after grafting all the grafts were found survived and filled the cavity. After decapitation in all groups left and right hippocampus were removed and 3H-QNB binding capacity were measured. There was significant decline in 3H-QNB binding in sham group ($p < 0.001$). In grafted group 3H-QNB binding restored to normal values ($p < 0.001$). Feeding the rats alone with choline did not have any effect on receptor binding capacity.

GİRİŞ

Alzheimer hastalığı olan hastalarda ve serebral korteksleri denerve edilmiş sıçanlarda elde edilen korteks örneklerinde kolin asetiltransferaz (KAT) enzim aktivitelerinde ve M₂ muskarinik reseptör sayısında azalma olduğu gösterilmiştir^{1,2}.

Alzheimer Hastalığı modeli yaratılmış sıçanlarda, fetal kolinerjik greftlerin yaşadığı ve fonksiyon gördüğü, spontan motor aktivite ve KAT enzim aktivitesi tayinleri ile gösterilmiştir³. Ancak yaptığımız literatür taramasında kolinerjik fetal septal greftlerde muskarinik reseptör bağlanması ile ilgili fazla literatüre rastlanmamıştır.

Çalışmamızın amacı, Alzheimer Hastalığı modeli oluşturulan sıçanlarda, muskarinik reseptör bağlanmasındaki azalmayı gösterdikten sonra, Fimbriyaya fetal septal greft implantasyonu yaparak reseptör bağlanmasındaki değişiklikleri incelemek ve ayrıca kolinli diyetle beslenen sıçanlarda olabilecek değişiklikleri incelemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyde Wistar cinsi deney başlangıç ağırlıkları 180-220 g olan 34 sıçan kullanıldı. Verici olarak aynı cins sıçanların 15.-16. günlük fötusları kullanıldı.

Deneyde sıçanlar 3 gruba ayrıldılar:

1. Normal sıçan grubu (n: 10): Hiçbir cerrahi işlem yapılmayan bu grup ölçümlerde normal değerlerin saptanması için kullanıldı.

2. Sham kontrol grubu (n: 10): Sağ fimbriya rezeksiyonu yapılarak Alzheimer Hastalığı modeli oluşturulan grup.

3. Greft grubu (n: 12): Sağ fimbriya rezeksiyonu yapıldıktan 10 gün sonra fetal septal greft konan sıçan grubu.

Ayrıca bu gruplar kendi aralarında ikiye ayrılarak bir grup kolinli, diğer grup normal diyetle beslendi.

Bütün cerrahi işlemler sodium tiopental (40 mg/kg) anestezisi altında ve steril şartlar altında yapıldı. Greft yeri Björklund ve arkadaşlarının tarif ettiği şekilde sağ koronel sütürün hemen arkasına (Bregmadan 1 mm kaudal 1 mm lateral) 2 mm'lik bir kraniektomi yapılarak dura açıldı⁴. Kortikal doku ve korpus kallozum aspire edilerek fimbriya görülerek aspire edildi ve 2-3 mm³lük greft kavitesi açıldı. Kavitasyondan 10 gün sonra gebeliğinin 15.-16. günlerinde bulunan sıçanlara laparotomi yapılarak fötuslar alındı. Ringer Laktat içinde beyinleri çıkarılarak ventral ön beynin heriki hemisfer açıklığının ventro-medialinden 2-3 mm³lük fötal septal greft alınarak daha önce hazırlanan kavitelere konuldu⁵. Greftlemeden sonra her gruptaki sıçanlar ikiye ayrılarak bir grubu normal diyetle beslenirken, ikinci gruba içme sularına Kolin klorür (15 mg/kg/gün) ilave edilerek beslendi.

Greftlemeden 10-12 hafta sonra sıçanlar dekapite edilerek beyinleri hızla çıkarıldı. Buzda soğutulmuş, bir cam üzerinde Pellegrino ve Cushman'ın stereotaksik atlasından yararlanılarak hipokampus dokusu çıkarıldı ve bu dokular süratle donduruldu⁶. - 20°C'de saklanan bu hipokampus dokuları hassas terazi (Mettler H₂O) ile tartılarak, 10 hacim 0.32 M sukroz solüsyonu içinde cam teflon öğütücüleri ile öğütüldü. Soğutmalı santrifüjde (Sorval RCS-8) 10 dakika süreyle 1000 g döndürüldü. Daha sonra süpernatant 18000 g da 20 dakika süreyle yeniden döndürüldü. Elde edilen çöküntü sodyum-potasyum fosfat tamponu (50 mM, pH 7.4) içinde 0.2 ml de 1 mg doku olacak şekilde yeniden homojenize edildi (Ultra-Turrax kullanılarak). Bu membran parçaları radyoligant bağlaması yapılanaya kadar - 20°C'de saklandı.

³H-QNB bağlanması Yamamura ve Snyder'in metoduna göre yapıldı⁷. Hazırlanan membran homojenatları 0.2 ml olarak plastik tüplere alındı. Takiben değişik konsantrasyonlarda (0.2-3.2x10⁻⁹ M) ³H-Kinüklidinil benzilat (³H-QNB) tüplere eklendi. Bir seri tüpe muskarinik reseptörleri işgal etmek ve spesifik olmayan bağlanmayı bulmak için atropin (son konsantrasyonu 10 mikromolar) eklendi. Membranlar 60 dakika süreyle 37°C'de inkübe edildiler. Takiben vakum altında GF/B filtrelerden süzülme ve filtreler 5 ml soğuk fosfat tamponu ile üç kez yıkandı. Daha sonra filtreler likit skintilasyon sayım şişelerine alındı ve toluene dayalı sayım ortamında (49 PPO + 100 mg POPPO/1L Toluene) radyoaktiviteleri ölçüldü (Packard, Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, Model 3385). Atropinsiz ve atropinli serilerin farkları alınarak-spesifik bağlanma bulundu ve konsantrasyon bağlanma-satürasyon ilişkileri Scatchart analizi⁸ ile belirlendi. Protein tayini Lowry ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı⁹.

BULGULAR

Greftlemeden 12 hafta sonra yapılan dekapitasyonda; Sham kontrol grupta tüm sıçanlarda sağda fimbriyanın kesilmiş olduğu, greft konan grupta ise greftlerin greft kavitesini doldurduğu gözlemlendi.

Tüm gruplarda radyoaktif $^3\text{H-QNB}$, konsantrasyona bağlı olarak incelenen sağ ve sol hipokampus dokularının tamamında doyurulabilir tarzda bir bağlanma özelliği gösterdi (Tablo: I).

Tablo: I - Kolinli ve Normal Diyetle Beslenen Sıçanlarda Greftin Hipokampusta $^3\text{H-QNB}$ Bağlanması Etkisi

Normal Diy. Bes. Gruplar	n	3H-QNB Bağlanması	
		Sağ Hip.	Sol Hip.
Normal kon.	6	1711 ± 65	171.9 ± 141
Sham kon.	6	1217 ± 102*	2120 ± 91
Septal greft	6	1680 ± 110**	1934 ± 123
Kolinli Diy. Bes. Gruplar			
Normal kon.	6	1804 ± 152	1826 ± 75
Sham kon.	4	1428 ± 7*	2386 ± 196
Septal greft	6	1711 ± 131**	2084 ± 124

* $p < 0.001$ Sham grup normal grupla karşılaştırıldığında

** $p < 0.001$ Greft grubu Sham kontrolle karşılaştırıldığında

Bu ölçümlerde normal kontrol grubu-sham kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sham kontrol grupta kavitenin açıldığı tarafta maksimum $^3\text{H-QNB}$ bağlanmasında istatistiki olarak anlamlı bir düşme saptandı ($p < 0.001$). Greft grubu ile sham kontrol grubu karşılaştırıldığında sağ hipokampusta maksimum $^3\text{H-QNB}$ bağlanması normale döndü ($p < 0.001$).

Kolinli diyetle beslenen grupların $^3\text{H-QNB}$ bağlanmasının maksimum değerleri Tablo: I'de gösterilmiştir.

Kolinli normal kontrol grupla sham kontrol grup karşılaştırıldığında, kolin verilmeyen gruplarda olduğu gibi sham kontrol grupta da kavitenin açıldığı tarafta istatistiki olarak anlamlı bir düşme saptandı ($p < 0.001$). Septal greft grubu ile sham kontrol grubu karşılaştırıldığında, sağ hipokampustaki $^3\text{H-QNB}$ bağlanması normale döndü ($p < 0.002$). Kolinli diyetle beslenmekle sağ hipokampusta $^3\text{H-QNB}$ bağlanmasında bir artış gözlenmedi.

Kolinli ve normal diyetle beslenen tüm gruplarda, sol hipokampusta $^3\text{H-QNB}$ bağlanması normal kontrol gruplarda eşit çıkarken, sham kontrol ve greft grubunda oldukça yüksek bulundu.

Hipokampus bilindiği gibi kolinerjik innervasyon bakımından oldukça yoğun bir dokudur^{10.11}. Muskarinik reseptörlerin büyük bir çoğunluğu kolinerjik sinir uçlarında yerleşmiştir^{12.13.14.15.16.17}. Hipokampusta ³H-QNB bağlanması ile KAT enzim seviyeleri arasında pozitif bir korrelasyon olduğu ileri sürülmektedir^{18.19.20.21.22}. Son yıllarda yapılan çalışmalarda beyin ve periferik dokularda muskarinik reseptörlerin özelliklerine sahip yerlere ³H-Asetilkolinin süratli, reversibl ve yüksek affinite ile bağlandığı gösterilmiştir^{1.23.24.25.26}. Aynı yıllarda yapılan diğer çalışmalarda, fonksiyonel parametre olarak nörotransmitter salıverilmesini kullanarak ve presinaptik muskarinik reseptörler aracılığı ile olan salıverilmenin düzenlenmesinde agonist ve antagonistlerin karşılaştırmaları yapılarak, beyindeki muskarinik reseptörler hakkında daha detaylı bilgiler edinilmiştir^{13.15.24.27.28}.

Kaseda ve arkadaşları fimbriya-forniks lezyonlu sıçanlarda septal hücre greftlerinin hipokampusta yüksek affiniteli kolin uptake'yi restorasyonu ile ilgili yapmış oldukları çalışmalarında ³H-QNB'nin hipokampusa bağlanmasını, sham grup sıçanlardan anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır²⁹.

Çalışmamızda, fimbriya rezeksiyonu yapılan sıçanlarda rezeksiyon yapılan tarafta muskarinik reseptör bağlanmasının azaldığı, septal greft implante edilen sıçanlarda ise muskarinik reseptör bağlanmasının anlamlı bir şekilde normal grup sıçanların seviyesine çıktığı saptandı. Yamamura, Synder ve arkadaşlarının çalışmalarında da çalışmamıza benzer sonuçlar bulunmuş ancak reseptör bağlanmasındaki bu artışların tüm hipokampus dokusunda aynı olmadığı ifade edilmiştir⁷.

Yine Kaseda ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada fimbriya rezeksiyonu yapılan sıçanlarda fötal septal greft implantasyonundan 9-14 hafta sonra hipokampal muskarinik reseptör bağlanmasının değişik cevapları alınmış ve bu sonuçların hipokampustaki kolinerjik innervasyonun geniş defisiti ve ³H-QNB bağlanmasının redüksiyonu için bu sürenin yeterli olmaması ile açıklanmışlardır²⁹. Dawson ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalarda ise, implantasyondan 6 ay sonra hipokampus muskarinik reseptörlerinin "up-regulationu" olduğu gösterilmiştir³⁰.

Sonuç olarak fibriya rezeksiyonu yapılan sıçanlarda fötal septal greft implantasyonundan sonra hipokampusta muskarinik reseptör bağlanma kapasitesinde bir yükselme görülmektedir. Greftli sıçanların içme sularına kolin klorür ilave etmekle muskarinik reseptör bağlanmasında verilmeyenlere göre anlamlı bir artış olmamaktadır. Bu bulgular ileride Alzheimer hastalığının tedavisinde fötal septal greftlerin kullanılabilirliğini gündeme getirmektedir.

KAYNAKLAR

1. MASH, D.C., POTTER, L.T.: Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarinic receptors in the rat brain. *Neurosci.*, 19:551-554, 1986.
2. MASH, D.C., FLYNN, D.D., POTTER, L.T.: Loss of muscarinic receptors in the cerebral cortex in Alzheimer disease and experimental cholinergic denervation. *Science*, 228:1115-1117, 1985.
3. UYSAL, S., DOYGUN, M., KORFALI, E., AKSOY, K.: Fimbriya rezeksiyonu yapılan erişkin sıçanlarda kolinerjik fötal septal greftlerin kolinasetiltransferaz enzim aktivitesi ve spontan motor aktivite üzerine etkileri. *Türk Nöroşirürji Dergisine* yayınlanmak üzere kabul edildi.
4. BJORKLUND, A., STENEVI, U., SCHMIDT, R.H., DUNNETT, S.B., GAGE, F.H.: Intracerebral grafting of neural cell suspensions: I. Introduction and general methods of preparation. *Acta Phsiol. Scand.*, 522:1-7, 1983.
5. DAS, G.D., HALLAS, B.H.: Transplantation of brain tissue in the brain of adult rats. *Experientia*, 34:1304-1306, 1978.
6. PELLEGRINO, L.J., CUSHEMAN, A.J.: A stereotaxic atlas of the rat brain, New York, Meredith Publishing Company, 1967.
7. YAMAMURA, H.I., SYNDER, S.H.: Muscarinic cholinergic binding in rat brain, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71:1725-1729, 1974.
8. SCATCHARD, G.: The attraction of the proteins of small molecules and ions. *Ann. New York Acad. Sci.*, 51:660-672, 1949.
9. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
10. ULUS, İ.H., HIRSCH, M.J., WURTMAN, R.J.: Trans syiaptic induction of adrenomedullary tyrosine hidroksilase activity by choline: Evidence that choline administration can increase cholinergic transmission, *Proc. Nat Acad. Sci.* 74:798-800, 1977.
11. JOPE, R.S., JENDEN, D.J., SUPRAMANIAN, CS, DHOPESHWARKEN, G.A., DUNCAN, J.: Biochemical effects of phosohatidylcholine treatment in rats, *Biochem. Pharmacol.*, 33:793-798, 1984.
12. GASH, D., SLADEK, J.R., SLADEK, C.D.: Functional development of grafted vasopressin neurons, *Science*, 210:1367-1369, 1980.
13. CUELLO, A.C., SOFRONIEW, M.V.: The anatomy of the CNS cholinergic neurons. *Trends in Neurosciences*, 7:74-78, 1984.
14. MC INTOSH, F.C.: Synthesis and storage of acetylcholine in nervous tis-

- sue, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 41:2555-2571, 1963.
15. BEN-BORAK, J., GAZIT, H., SILMAN, I., DUDAI, Y.: In vivo modulation of the number of muscarinic receptors in rat brain by cholinergic ligands, *European J. Pharmacol.*, 74:73-81, 1981.
 16. SCHWARTZ, R.D.: Autoradiographic distribution of high affinity muscarinic and cholinergic receptors labeled with (3H) acetylcholine in rat brain. *Life Sciences*, 38:2111-2119, 1986.
 17. PILCH, H., MULLER, W.E.: Chronic treatment with choline or scopolamine indicates the presence of muscarinic cholinergic receptor plasticity in the frontal cortex of young but not of aged mice, *J. Neural. Transm.*, 71:39-43, 1988.
 18. HARIK, S.I., SHARMA, V.K., WETHERBEE, J.R., WARREN, R.H., BONERJEE, S.P.: Adrenergic and cholinergic receptors of cerebral microvessels, *J. Cerebral Blood Flow Metabol.*, 1:329-338, 1981.
 19. KRYJEVIC, K.: Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates, *Physiol. Rev.*, 54:418-540, 1974.
 20. SIMON, J.R., ORDERFEL-NOVAK, B., FELTEN, D.L., APRISON, M.H.: Distribution of choline acetyltransferase muscarinic receptor binding and choline uptake in discrete areas of the rat medulla oblongata, *Neurochem. Res.*, 6:497-505, 1981.
 21. EAST, J.M., DUTTON, G.R.: Muscarinic binding sites in developing normal and mutant mouse cerebellum, *J. Neurochem.*, 34:657-661, 1980.
 22. KAMIYA, H.O., ROTTER, A., JACOBOWITZ, D.M.: Muscarinic receptor binding following cholinergic nerve lesions of the cingulate cortex and hippocampus of the rat, *Brain. Res.* 209:432-439, 1981.
 23. SKOLOVSKY, M., CHEN-ARMON, M., EGOZI, Y., GURWIZY, O., HENIS, Y.I., KLOOG, Y., MOSCONA-AMIR, E., SCHREIBER, G.: Modulation of muscarinic receptors and their interactions, *TIPS*, 11:39-43, 1986.
 24. SCHWARTZ, R.D.: Autoradiographic distribution of high affinity muscarinic and nicotinic cholinergic receptors labelled with (3H) acetylcholine in rat brain, *Life Sciences*, 38:2111-2119, 1986.
 25. NORDBERG, A., WIMBLAD, B.: Cholinergic receptors in human hippocampus regional distribution and variance with age, *Life Sciences*, 23:1937-1944, 1981.
 26. KLEIN, W.L., NATHANSON, N., NIRENBERG, M.: Muscarinic acetylcholine receptor regulation by accelerated rate of receptor loss, *Biochem. Biophysical Res. Com.*, 90:506-512, 1979.

27. EHRENPREIS, S.: Possible nature of the cholinergic receptor, Ann. New York Acad. Science, 144:720-736, 1967.
28. HENDERSON, V.W., FINCH, C.E.: The neurobiology of Alzheimer's disease, Review article J Neurosurg, 70:335-353, 1989.
29. KASEDA, Y., SIMON, J.R., LOW, W.C.: Restoration of high affinity choline uptake in the hippocampal formation following septal cell suspension transplants in rats with fimbria-fornix lesions, J Neurochem., 53:482-488, 1989.
30. DAWSON, V.L., GAGE, F.H., WANSLEY, J.K.: Alterations in muscarinic binding in rat hippocampus provides evidence for functional reinnervation of fimbria-fornix lesions by fetal septal transplants, Soc. Neurosci. Abstr. 14:588, 1988.

Yrd. Doç. Dr. Muammer DOYGUN
U.Ü. Tıp Fakültesi
Nöroşirürji Anabilim Dalı
BURSA