

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİMDALI

**KOLİNERJİK SİSTEMİN ÖĞRENME VE HAFIZA
İŞLEVLERİNDEKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİNDE
HEMİKOLİNYUM-3 VE
ANALOĞU A-4'ÜN KULLANILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. AHMET ÇORAK

İSTANBUL - 1996

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİMDALI

KOLİNERJİK SİSTEMİN ÖĞRENME VE HAFIZA
İŞLEVLERİNDEKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİNDE
HEMİKOLİNYUM-3 VE
ANALOĞU A-4'ÜN KULLANILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. AHMET ÇORAK

İSTANBUL - 1996

KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolin Esteraz
ChAT	Kolinasetil Transferaz
SDHACU	Sodyuma bağımlı yüksek afiniteli kolin geri alınımı
SILACU	Sodyumdan bağımsız düşük afiniteli kolin geri alınımı
sf	Serum fizyolojik
mmol	milimol
μmol	mikromol
pmol	pikomol
HC-3	Hemikolinyum-3
NMDA	N-Metil-D-Aspartik asit
isv	intraserebroventriküler
ip	intraperitoneal
MWM	Moris su tankı
PAR	Pasif kaçınım yanıtı
nBM	Nükleus Bazalis Magnoselülaris
MS	medyal setum
VDB	Vertikal Diagonal bant
mAChR	muskarinik asetil kolin reseptörü

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER.....	2-22
------------------------------	------

Öğrenme ve hafıza işlevlerinin anatomik bölgeleri
Ön Beyin Tabanı
Öğrenme Ölçümü İçin Geliştirilen Cihazlar (maze)
Santral Kolinerjik Sistem ve Öğrenme
Asetilkolin Sentezi ve Kolin Geri Alınım Mekanizması
Geri alımın inhibitörü olarak AF64A
Hemikolinyum-3 (HC-3) ve A-4

ARAÇ-GEREÇ VE YÖNTEM.....	23-28
---------------------------	-------

Deney Hayvanları ve Genel Cerrahi İşlemler
İntraserebroventriküler Kanülasyon
Pasif Kaçınım Testi
Lokomotor Aktivite Testi (Rot-a-Rod)
Histolojik kontrol (isv kontrol)
İstatistiksel Değerlendirme

SONUÇLAR.....	29-36
---------------	-------

TARTIŞMA.....	37-41
---------------	-------

ÖZET VE SUMMARY.....	42
----------------------	----

KAYNAKLAR	43-49
-----------------	-------

GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Öğrenme ve hafıza ile ilgili edindiğimiz bilgiler, temel ve klinik bilimlerde çok sayıda deneysel ve gözlemsel araştırmaya dayanmaktadır. Bu çalışmalar moleküler biyoloji, hücresel sinirbilim, yapay sinir ağları, davranış bilimi, psikoloji ve psikiyatriye kadar uzanmaktadır (1).

Sinir sistemi bulunan canlılar için öğrenmenin tanımı şöyle yapılabilir; öğrenme, “geçmişteki deneyimlerle oluşan bilginin gelecekte yaşama şansını artırmak üzere canlı tarafından kullanılması”dır (2). Bu işlev bilginin saklanması içerir. Bu depolama işlemi santral sinir sisteminde meydana gelen değişiklikler tarafından oluşturulmaktadır. Bu şekilde tecrübelerin, yani öğrenmenin sinir sistemini değiştirdiği düşünülmektedir. Ancak öğrenme için yapılan en geniş tanım "yinelenen uyaranlara karşı değişen yanıt" şeklinde olmaktadır. Bu tanıma göre sinir sistemine sahip olmadığı bilinen bakteriler ve protozoalar bile öğrenme işlevine sahiptirler. Yinelenen uyaranlara davranışsal adaptasyon, yaşayan bütün canlıların ortak özelliğidir (3).

Öğrenme, nonasosiyatif ve asosiyatif olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Özellikle "Aplysia Californica" isimli deniz salyangozu dev sinir hücreleriyle bu konuda demonstratif bilgiler sağlamıştır. Nonasosiyatif öğrenme de habituasyon ve sensitizasyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Zararsız bir uyarana karşı bir süre sonra uyarılma eşiği yükselmekte (habituasyon), zararlı bir uyarana karşı ise bu eşik düşürülmektedir (sensitizasyon) (1).

Asosiyatif öğrenme, klasik şartlanma ve operant şartlanma (enstrumantal, Skinner) olarak ikiye ayrılmaktadır. İlk kez Pavlov tarafından tanımlanan klasik şartlanma, normalde denekte tepkiye neden olmayan nötr bir uyarın (şartsız uyarın) ile şartlı bir uyarının arka arkaya uygulanması sonucu, şartlı uyarana karşı oluşan tepkinin şartsız uyarana da verilmesi ile sonuçlanan bir öğrenme şeklidir. Operant şartlanma ise, deneğin nötr bir hareketi (bir levveyi indirmek gibi) başlangıçta rastlantısal olarak yapmasının sonucunu (ödüllendirme ya da cezalandırma tarzında) öğrenmesini kapsar (3).

Çeşitli araştırmalarda deklaratif-nondeklaratif (refleksif), prosedürel, semantik, epizodik, uzaysal, uzun süreli-kısa süreli, referans-working hafıza gibi değişik öğrenme ya da hafıza biçimleri tanımlanmaktadır (4).

Kısa süreli ve uzun süreli hafızanın mekanizmaları hakkında Donald Hebb'in 1949'da ileri sürdüğü hipotezler hala geçerliliğini korumaktadır. Ancak bu tarihten sonra öğrenme ve hafıza ile ilgili araştırmalarda sayı açısından büyük bir patlama yaşanmıştır. Bir telefon numarasını bir kaç saniye akılda tutmak kısa süreli hafızaya örnek verilmektedir. Bu geçici işlevin, ilgili nöronların sürekli aktivasyonu ile sağlandığı düşünüldüğünden "çalışan hafıza" (working memory) da denmektedir. Geçici oluşu hayatın önemsiz ayrıntılarını unutmaya olanak sağlamaktadır. Anestezi ya da bir kafa travması sonucu oluşan bilinç kaybından hemen önceki olayların hatırlanamaması, yapısal olmaktan çok, "çalışan hafıza" modeline uymaktadır. Bu hafıza çeşidinin, "tampon hafıza" gereksinimini karşıladığı düşünülmektedir. Sürekli ateşlenen bu nöronal devreler (reverberating circuits) protein sentezinin de işe karıştığı bir süreç sonunda, uzun süreli hafızanın oluşmasını sağlamaktadırlar. Bu sürece "konsolidasyon" adı verilmektedir. Kısa süreli hafızanın geçici ve labil oluşu, onun fizyolojik bir süreç olduğunu düşündürür iken, uzun süreli hafıza yapısal bir karakter taşımaktadır (6)

Aplysia'nın solungaç geri çekilme refleksi üzerinde yapılan çalışmalar sensitizasyon şeklindeki öğrenme biçiminin, ara nöronların presinaptik fasilitasyon fonksiyonları sonucu oluştuğunu göstermiştir. Akso-aksonik olan bu sinapsın transmitteri serotonindir. Serotonin G proteini üzerinden adenilat siklazı aktiflemekte ve duysal sinir terminallerinde sıklık AMP'nin aracılık ettiği bir dizi olay sonucunda sinapsta fasilitasyon meydana gelmektedir (1, 3).

Öğrenme ve hafıza işlevlerinin anatomik bölgeleri

1950' lerde hipokampal hasarın öğrenme ve hafıza bozukluğuna sebep olduğunu ve hafızanın çeşitli bileşenlerden oluştuğunu göstermiştir (1). Bilateral medyal temporal lobektomi ve ön (2/3) hipokampektomi yapılan ve lateral neokorteksin sağlam bırakıldığı bir hastada kısa süreli hafızanın bozulduğu gösterilmiştir. Öğrenme sürecindeki bu bozukluğa karşın hastada bilginin geri çağırılması (geçmiş yaşantıyı hatırlama) işlevi ise bozulmamıştır. Bir diğer olguda ise uzun süreli hafıza testlerinde başarılı olan bir hasta kısa süreli hafıza testlerinde başarısız bulunmuştur. Yapılan araştırma sonucu hastanın sol beyin korteksinin perisilviyan bölgesinin hasarlı olduğu saptanmıştır. Beyin iskemisi sonucunda

hippokampal CA1 bölgesi nöronları tamamen ortadan kalkan başka bir olguda retrograd amnezi görülmemiş, ancak gün içinde öğrendiklerini sürekli unutan hastanın kısa süreli hafıza testlerinde başarısız olduğu gözlenmiştir (1). Böylelikle hippokampusun deklaratif öğrenme ve kısa süreli hafıza ile ilgili olduğu, bu süreyi aşınca hafızanın hippokampustan bağımsız hale geldiği anlaşılmaktadır.

Kısa ve uzun süreli hafızanın anatomik bölgeleri üzerinde yapılan daha ayrıntılı çalışmalarda (operand delayed matching task) fimbria-forniks gibi medyal septum ve diyagonal banttan gelen kolinerjik aferentleri hippokampusa ileten liflerin haraplanmasıyla kısa süreli hafıza bozukluklarının ortaya çıktığı, buna karşılık ön beyin tabanındaki nükleus bazalis magnoselülaris (nBM) gibi neokorteksin kolinerjik aferentlerinin hasarlanmasının ise, daha çok uzun süreli hafıza bozukluklarına yol açtığı ortaya konmuştur (7). Kompleks (hem fimbria-forniks hem nBM'i içeren) hasarlarda ise uzun süreli hafızada daha belirgin olmak üzere, her iki hafıza çeşidinde de bozukluk görülmüştür. Aynı testte skopolamin verilmiş sıçanlar denendiğinde, yine uzun süreli hafızada daha belirgin olmak üzere, her iki hafıza çeşidinde bozukluk oluşmuştur. Buradan skopolaminin seçicilik yapmadan etki gösterdiği, her iki santral kolinerjik yapıyı aynı oranda etkilediği düşünülmüştür. Kan beyin bariyerini geçemeyen, ancak skopolaminin bütün periferik etkilerini taklit edebilen metil skopolaminin ise bir etkisi olmamıştır (8).

Posta güvercinleri üzerinde yapılan araştırmalarda, hippokampektomili güvercinlerin eski rotalarını takip edebildiklerini (yanıt stratejisi ya da prosedürel hafıza) ancak ufak şaşırtmalardan etkilendiklerini ve bulundukları yeri değerlendiremediklerini (uzaysal hafıza) ortaya koymuştur (6). Bu, insanlarda da hippokampektomili şahısların evlerini bulamamaları ile uyumludur. Posta güvercinlerinin diğer güvercinlere oranla oldukça büyük bir hippokampusa sahip oldukları saptanmıştır. Yiyeceklerini çeşitli yerlere gizleyen ya da poligamik olan diğer hayvanların da, farklı yerleri tanıma gereksinimlerinden dolayı, hippokampuslarının diğer hayvanlara göre bazen 7 kez büyük olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalar da hippokampusun uzaysal hafızada kritik bir role sahip bulunduğunu göstermektedir.

Hippokampusun öğrenme ve hafıza işlevlerindeki merkezi rolünü daha iyi anlamak için aferentlerini aldığı ön beyin tabanını incelemek gerekmektedir.

Ön beyin tabanı

Anteriyor kommissürün altında, orta hatta 3. ventrikülden temporal lobun lateral yüzüne kadar olan oldukça geniş bir bölgeye "ön beyin tabanı" adı verilmektedir. Bu bölge telensefalik ve diensefalik yapılardan oluşan bir grup heterojen yapıyı içerir. Ön beyin tabanı en basit güdü ve emosyonlardan, en üst düzeyde entegrasyonu temsil eden fonksiyonlara kadar, davranışla yakından ilişkilidir. Fonksiyonel önemine rağmen yakın zamana kadar bu bölgenin net bir anatomik şeması çıkarılabilmiş değildir. Alzheimer, Parkinson ve şizofreni hastalıklarının bu bölgedeki yapısal bozukluklardan kaynaklandığı ortaya konmuştur (9).

Ön beyin tabanının kesin bir tanımı olmamasına rağmen genellikle, bu bölgede preoptik-anteriyor hipotalamik uzantı, septal nükleuslar, bed nükleus (stria terminalis), substantia innominata (Meynert ile birlikte), nükleus akkumbens, olfaktör tüberkül, amigdaloid nükleusların bulunduğu kabul edilir. Ön beyin tabanının önemi yeterince iyi anlaşılmış olmasına rağmen, beyin tabanının deneysel çalışmalarda ulaşılma güçlüğü ve içerdiği nöron popülasyonlarının yalnızca sitolojik, histolojik ve biyokimyasal analizler ile çözümlenemeyecek derecede komplike bir tarzda yapılanmış olması nedeniyle yapısal organizasyonunu ortaya koymak konusunda problemlerle karşılaşmıştır. Ancak nöroanatominin, araştırma teknolojisinde ortaya çıkan ilerlemeler ve interdisipliner yaklaşımlardan faydalanması, davranışsal ya da fizyolojik araştırmaları nöronal yolların immünolojik ya da histokimyasal karakterizasyonu ile birleştirebilme imkanı sağlamıştır. Bu bölgede substantia innominata olarak bilinen alan kolinerjik özelliği ile dikkati çekmektedir. Anteriyor kommissürün altında, lateral hipotalamus ve amigdaloid bölge arasında kalan bu bölge, temelde 3 ana bölgeye ayrılır (9):

1) Ventral striatopallidal system (ventral striatum ve ventral pallidum)

Primatlarda striatum, kaudat ve putamen isimli çekirdeklerden meydana gelir. Her iki çekirdek internal kapsül ile birbirlerinden ayrılırlar. Ancak bu ayrılma özellikle daha rostral düzeylerde tam değildir. Burada gri cevher köprüleri (striatal hücre köprüleri) internal kapsülün lifleriyle iç-içe girmiş durumdadırlar. Kaudat ve putamen arasında bir süreklilik bulunur. Özellikle insan beyninde bu süreklilik daha belirgindir ve rostral düzeyde

akumbens ya da fundus striati diye anılır. Sıçanda ise kaudat ve putamen yapıları birbirinden ayrı olarak gözlenememiştir. İnsan ve diğer memelilerdeki kapsül yerine kolinerjik kortikofugal ve kortikopetal demetler, dağılmış lifler halinde striatuma girerler. Striatum rostral düzeyde akumbens ve olfaktor tüberkül ile devam eder. Bu yapılar sitolojik ve histokimyasal olarak striatum ile benzerlik gösterirler. Bu benzerlikler nedeniyle ventral striatum olarak adlandırılmışlardır. Dorsal ve ventral striatumun hemen bitişiğinde de dorsal ve ventral pallidum bulunur. Striatumun temel eferent bölgelerini oluşturur. Bu sisteme "ventral striatopallidal sistem" adı verilmiştir. Primat beyni de bu şekilde sıçan beyni ile benzerlik gösterir. Ventral striatopallidal sistemin önemi tüm korteksin (neokorteks ve allokorteks) kortikostriatopallidal projeksiyonlar yolu ile bazal gangliyonlarla iletişim kurmasıdır. Dorsal striatum kortikal girdilerini neokortikal alanlardan alırken, ventral striatum hippokampus ve olfaktor korteks gibi allokortikal yapılardan ayrıca prefrontal ve singulat korteks ile insular ve temporal assosiyasyon alanlarından alır (9).

Akumbens, striatal yapısı yanında yoğun nöropeptid ve norepinefrin içeriği ve hipotalamusa ve beyin sapına verdiği eferent projeksiyonlar ile dikkati çekmektedir. Akumbens, mediyal kısımda sahip olduğu amigdala paterni nedeniyle, ventral striatum ile amigdala uzantısının birleştiği bir yer olarak düşünülmektedir (9).

2) Amigdala ve uzantısı (santromediyal amigdala - stria terminalisin bed nükleusu)

1923 yılında stria terminalisin bed nükleusunun santral ve mediyal amigdala ile sürekli bir yapı oluşturduğu iddia edilmiştir. Bugüne kadar yapılan araştırmalarla da hücrel morfoloji ve immunohistokimya ile bu benzerlikler gösterilmiştir. Bu sürekli yapıya amigdala ve uzantısı adı verilir. Santral amigdaloid grup magnoselüler kortikopetal komplekse önemli bir aferent lif demeti gönderir. Bu şekilde temel güdü ve emosyonlar ile bu alandaki öğrenmeden (emosyonel öğrenme) sorumlu olan amigdaladan, serebral kortekse bir feedback bağlantısı kurulmuş olur (9).

3) Magnoselüler kortikopetal sistem

Amigdala ve uzantısı ile ventral striatum ve ventral pallidum, substantia innominatanın büyük bir bölümünü oluşturuyorlarsa da, üçüncü bir ön beyin yapısı olan

kortikopetal hücre kompleksi, diğer iki yapı arasına dağılmıştır ve öğrenme açısından daha önemli bir role sahip bulunmaktadır. Daha önceleri de ön beyin tabanındaki geniş nöronlardan kaynaklanan ekstralamik kortikopetal demet sistemi bilindiği halde 1970'lere kadar bu sistem yeterince araştırılmamıştır. Bu projeksiyon sisteminin neokortikopetal bölümünün temel nörotransmitterinin asetilkolin (ACh) olduğu gösterilmiştir. Bu sistemin leze edilmesi neokorteksteki kolinerjik parametreleri yarıyarıya azaltmaktadır. Alzheimer'da kolinerjik kortikal parametrelerin azalması ile dikkatler bazal magnoselüler sisteme çevrilmiş ve bu nükleuslarda önemli oranda disfonksiyon gösterilmiştir.

Diyagonal bandın bulbopetal horizontal ayağındaki hücrelerin üçte biri glutamik asit dekarboksilaz (GAD), beşte, biri ise kolinasetiltransferaz (ChAT) içermektedir. Ancak neokortekse projekte olan diyagonal bandın neredeyse tümü kolinerjiktir. Bu sistem amigdala ve uzantısı gibi substantia innominata ile sınırlı değildir. Kortikopetal magnoselüler nöronlar mediyal septum ve diyagonal band nükleuslarından globus pallidusa kadar uzanırlar. Bu nedenle bu sistemi tamamen substantia innominatanın çekirdekleri olarak görmek doğru bulunmamaktadır. Amigdala ve uzantısı ise rostral olarak akumbens ve olfaktör tüberkül olarak devam eder. Striatopallidal sistem de ventralde akumbens ve olfaktör tüberkül olarak devam eder. Sonuç olarak aralarını dokuyan kortikopetal nöronlar ile birlikte bir sistem oluştururlar ve substantia innominatayı meydana getirirler. Ventral striatum ile amigdala ve uzantısının aferentleri kolinerjik nöronlara ulaşırlar. Kortikopetal ön beyin hücreleri ise beyin sapındaki monoaminergik hücreler gibi değişik kaynaklardan aferentlerini alırlar.

Alzheimer'da ön beyin tabanındaki kolinerjik nöron harabiyeti ile neokortikal ChAT düzeyinde azalma arasındaki ilişki, ön beyin tabanından kortekse ekstralamik bir projeksiyon olduğunu düşündürmüştü, bu projeksiyonun hemen hemen tümünün kolinerjik olduğu bulunmuştur. Asetilkolinesteraz ve kolinasetiltransferaz boyaları ile bu grup nöronların kolinerjik oldukları gösterilmiştir (9).

Öğrenme ölçümü için geliştirilen cihazlar (maze)

Hippokampal lezyonların insanlarda anterograd amnezi oluşturduğu ortaya konduğu zaman bu yapının öğrenme ve hafıza işlevlerinde oynadığı rol üzerinde araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu ilgi deneysel alana da taşınmıştır. Hippokampal hasarın insanlarda öğrenme ve hafıza işlevlerini bozması hayvanlar üzerinde de denenmeye başlanmış ve araştırmacılar çeşitli hippocampus lezyonları yapmaya başlamışlardır. Bu şekilde hayvanların “maze” adı verilen pek çok deneysel aparatta öğrenme bozukluğu ölçülebilir hale gelmiştir. Bunlardan davranış deneylerinde en çok kullanılanları şunlardır :

1) Pasif Kaçınım Cihazı (Passive Avoidance)

Bu yöntem ilaçların öğrenme ve hafıza üzerindeki etkilerini araştırmak için diğer davranış prosedürlerinden daha fazla kullanılmıştır. Kemirgenlerin, özellikle kaçınma davranışı (avoidance behavior) üzerinde davranış bilimi uzun yıllar ısrarla durmuştur (10). Kemirgenlerin çok araştırılmış olan bu davranışını temel alan cihaz üzerinde araç ve gereçler bölümünde ayrıntılarıyla durulmuştur.

2) Işınsal Kollu Labirent (Radial Arm Maze)

Olton ve Samuelson (1976)'ın geliştirdiği ışınsal kollu labirent hayvanın yere atlayamayacağı yüksekliktedir (6). Sıçan merkezdeki platforma yerleştirilmeden önce cihazın ışınsal tarzda yerleştirilmiş 8 kolundan herbirine yiyecek konur. Aç bırakılan sıçanlar kolların herbirine teker teker girerek yiyecekleri alırlar. Yirmi denemenin sonunda sıçanların bir kez girip yiyecek aldıkları bir kola tekrar girmedikleri görülür. Sıçanların ardışık bir sıra izleyerek işlerini kolaylaştırmalarını önlemek üzere engeller konur. Böylece sıçanların karışık bir yol izlemeleri durumunda da bir kez girdikleri bir kola tekrar girmedikleri görülür. Sıçanların belirli bir strateji izleyerek kollara girip çıkmalarına “yanıt stratejisi” (response strategy) adı verilmiştir. Sıçanların böyle bir strateji kullanmaları önlenerek salt uzaysal yetenekleri sınanmaktadır.

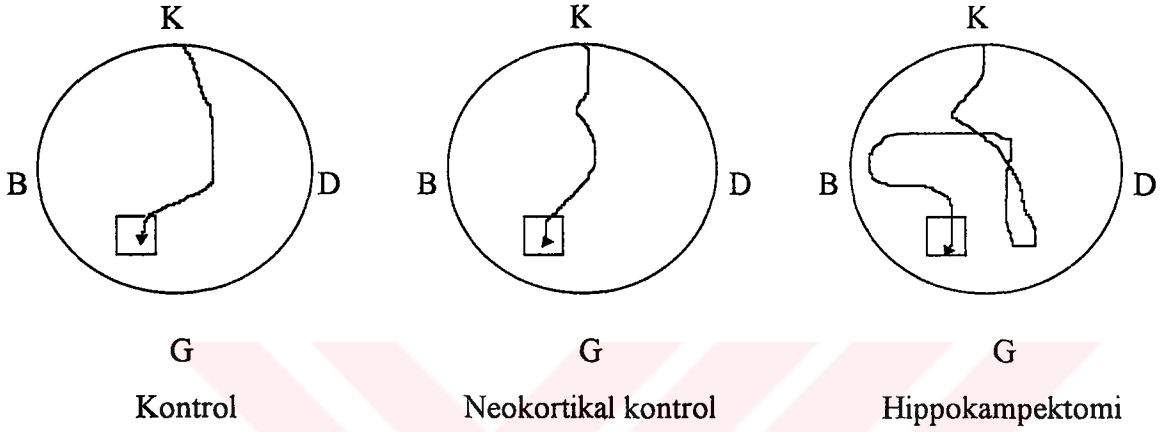
Sekiz kollu cihazın dördüne yiyecek konur, dördüne konmaz ise zamanla sıçanın yiyecek konan tarafta bulunma eğilimi artar ve diğer dört kolun bulunduğu bölüme uğramaz hale gelir. Hippokampal hasarlı hayvanların bile bunu başardıkları, ancak bir kez uğradıkları kola tekrar uğrayabildikleri görülmüştür. Sıçanların günler boyunca yiyecek bulunan tarafın bilgisini öğrenebildiği, ancak her gün değişen bilgileri (hangi kola girip hangilerine girmedikleri bilgisini) öğrenemedikleri görülmüştür. İlk bilgi, uzun süreli hafıza (reference memory), ikincisi ise kısa süreli hafızayı (working memory) temsil ettiğinden, hippokampal harabiyetin kısa süreli hafıza bozukluğu oluşturduğu deneysel olarak da gösterilmiştir (11,6).

Hippokampal hasarlar uzaysal bilginin depolanmasını, dolayısıyla yerlerin izini sürme ve tekrar hatırlanması ile ilgili fonksiyonları bozarlar. Hippokampektomiden sonra şahıs evini değiştirirse yeni evinin yolunu öğrenememektedir. Eski evinin yerini bulabilmesi ise daha çok o ana kadar geliştirmiş bulunduğu “yanıt stratejisi” ile ilgilidir. Deney hayvanlarının uzaysal yeteneklerini ölçmek için kullanılan diğer bir yöntem de “Morris su tankı”dır.

3) Morris su tankı (Morris water maze; MWM)

İçi su dolu 80-150 cm. çapında daire şeklindeki bir havuzun içine üst yüzeyi, su yüzeyinin 2 cm. altında olmak üzere bir platform yerleştirilir ve platformun gözükmemesi için süt tozu ya da toksik olmayan bir boya ile su opak hale getirilir. Havuza bırakılan sıçan rastgele yüzerek platformu bulur. Platformu her bulduğunda, ya da belli bir süre (60-90 sn) sonunda başarısız olduğunda, sıçan platformun üzerinde belli bir süre bırakılır (10-50 sn) ve buradan havuz dışındaki ipuçlarını (extra-maze cues) görmesine izin verilir. Havuzun simetrik sirküler yapısı nedeniyle havuz içinde sıçanın değerlendirebileceği bir ipucu (proksimal ipucu) bulunmaktadır. Sıçanın platformun yerini belirlemesi (spatial localization) bir kaç yeteneğin toplam fonksiyonudur. Belirli ardışık hareketlerin ezberlenmesini (yanıt stratejisi) önlemek için, sıçan her denemede ayrı bir noktadan bırakılır. Başlangıç için tercih edilen noktalar genellikle birbirinden 90 derece ile ayrılan 4 noktadır (kuzey, güney, doğu, batı). Böylece sadece sıçanın uzaysal haritalama (spatial mapping) fonksiyonu değerlendirilmiş olur.

Aşağıdaki şekiller hipokampektominin uzaysal hafıza üzerindeki rolünü deneysel olarak açıkça göstermektedir. Hippokampusun kesilmesi sırasında onun tam üzerinde bulunan kortikal bölümün etkisini araştırmak üzere, sadece bu bölümün leze edildiği sıçanların oluşturduğu bir neokortikal kontrol grubu da kullanılmıştır (K;kuzey, G;güney, B; batı, D; doğu. Sıçan K noktasından havuza bırakılmıştır).



Morris su tankı pek çok parametre üzerinde çalışmaya izin vermektedir. Katedilen mesafe (path length), platforma çıkış süresi (latency), izlenen yolun doğrultusu (directionality), başlangıç açısı (heading angle) sıklıkla kullanılan parametrelerdir. Bunun dışında platformun yerini değiştirdikten sonra yapılan denemelere “transfer test”, platform tümüyle ortadan kaldırıldıktan sonra yapılan denemelere “prob denemesi” adı verilmektedir. Prob denemesi deklaratif hafızanın ölçümü için kullanılmaktadır.

Platformun yeri değiştirilerek aynı sıçan defalarca kullanılabilir. Platform görünür hale getirildikten sonra sıçanın göstereceği performans, onun lokomotor performansını da göstermiş olacaktır (24, 28, 29).

4) T labirentinde spontan deęişme (*Spontaneous Alteration in T Maze*)

Sıçanın T şeklinde 3 kollu bir labirentin herhangi bir koluna girmesi beklenir. İkinci denemede sıçanların normalde %80 oranında diğer kolu seçtikleri ve bu fonksiyonun santral kolinerjik sisteme bağlı olduğu gösterilmiştir (10).

5) T labirentinde gecikmeli deęişme (*Delayed Alteration in T Maze*)

T labirentinde spontan değişmenin bir varyasyonudur. Sıçan bir önceki seçtiği kol dışında bir seçim yaparsa ödüllendirilir. nBM ve mediyal septum hasarlarında performans bozulur (10).

Santral kolinerjik sistem ve öğrenme

Kolinerjik nöron gövdelerini içeren çekirdekler beyinde dağınık bir halde bulunurlar, ancak hippokampus ve neokorteksin kolinerjik aferentleri esas olarak septal nükleuslar ve nBM'den sağlanır. Yalnızca nükleus bazalisin lezyonu kortikal ChAT düzeyinin %50 den aşığı düşmesine sebep olabilmektedir.

Uzun yıllardan beri kolinerjik sistemin kognitif fonksiyonlar üzerindeki rolü bilinmekte, özellikle ön beyin tabanındaki kolinerjik nöronların korteks ve hippokampustaki projeksiyon alanlarının öğrenme ve hafıza süreçleri ile sıkı bir ilişki içinde oldukları kabul edilmektedir. Yaşlanmaya bağlı hafıza bozukluklarında ve Alzheimer hastalığında kolinerjik sistem bozukluğunun keşfedilmesi de son yıllarda kolinerjik sistem üzerinde dikkatlerin yoğunlaşmasına yol açmıştır (33, 34). Alzheimer hastalığı ön beyin tabanının ve özellikle nBM'in kolinerjik disfonksiyonu ile birlikte görülmektedir (37). Bu hastalarda, Broca'nın septal diyagonal bandı-nükleus bazalis sisteminde asetilkolin salgılayan nöronların çoğunda kayıp ve dejenerasyon ile ChAT aktivite düşüklüğü gözlenmiştir (33, 37). Ventral globus pallidus, substantia innominata ve preoptik bölgeyi de içeren bu bölgeler neokorteksin ve hippokampusun kolinerjik aferentlerini oluştururlar. nBM sıçanda globus pallidusun ventromediyal bölgesine karşılık gelmektedir. Yaşlı hayvanlarda ise nükleus bazalis ve septal diyagonal bantta bulunan kolinerjik

hücrelerdeki kaybın morfolojik bulgularla gösterilmesi kolinerjik hipoteze en önemli desteği sağlamıştır (38, 39, 40).

Alzheimer'lı hastaların otopsilerinden elde edilen sonuçlar bunlarda santral asetilkolin, asetilkolinesteraz (AChE) ve ChAT etkinliğinin düşük olduğunu göstermiştir (5). Alzheimer hastalığının mononörotransmitter hastalığı olmadığı bilinse de, nöropatolojik değişiklikler ile en anlamlı ilişkinin ChAT aktivitesi arasında olduğu saptanmıştır. Klinik olarak, demansın şiddetinin kolinerjik kaybın nöropatolojik göstergeleri ile ilintili olduğu, ayrıca hem prognoz hem de tanı açısından, nükleus bazalisteki nörofibriler düzensizliğin demansın sinaptik ya da nöronal kayıp gibi göstergelerinden daha değerli olduğu gösterilmiştir (41),

26 aylık dişi Wistar sıçanların ışınal kollu labirentteki performanslarının hippokampal ChAT aktivitesi ile pozitif korrelasyon içinde olduğu gösterilmiştir (52). 3, 12, 18, 24, ve 30 aylık sıçanlarla yapılan araştırmalarda MWM'deki öğrenme performansının yaşla sürekli bir azalma içinde olduğu gösterilmiştir. Bu performans bozukluğu da, 4 temel ön beyin kolinerjik hücre grubundaki (mediyal septum, vertikal diyagonal bant, nBM, striatum) morfolojik değişiklikler ile ilişkili bulunmuştur. En anlamlı ilişkinin mediyal septum, vertikal diyagonal bant ve nBM hücre sayısı ile uzaysal performans arasında olduğu gösterilmiştir (42). Ön beyin tabanından neokortekse giden kolinerjik lif demetinin kesilmesi de MWM'de öğrenme performansını bozmuştur (21). Ön beyin tabanının projeksiyon bölgelerinin kolinerjik parametreleri ise Williams ve Rylett tarafından çalışılmıştır. Hippokampus ve kortekste sodyuma bağımlı yüksek afiniteli kolin geri alınıcı (SDHACU) 24 aylık Fischer-344 erkek sıçanlarda, 4 aylık sıçanlara göre anlamlı bir biçimde düşük bulunmuştur (53). Ayrıca yaşlı sıçanlarda gençlere oranla daha az sayıda pozitif nöron bulunduğu gösterilmiştir. Yaşlı sıçanlarda AChE düşük bulunmuş, buna karşın ChAT ve muskarinik asetilkolin reseptör sayısının (mAChR) azalmadığı ortaya konmuştur. Bu sıçanlara diizopropilflorofosfat gibi asetilkolinesteraz inhibitörlerinin uygulanması ile şiddetli bir AChE inhibisyonu ve mAChR sayısında anlamlı bir adaptif “down-regülasyon” meydana gelmiştir (23).

Hippokampus kesitlerinden yapılan SDHACU ölçümleri hippokampusun presinaptik kolinerjik aktivitesi hakkında bilgi vermektedir. Bu teknikle öğrenme olayının, hippokampusun presinaptik kolinerjik aktivitesindeki değişiklikleri indüklediği

gösterilmiştir. Hippokampus kesitlerinden yapılan SDHACU ölçümleri, hippocampusun temel kolinerjik aferenti olan septohippokampal yolağın etkinliğini göstermiştir. Kullanılan test eğer kısa süreli hafıza ile ilgili ise kolinerjik sistem aktive olmakta, uzun süreli hafıza ile ilgili ise "uzun süreli potansiyalizasyon"a benzer biçimde kolinerjik sistemde 15 dakikadan bir güne, bazen bir haftaya kadar süren inhibisyon meydana gelmektedir. Bu inhibisyona glutamaterjik ve GABAerjik nöronların aracılık ettiğine dair kanıtlar bulunmaktadır. nBM'in ise uzun süreli hafıza ile daha ilgili olduğu bilinmektedir (45).

MWM'de yapılan ayrıntılı çalışmalarda kolinerjik sistemin uzaysal haritalamada (spatial mapping) etkili olduğu gösterilmiştir. Deney hayvanı, havuzun dışındaki ipuçlarından faydalanarak suyun altında gizli bulunan platformun yerini zihninde yeniden tasarlayabilir. Bu şekilde havuza hangi noktadan bırakılırsa bırakılsın platformun yerini doğru olarak tahmin edecektir (uzaysal haritalama). Uzaysal yer belirlemede (spatial localization) ise kolinerjik sistem etkili bulunmamıştır. Çünkü, bu testte belirli (görünen) bir hedefe doğru gitme (taksis) ya da belirli hareketleri ardışık olarak tekrarlama (praksis) türünden uzaysal olmayan araştırma stratejileri de etkilidir (24, 48).

Kolinerjik merkezlerin bulunduğu ön beyin tabanının projeksiyon bölgelerinin öğrenme-hatırlama süreçlerinde en önemli yeri tuttukları görülmektedir. Bu bölgenin lezyonu serebral korteksteki ChAT aktivitesinde azalmaya neden olurken bir yandan da pasif ve aktif kaçınım, T-labirent, ışınal kollu labirent ve MWM gibi araçlarda öğrenme ve hafızaya ilişkin performans bozukluklarını ortaya çıkarmaktadır. nBM'in ibotenik asit ile leze edilmesi MWM performansını anlamlı bir biçimde azaltmıştır (8, 49, 50). Bilateral nBM hasarı (ibotenik asit) sonrasında bozulan MWM performansı, sinir büyüme faktörü tedavisi ile kısmi iyileşme göstermiştir (51).

İki santral kolinerjik bölgenin (nBM ve mediyal septum) hafıza işlevlerine katkısı karşılaştırılmış ve nBM lezyonlarının mediyal septum ve fimbria-forniks lezyonlarından daha ağır bir bozukluk oluşturduğu gözlenmiştir. İbotenik asit ile nBM lezyonu yapılan sıçanlardan, kolinerjik yönden zengin embriyonik ön beyin hücreleri transplante edilenler iyileşme gösterirlerken, kolinerjik olmayan hücre transplante edilenlerde bir değişiklik olmamıştır (27). Septal kolinerjik nöronların intrahippokampal transplantasyonu fimbria-forniks lezyonu yapılan sıçanlarda bilişsel işlevlerin iyileşmesine neden olmuştur (56). Deneysel olarak sıçanların hipokampal aferentleri olan fimbria-forniksin kesilmelerinde de

bozulan uzaysal öğrenme ve hatırlama süreçlerini, f tal septal nöronların hippokampusa transplantasyonu geri çevirmektedir (35).

Yapılan hayvan deneylerinde de intakt hayvanlarda muskarinik antagonist olan atropin, skopolamin ve pirenzepinin uzaysal öğrenmeyi ve hatırlama sürecini inhibe ettiği buna karşılık fizostigmin, oksotremorin ve nikotinin kolayla tırdı ı gösterilmiştir (57,58,59). Potasyumla uyarılan asetilkolin salınımı üzerine olumlu etkili linopironun bilişsel yetileri arttırıcı (cognitive enhancing) etkileri üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (67).

Hippokampal noradrenerjik sistem ile ilgili çalışmalar ise, çelişkili sonuçlar bildirmektedir; örneğin hippokampal noradrenalin düzeyi yüksek olan ya lı sıçanlarda uzaysal performansın arttığı, gençlerde ise bunun azaldığı gösterilmektedir (73).

Son yıllarda kolinerjik hipotez dışında, glutamaterjik hipotez gibi başka nörotransmitterleri esas alan görüşler de geliştirilmeye çalışılsa da, Alzheimer hastalığının tedavisi için u ra ılan temel nörotransmitter asetilkolindir ve kolinerjik hipotez uzun yıllardan beri geçerliliğini korumaktadır. Asetilkolin depleasyonu hayvan modeli oluşturmak için en çok kullanılan yöntemdir. Bu modelde de en çok kullanılan bölge nükleus bazalidir (49). Alzheimer hastalığına temel olan nörotransmitter bozukluğu tanımlandığında bu hastalığının tedavi stratejisinin mümkün hale geleceği ve Parkinson hastalığında bazal gangliyonlara L-DOPA ve karbidopa uygulanmasına benzer bir biçimde ACh replasyonu ile Alzheimer hastalığının palyatif tedavisinin mümkün olabileceği düşünülmektedir (46). Bir antikolinesteraz olan takrin (THA) ile yapılan tedavilerden sınırlı da olsa yarar sa lanmıştıır (43). Nikotin ile de doza bağımlı bir iyileşme olduğu gösterilmiştir (66). Özellikle ikinci kuşak kolinesteraz inhibitörlerine büyük bir umutla bakılmaktadır. Fizostigmin türevi fenlerin buna bir örnek oluşturmaktadır. Kolinerjik ve glutamaterjik hipotezlerin entegre edilmesinin,  rne in N-metil D-Aspartat (NMDA) ve ACh reseptörlerinin birlikte ele alınmasının yararını savunanlar da bulunmaktadır (31).

Alzheimer hastalarında bu nörokimyasal değişikliklerin yanında amiloid prekürsör protein (APP) birikimi de önemli bir patolojik bulgudur. Bununla ilgili olarak ortaya konan modeller nörokimyasal modellerden şimdilik farklı olarak ilerlemektedir ve genetik bilimi tarafından transjenik hayvanlar kullanılmaktadır (72).

Asetilkolin deplesyonu için kullanılan modellerden biri kolinden fakir diyetlerdir. Diyet kolini plazma kolin düzeyinin önemli bir bölümünden sorumludur. Plazma kolini kan-beyin bariyerini geçer, beyin kolin havuzuna dahil olur ve hızla asetilkoline çevrilir. Bu nedenle diyet kolinini değiştirmekle ACh düzeyinin değiştirilebileceği bildirilmiştir.(61). Kolinden fakir diyetle beslenen farelerin, kolinle zenginleştirilmiş diyetle beslenen farelere göre pasif kaçınım testinde çok daha başarısız oldukları görülmüştür (46).

Nikotinin etkileri

Kolinden fakir diyetle beslenen hayvanlarda intraperitoneal (i.p.) nikotin enjeksiyonundan sonra sıçanların pasif kaçınım performansında yine artış gözlenmiştir. Nikotin, normal hayvanlarda ve genetik olarak yaşlanması hızlandırılmış farelerde (Senesence accelerated mice - SAM-P) pasif kaçınım performansını arttırmıştır (44) . Nikotin ön beyinden neokortekse giden projeksiyonların kesilmesinden sonra uygulandığında MWM performans bozukluğunu düzeltmiştir. Bu iyileşmenin noradrenerjik sistem yoluyla olmadığı da gösterilmiştir (21). Ayrıca Alzheimer'lı hastaların nikotin ile doz-ilişkili kısmi bir iyileşme gösterdikleri rapor edilmiştir (66).

B12 vitamininin etkileri

Yapılan araştırmalarda kolinerjik metabolik yollarla ilişkili olan B12 (metil B12) vitamininin demanslı hastaların beyinlerinde normale göre düşük çıktığı gösterilmiştir.. Alzheimer'lı hastalarda yapılan araştırmalarda ise, şiddetli atrofi olan hastaların beyin-omurilik sıvısındaki B12, orta düzeyde atrofi olan hastalara göre daha düşük çıkmıştır (69). B12 takviyesi yapılmış diyetle beslenen kedilerin beyinlerindeki çeşitli yapılarda ChAT aktivitesi yüksek bulunmuştur. B12 deprivasyonu ise Rhesus maymunlarında demiyelinizasyon, dejenerasyon, akson kaybı ve gliyozise neden olmuştur. Buradan yola çıkılarak, kolinden fakir diyetle beslenen ve kognitif bozukluk oluşturulan deney hayvanlarına B12 vitamini verilerek kognitif bozukluğun giderilebildiği ortaya konmuştur. Bu hayvanlara B12 vitamini verildiğinde beyin çeşitli alanlarında doku artışı olduğu da kaydedilmiştir. B12 vitamin eksikliği psikiyatride de mental yavaşlamanın eşlik

ettiği deliryum, panik ataklar, hafıza bozukluğu, ve/veya hezeyanlar, depresyon, genellikle paranoid kuşkuyla birlikte akut psikoz olgularının artmasına neden olmaktadır. B12 düzeyleri normal bulunan 14 hasta üzerinde yapılan çalışmada ise B12 enjeksiyonlarının semptomları hafiflettiği görülmüştür (46). B12 bugün diabetes mellituslu hastalarda periferik nöropati tedavisinde kullanılmaktadır ve Alzheimer hastalığı için de aday terapötik ajan konumundadır (70).

Asetilkolin sentezi ve kolin geri alınımların mekanizması

Astil kolin sinaptik terminallerde kolin ve asetattan sentezlenmektedir. Asetat ise asetilkoenzim-A'dan oluşmaktadır. Kolin, kısmen sinaptik yarıktan geri alınmakta kısmen ise kandan alınmaktadır. Kolin, kanda serbest ya da fosfatidilkolin olarak iki şekilde bulunmaktadır. Asetil koenzim-A ise glikozdan glikoliz süreci sonunda oluşmaktadır. Sentez ChAT tarafından katalizlenmektedir (3).

Presinaptik muskarinik otoresptörler kolinerjik nöronlardan ACh salınmasını düzenlemektedirler. Muskarinik agonistler nörotransmitter salınımını inhibe ederken muskarinik antagonistler nörotransmitter salınımını artırırlar (20, 15)

Asetilkolin düzeyleri normalde çok dar sınırlar içinde tutulmaktadır. Ancak, beyin dokusu ACh salgılanması için stimüle edildiğinde ya da in vitro beyin preparatlarına depolarizasyona yol açan konsantrasyonlarda KCl eklendiğinde, nörotransmitter sentezi yetersiz hale gelir ve asetilkolin konsantrasyonunun % 85'e varan oranlarda azalmasına neden olur. Normalde salıverilme ile başabaş giden sentezin, stimülasyon durumlarında salıverilmeye ayak uyduramamasının sebebi, sentez için gerekli olan kolinin yetersiz kalmasıdır. Kolin enjeksiyonu yapılan sıçanlardan elde edilen preparatlarda ise dokunun ACh düzeylerini devam ettirebildiği gözlenmiştir. Ayrıca kolin ile enkübe edilmiş preparatlarda uyarılma durumlarında nörotransmitter sentezi artmazken, enkübe preparatlarda arttığı gözlenmiştir. Salınan nörotransmitter miktarı, salınabilir ACh fraksiyonunun hacmi ile orantılı olduğundan, kolinle enkübe edilmiş doku preparatlarının salınabilir ACh içeriğinin artmış olması gerekmektedir (25).

Böylelikle normal koşullarda ACh içeriğinin belli bir düzeyden daha fazla arttırılamadığı, yani ACh düzeyleri için belli bir tavan değerinin varolduğu anlaşılmıştır.

Sentez salıverilmeye bağılıdır ve bu ikisi ACh, koenzim A (CoA) ve sentez bölgesindeki koline ihtiyaç gösterirler. AChE inhibisyonu ile oluşturulan yüksek ACh miktarları aynı zamanda sentezin azalması ile düşer. Çünkü kolin geri Emilimi azalmaya başlamıştır. Buradan kolin geri Emiliminin hız sınırlandırıcı olduğu ortaya çıkmaktadır (32). Paraokson (Px) gibi bir AChE inhibitörünün akut enjeksiyonu ile ACh miktarı ilk aşamada iki katına çıkmakta, sonra tekrar azalmaktadır. Px kronik olarak verildiğinde ise ACh içeriğinin %50 den fazla arttırılamadığı görülmüştür. Aynı çalışmada kolinerjik fonksiyon üst sınırdaki bulunduğunda halde ChAT değişikliği saptanmamıştır. Böylelikle ChAT enzim düzeyinin kolinerjik nöron popülasyonu hakkında değerli bilgiler vermesine rağmen, kolinerjik aktivite hakkında çok az bilgi verdiği anlaşılmıştır. Ayrıca Px etkisinin 10 dakika içinde ortaya çıkması kolinerjik sistemin sentez ve yıkım döngüsünün çok süratli işlediğini göstermiştir (32).

Asetilkolin sentezi için kullanılan kolin, kolinerjik nöron terminallerine SDHACU sistemi ile taşınırlar. Yüksek afiniteli kolin taşıyıcısı tarafından gerçekleştirilen kolin taşınmasının ACh sentezinde hız sınırlayıcı basamak olduğu gösterilmiştir (64).

Diyet kolini plazma kolin düzeyinin önemli bir bölümünden sorumludur. Hız sınırlandırıcı faktörü oluşturan kolin, ekzojen olarak alındığında, “bağılı-kolin” depolarına girer ve oradan mobilize olur (25). Serbest ya da bileşik kolin kan-beyin bariyerini geçer, kolin depolarına girer ve hızla beyin ACh'i haline dönüşür. Plazma kolin düzeyi diyet kolini ile belli bir düzeye kadar arttırılabilir. Diyet yoksunluğu da ancak minimal bir düzeye kadar inebilir. Kolin metabolizmasında alt ve üst sınırlar olduğu bildirilmiştir (61). Kolin geri alınımının kolinerjik sistemde böylesine kritik bir rol üstlenmiş olmasına rağmen kolin taşıyıcısı hakkındaki bilgilerimiz sınırlıdır (14).

Yetmişli yıllardan bu yana kolinerjik aktivitenin bir göstergesi olarak beyin sitoplazmik fraksiyonlarında yüksek afiniteli kolin geri alınımı kullanılmaktadır. İn vivo kolinerjik uyarı akışını azaltan ilaçlar, sinaptozomal yüksek afiniteli kolin taşıyıcısının kapasitesini de azaltmaktadır. Beyin kolinerjik etkinliğini arttıran ilaçlar da, hayvanlardan elde edilen sinaptozomal yüksek afiniteli kolin taşıyıcısının kapasitesini arttırmaktadır. Sinaptozomal SDHACU kapasitesi sadece kolinerjik sinir terminallerinin varlığını değil, kolinerjik nöronların in vivo etkinliğini de göstermektedir. SDHACU kapasitesi, [³H] ile işaretlenmiş kolinklorid'in geri alınımı ile ölçülmektedir. Sonuç olarak, sinaptozomal

protein içeriği ölçülmekte ve mg protein başına 5 dakikada alınan kolin miktarı “pmol” cinsinden ifade edilmektedir (62).

ChAT enzimi kolinerjik nöronlarda bol miktarda bulunduğu için, beyin ChAT aktivitesinin büyük bir bölümü inhibe edildiği halde ACh düzeyi değişmeyebilmektedir. Çünkü asıl sınırlayıcı faktör kolinin geri alınımıdır (18). Yaşlılıkta ACh düzeyi büyük bir değişiklik göstermemekle birlikte ACh sentez-yıkım hızının anlamlı bir biçimde azaldığı gösterilmiştir. SDHACU hızı ise ACh sentez-yıkım hızı ve kolinerjik nöron impuls akışının bir göstergesi ve in vivo kolinerjik nöron etkinliğinin dinamik bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır (55). Kolinerjik nöron bütünlüğünü ya da yoğunluğunu yansıtan ChAT etkinliği ise nöronal aktivite konusunda fikir vermemektedir (32). Bu nedenle en çok kullanılan gösterge ChAT olduğu halde, öğrenme performansının en iyi göstergenin SDHACU olduğu belirtilmektedir (53). Çünkü SDHACU'nin asetilkolin sentezini ve kolinerjik nöron fonksiyonunu daha iyi yansıttığı düşünülmektedir.

Özellikle ön beyin tabanının kolinerjik fonksiyonunun azaldığı durumlarda (yaşlı sıçanlarda, antagonizmalı öğrenme ve hafıza deneylerinde ve asıl olarak Alzheimer modellerinde) SDHACU, ChAT'a göre daha da güvenilir hale gelmektedir. Fischer-344 erkek sıçanlar üzerinde yapılan deneylerde yaşlı (24 aylık) ve genç (4 aylık) sıçanlar arasında ChAT aktivitesi açısından bir fark görülmezken SDHACU aktivitesi yaşlılarda belirgin bir biçimde düşmektedir(53).

MWM'de deklaratif hafızanın bir göstergesi olan kadran tercihi ile en yüksek korelasyonu SDHACU göstermektedir (76). Dolayısıyla hafıza araştırmalarında bakılması gereken en önemli parametrelerden biri SDHACU olmalıdır.

Ön beyin tabanına yapılan lezyonlardan sonra ise, bozulan pasif kaçınım performansında ilerki günlerde ki iyileşme ile SDHACU aktivitesindeki artış paralellik göstermektedir (60). Her iki parametre, zamanla düzenleyici mekanizmaların devreye girdiğini göstermektedir.

Geri alımın inhibitörü olarak AF64A

Ön beyne nörotoksik bir kolin analogu olan (kolinotoksin) AF64A 1 nanomol gibi küçük miktarlarda verildiğinde, şiddetli öğrenme bozuklukları ChAT düzeyinde belirgin

azalma ile birlikte ortaya çıkmaktadır. AF64A lateral ya da 3. ventriküle verildiğinde ise, hippocampustaki presinaptik kolinerjik fonksiyonun tüm parametrelerini ve mediyal septumda HAcH, ChAT, asetilkolin sentez ve salıverilmesi ile kolinerjik nöronların sayısını azaltmaktadır (76,12,68). AF64A'nın bu etkileri SDHACU mekanizmasını bozmasına bağlıdır. AF64A'nın kullanımı ile ortaya çıkan diğer transmitter değişikliklerinin ya geçici ya da AF64A'nın neden olduğu kolinerjik disfonksiyona sekonder olduğu gösterilmiştir. Örneğin SDHACU düzeyleri üzerinde çok daha güçlü fakat tersinir etkili olan hemikolinyum-3 (HC-3)'ün daha önce uygulanması durumunda, AF64A'nın kolinotoksik etkilerinin yanısıra diğer transmitter sistemleri üzerine olan etkilerini de inhibe etmesi, diğer transmitter değişikliklerinin kolinotoksik etkiye sekonder olduğunu göstermektedir (26).

AF64A 'nın MWM performansı üzerine çelişkili sonuçlar yayınlanmıştır. Bazı araştırmacılar uzun süren, doz-ilişkili MWM performans bozukluğu bildirirlerken, diğerleri bu etkinin geçici olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmalara "prob denemesi" dahil edilmemiştir. Oysa MWM'in daha kalitatif analizlerinde prob denemesi adı verilen deney bölümünde kadran tercihinin hafıza ölçümleri için daha önemli olduğu, diğer parametrelerin (platforma çıkış süresi, katedilen mesafe gibi) yanıltıcı olabileceği gösterilmiştir (76, 36). Aslında deklaratif hafıza bozukluğu devam eden AF64A'lı hayvanlar çeşitli araştırma stratejileri (yanıt stratejisi) geliştirerek bu bozukluğu telafi edebilmektedirler. Gizli platformu bulma süresi (latency) bazı strateji ve hafıza çeşitlerinin toplam bir fonksiyonudur. Oysa deklaratif hafızanın bir göstergesi olan "kadran tercihi" gözönüne alınacak olursa literatürdeki çelişkilerin izah edilebildiği gösterilmiştir. Prob denemesi yapan araştırmacılar hafıza bozukluğunun kalıcı olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada deklaratif hafızanın bir göstergesi olan prob denemesi en yüksek korelasyonu SDHACU ile göstermiştir (76). Dolayısıyla literatürdeki çelişkili veriler, mevcut öğrenme ve hafıza testlerinin daha ayrıntılı kalitatif analizleriyle aşılabilecek durumdadır.

Hemikolinyum-3 (HC-3) ve A-4

1954'de Long ve Schueler tarafından nöromüsküler bir blokör olarak tanımlanan HC-3 (a-a' dimetiletanolamino-4,4' bizasetofen) SDHACU'nin iyi bilinen özgül bir inhibitörüdür (65). HC-3 kolin taşıyıcı sisteminde kolin ile "yarışmalı" ve "tersinir" bir ilişkiye girmektedir. HC-3'ün özgüllüğünden faydalanılarak SDHACU ile ilişkili presinaptik bölgeler işaretlenmiştir.

HC-3 ile (10 nmol, intraserebroventriküler) Morris su tankında 2 platformlu uzaysal ayırım testinde (spatial discrimination task) gösterilen öğrenme bozukluğu antikolinesterazlar ile giderilmiştir. Fizostigmin ve tetrahydroaminoakridin (THA; takrin) ile muskarinik agonist arekolin, aseklidin, oksotremorin ve RS-86 etkili bulunurken, pilokarpin marjinal etkinlik göstermiş ve izoarekolin etkisiz bulunmuştur. Nikotin, pirasetam, a₂ agonisti klonidin ve antagonist idazoksan, haloperidol, amfetamin ve selektif 5-HT_{1A} agonisti 8-OH-DPAT ya da benzodiazepin antagonisti ZK 93426'nın etkisiz olduğu gösterilmiştir. (19).

Uzunca bir süre kolin geri alımın blokerlerinin en az bir pozitif yük taşıyan kuarterner aminler olması gerektiği düşünülmüştür. HC-3'ün bir seri kuarterner amin piperidin analogları ile yapılan çalışmalar, maksimum HC-3-benzeri etkinin 4- metil piperidin kuarterner amin analogları tarafından ortaya konduğunu göstermektedir. Bu halka yapısı kullanılarak, tersiyer amin türevlerinin sentezi mümkün hale gelmiştir (16, 17). HC-3'ün 4-metil piperidin analogu olan A-4, Benz ve Long tarafından 1970 yılında sentezlenmiştir. HC-3'ün pozitif yük taşımayan yegane analogu olmasına rağmen, bazı dokularda HC-3'den daha güçlü bir kolin transport inhibisyonu gerçekleştirmektedir. Parantral yolla verildiğinde, tersiyer amin yapısındaki A-4'ün kolin ve asetilkolin konsantrasyonlarını azaltıp nöromüsküler transmisyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (13).

A-4'ün *d*- ve *l*- izomerleri ile mezoformu, nöroblastoma hücreleri, sıçan striatal preparatları ile nöromüsküler kavşak preparatları kullanılarak karşılaştırılmış ve bu formların biyolojik etkinliklerinin aynı olduğu görülmüştür (54). A-4 ile oluşturulan kolin transport inhibisyonu, yüksek kolin düzeyleriyle tarafından inhibe edilmiştir (16, 17, 47).

A-4'ün 2-3-metil-piperidin pozisyonel izomer analogları inaktiftir. Yalnız 4-metil türevi olan A-4 aktiftir. Piperidin türevlerinin konformasyonları fonksiyonlarıyla ilintilidir.

HC-3 ve A-4'ün benzerlikleri şöyle özetlenebilir; ön beyin ve hipokampus kolin transport inhibisyonu için IC50 değerleri birbirine yakındır (14). Tüm SDHACU taşıyıcı alanlarında A-4, HC-3 gibi yarışmalıdır (16, 17). HC-3 ve A-4, AChE ya da ChAT enzimlerini inhibe etmemekte, nöroblastoma hücre kültüründe asetilkolin sentezini inhibe etmektedir (47). Ne A-4 ne de HC-3'ün bir başka reseptörle ya da taşıyıcı sistemle ilgisi yoktur (14). Nöroblastoma hücre kültürlerinde bu bileşiklerin metabolize edildiklerine dair bir kanıt yoktur. Her ikisi de membranın lipid içeriğini değiştirmezler ve çözeltiler içinde stabildirler (47).

Yağda eriyen bir bileşik olan A4 , kendisinin metil kuarterner bir analogu olup pozitif bir yük taşıyan A-5 ten de güçlü bir inhibitör etkiye sahiptir. Sinaptozomlarda A-4 ve A-5'in etkilerinin eşit olduğunu söyleyen yayınlar da mevcuttur (16, 17).

A-4, A-5 ve HC-3 , etanolamin geri alınımını da engellemektedirler. Etanolamin de kolin geri alınımını engellediğinden etanolamin ve kolin geri alınımının ortak bazı mekanizmaları içerdiği düşünülmektedir (16).

A-4 ve HC-3'ün kolin taşınması üzerindeki inhibitör etkileri benzer bulunmuştur. Buna rağmen striatal bölgedeki inhibitör etkinlikleri arasında büyük bir fark vardır. Bu A-4'ün lokomotor sistem üzerine olumsuz etkisini ortadan kaldırmaktadır. Aynı şekilde, HC-3 ile karşılaştırıldığında nöromüsküler kavşak iletimi üzerine A-4'ün etkisi yoktur. A-4'ün toksik etkisi HC-3'e göre çok daha azdır. Membranları geçme kapasitesi HC-3'e göre çok daha yüksektir. Etki süresi HC-3'ten çok daha uzundur. Hippokampusa etki ile motor sinir terminaline etki oranlandığında A-4 bariz bir biçimde hippokampusu seçmektedir. HC-3'te bu özgülük bulunmamaktadır.

A-4 ve HC-3 spontan hipertansif sıçanlarda arter basıncını düşürmüşlerdir. A-4 enjeksiyonunu takiben arter basıncının 5 dakika içinde süratle düşmesi kardiyovasküler sistem ile ilgili beyin bölgelerinde asetilkolinin sentez ve salınım döngüsünün oldukça hızlı olduğunu göstermiştir (15). Bu şekilde lipofilik A-4'ün etkisi lipofobik HC-3'ten daha çabuk başlamakta ve daha uzun sürmektedir.

A-4, A-5, ve HC-3'ün kinetik analizleri, bu bileşiklerin SDHACU'ini yarışmalı olarak inhibe ettiğini ve sodyumdan bağımsız düşük afiniteli kolin geri alınımı (SILACU)

üzerinde etkileri olmadığını göstermiştir. HC-3, A-4 ve A-5 'in neden olduğu inhibisyon kolin tarafından tersine çevrilmektedir (14, 16, 17). Yüksek kolin konsantrasyonlarında ya da sodyum yokluğunda bu bileşikler etkisizdirler.

A-4'ün HC-3'e göre bir üstünlüğü de pozitif yük taşımadığı için santral uygulama koşulunun bulunmamasıdır. Subkutan A-4 enjeksiyonları santral yüksek afiniteli kolin transportunda doz bağımlı bir azalma gerçekleştirmektedir.

HC-3 ve analogları, tersinir etkileri nedeniyle deney hayvanlarının kendi kendilerinin kontrolü olarak kullanılabilmelerine olanak sağlamakta (63) ve böylece AF64A gibi kolinotoksinlere göre daha avantajlı olmaktadır.

A-4 , asetilkolin sentez-salıverilme mekanizmalarını düzenleyen SDHACU sistemini araştırmak amacıyla kullanılabilecek yeni bir deneysel araç olma durumundadır (15).

AMAÇ

Bu çalışmanın amacı, sodyuma bağımlı yüksek afiniteli kolin geri alımın blokleri hemikolinyum-3 ile invitro çalışmalarda aynı etkiye sahip olduğu gösterilen metil piperidin türevi A-4'ün sıçanların pasif kaçınım davranışı üzerindeki etkisini araştırmaktır.

ARAÇ-GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deney Hayvanları ve Cerrahi İşlemler

Her iki cinsten Sprague-Dawley sıçanlar (250-350 g) laboratuvar koşullarında (Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı) üretilmiş ve yetiştirilmiştir. Deney için gerekli yaşa (5-8 ay) gelinceye kadar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık sağlayan fotoelektrik koşullarda uygun bölmelerde tutulmuşlardır. Yiyecek ve sıvı alımı kısıtlanmamıştır. Sıçanların elle tutulmasının ekstraselüler asetilkolin düzeyini artırdığı bilindiğinden (74) alıştırma seansları yapılmış ve hayvanların elle tutulmasına gereken önem verilmiştir.

Hayvanlara önce intraserebroventriküler (isv) kanül yerleştirilmiş bir haftalık iyileşme süresinden sonra ilaç uygulamalarına başlanmıştır. Deney hayvanları 7 gruba ayrılmıştır:

- 1) *Kontrol grubu:* Bu gruptaki hayvanlara isv kanül takılmamış ve enjeksiyon yapılmamıştır (n=6).
- 2) *Taşıyıcı kullanılan isv kontrol grubu:* İsv kanüllü hayvanlara yalnız serum fizyolojik (sf) enjekte edilmiş ve 60 dk sonra ilk pasif kaçınım testi uygulanmıştır (n=5).
- 3) *HC-3 doz-yanıt grubu:* Hayvanlara 1, 3 ve 5 nmol isv HC-3 enjekte edilmiş ve 60 dk sonra ilk pasif kaçınım testi uygulanmıştır (n=14).
- 4) *HC -3 zaman-yanıt grubu:* 3 nmol olarak belirlenen dozda isv HC-3 enjeksiyonu ilk pasif kaçınım testinden 30, 60 ve 120 dk önce yapılmıştır (n=14).
- 5) *A-4 doz-yanıt grubu:* Hayvanlara 10, 30 ve 50 nmol isv A-4 enjekte edilmiş ve 60 dk sonra ilk pasif kaçınım testi uygulanmıştır (n=16).
- 6) *A-4 zaman-yanıt grubu:* Uygun doz olarak belirlenen 30 nmol isv A-4 enjeksiyonu ilk pasif kaçınım denemesinden 30, 60 ve 120 dk önce yapılmıştır (n=19).
- 7) *Geri çevirme grubu:* 3 dakika ara ile A-4 (30 nmol, isv) ve kolin (1mmol, isv) enjeksiyonları yapılmış ve 60 dk sonra pasif kaçınım testi uygulanmıştır (n=5).

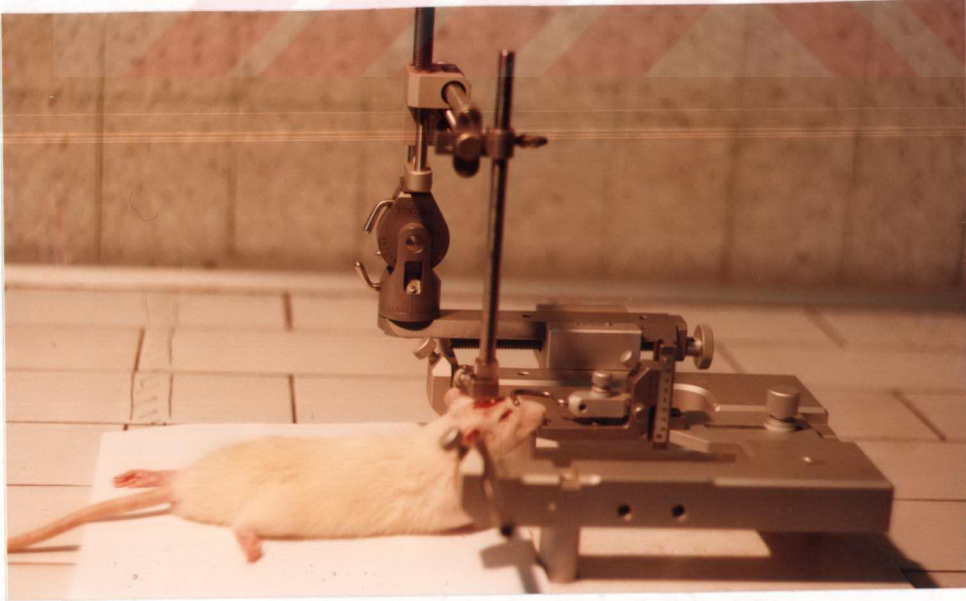
10) *Taşıyıcı kullanılan i.p. kontrol grubu*: Bu gruba sf intraperitoneal olarak verilmiştir (n=4).

9) *A-4 i.p. enjeksiyon grubu*: A-4 10, 20 ve 40 mmol/kg dozlarda intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve 60 dk sonra pasif kaçınım testi uygulanmıştır (n=14).

Enjeksiyondan 1 ve 24 saat sonra pasif kaçınım testi uygulanmıştır. Hayvanların lokomotor performansları rot-a-rod testi ile saptanmıştır. Her deneyin sonunda isv kanülün kontrolü yapılmıştır. Kontrol grubuna kanülasyon ve enjeksiyon işlemleri yapılmadan aynı protokol uygulanmıştır. Taşıyıcı grubuna ilaç yerine isv ya da i.p. serum fizyolojik verilmiştir. İntraperitoneal enjeksiyon grubuna isv kanül takılmamış, A-4 intraperitoneal olarak verilmiştir.

İntraserebroventriküler (isv) kanülasyon

Ketamin (100 mg/kg, i.p.) ve klorpromazin (0.75 mg/kg, i.p.) ile anestezi uygulanan sıçanların sağ lateral ventrikülüne stereotaksik cerrahi (resim 1) ile bregmadan 1.1 mm posterior, 1.5 mm lateral ve 3.2 mm derinlikteki koordinat noktasına paslanmaz çelikten bir eksternal kanül yerleştirilmiştir (71).



Resim 1) Stereotaksik cerrahi uygulanan deney hayvanı

Kanülün sabitlenmesi iki vida yardımı ve dental akrilik kullanılarak yapılmıştır. Lümeninin açık kalması için isv eksternal kanül, kör bir kanül ile kapatılmıştır. Bir haftalık iyileşme süresinden sonra kör kanül çıkarılarak internal kanül yerleştirilmiş ve bu yolla hayvanlara 5 ml hacim içinde HC-3 ve A-4'ün değişik dozları ya da serum fizyolojik enjeksiyonu (taşıyıcı grubu) yapılmıştır. Pasif kaçınım deneyinin ilk denemesi enjeksiyondan 30, 60 ve 120 dakika sonra yapılmıştır.

Pasif Kaçınım testi

Sıçanlara Jarvick ve Essman tarafından geliştirilen (1960) pasif kaçınım testi uygulanmıştır. Kemirgenlerin açık alandan ve aydınlıktan kaçmaları prensibi üzerine geliştirilmiş olan cihaz (resim 2), sıçanlar için 20x40x20 cm boyutlarında olup, ışık geçirmeyen karanlık bir oda ile duvarları şeffaf olan aynı boyutlardaki aydınlık bir odadan oluşmaktadır.



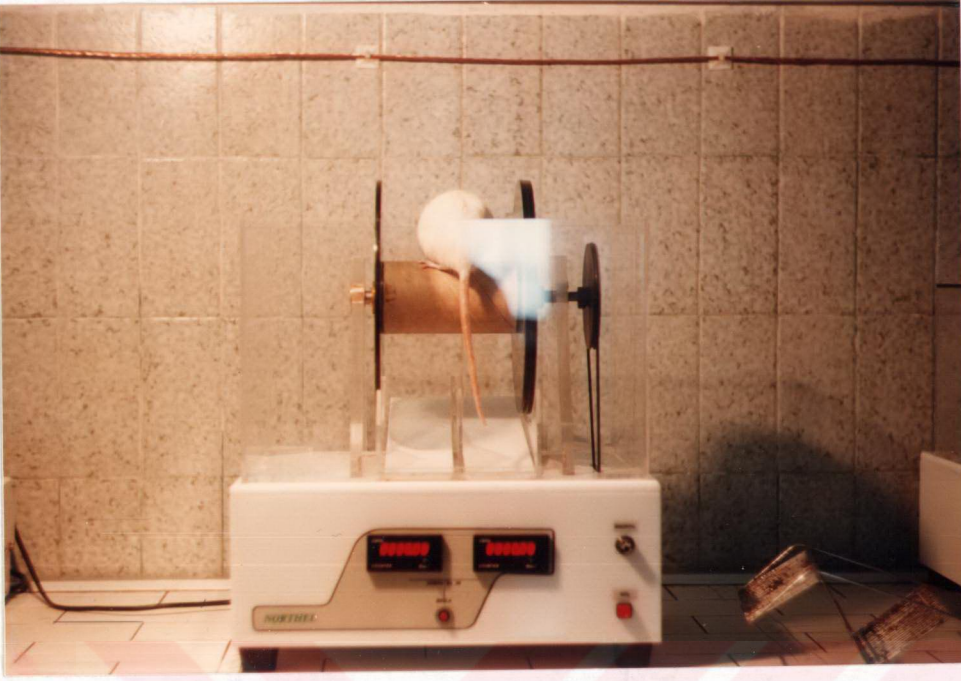
Resim 2) Pasif Kaçınım Cihazı

Aydınlık odanın ışığı 60 Wattlık iki floresan lamba ile sağlanmıştır. Lamba deney hayvanına ısı iletmeyecek biçimde monte edilmiştir. Karanlık odanın tabanı, elektrik akımını iletme üzere özel olarak bir grid ile döşenmiştir. Gridi oluşturan metal çubukların eni 0.5 cm ve aralarındaki mesafe 1 cm. dir Gridin üzerindeki potansiyel dağılımı sıçanın herhangi iki ayağını gridin herhangi bir bölgesine koyduğunda çarpılmayı sağlayacak biçimde düzenlenmiştir. Yapılan denemelerin tümünde hayvanın elektrik akımına maruz kaldığı görülmüştür

Stereotaksik cerrahiden sonra bir hafta süre ile iyileşmeye bırakılan değişik hayvan gruplarına ilaç enjeksiyonundan sonraki çeşitli süreler içinde (30, 60, 120 dk) pasif kaçınım testi uygulanmıştır. Hayvanlar şeffaf olan aydınlık bölüme yerleştirildiğinde, açık bulunan bir giyotin kapıdan doğaları gereği karanlık odaya geçmektedirler. Sıçanlar karanlık odada bulunan bir kızılötesi ışık kaynağı-sensör çiftinin arasına girdiklerinde kapı otomatik olarak kapanmakta ve sıçanlar karanlık odada 1 saniye süre ile 60 voltluk ve 1.25 mA.lik bir elektrik akımına maruz kalmaktadırlar. Bu arada kapının kapanmasıyla otomatik sayaç da durmakta ve deney hayvanının karanlık bölgeye geçmek için beklediği süreyi tesbit etmektedir. Yirmidört saat sonra yapılan ikinci denemede ise kontrol grubundaki (intakt) sıçanlar karanlık odaya bir daha geçmez iken, öğrenme ve hafıza işlevlerini bozucu tedavi alanlar farklı süreler içinde geçebilmektedirler. Sıçanların bu ikinci denemedeki tereddüt süresi (giriş zamanı) sayaç tarafından saniye cinsinden ölçülmüş ve kaydedilmiştir. 300 saniye üst değer olarak belirlenmiştir (cut-off time).

Lokomotor aktivite testi (Rot-a-rod)

Pasif kaçınım testine giren hayvanların lokomotor performanslarındaki bir bozukluk, kaçınım performansını da etkileyeceği için bu test uygulanmıştır. Hayvanlar lokomotor performanslarının ölçülebilmesi için 5 cm çapında ve giderek artan bir hızla dönen milin üzerine yerleştirilmiştir (resim 3).



Resim 3) Rot-a-Rod cihazı

Milin üzerinde 50 saniyeden daha uzun bir süre kalabilen hayvanların lokomotor performansları pasif sakınım testi için yeterli görülmüş, diğer hayvanlar deney dışı bırakılmışlardır.

Histolojik kontrol (isv kontrol)

İntraserebroventriküler kanülasyonun doğru yapıldığının test edilebilmesi için her deneyin sonunda hafif eter anestezisi altında lateral ventriküllere 5ml metilen mavisi enjekte edilmiş, dekapitasyon sonunda beyin çıkarılarak kesitleri alınmıştır. Lateral ventriküllerin maviye boyanması kanül yerleşiminin doğru yapıldığı şeklinde yorumlanmış, ventrikülleri içinde metilen mavisi görülmeyen diğer hayvanlardan elde edilen veriler değerlendirme dışında bırakılmıştır.

İstatistiksel Değerlendirme

Tüm gruplarda sonuçlar saniye cinsinden alınmıştır. Değerler ortalama ve standart hatalar şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılığa Student'ın t-testi ile bakılmıştır.



SONUÇLAR

Pasif kaçınım testinin eğitim aşaması olan ilk denemede (acquisition trial) deney hayvanlarının tümü 30 sn içinde karanlık odaya girmiştir. Enjeksiyon öncesinde tüm gruplardaki hayvanların gösterdiği araştırmacı davranış (exploratory behavior), lokomotor performans ve karanlık odaya geçiş zamanları açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı gözlenmiştir. İlk denemeden 24 saat sonra yapılan ikinci denemeden elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında ise, HC-3'ün değişik dozlarının (1, 3, ve 5 nmol) doza bağımlı bir yanıt oluşturduğu gösterilmiştir. Kontrol, taşıyıcı kullanılan kontrol grubu ve 1 nmol HC-3 gruplarının karanlık odaya giriş zamanları arasında anlamlı bir fark görülmezken 3 nmol (53.17 ± 15.09 sn.) ve 5 nmol HC-3 (24.18 ± 13.14 sn.) ile oluşan yanıtlar, kontrol, taşıyıcı kullanılan kontrol grubu ve 1 nmol gruplarından anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.01$). 3 ve 5 nmol grupları birbirinden farklı bulunmamıştır (Şekil 1).

HC-3 yanıtının etki-zaman profilini çıkarmak amacıyla, 3 nmol HC-3 enjeksiyonu ile eğitim amaçlı ilk pasif sakınım testi arasında 30 dk, 1 saat ve 2 saat beklenmiştir. 30 dk.lık grubun sonuçlarında kontrol grubu olarak kabul edilen 0. dakika grubu hayvanlarına göre anlamlı bir azalma gözlenmiş ($p < 0.01$), bir saatlik grubun sonuçları ise (53.17 ± 15.09 sn.) en düşük bulunmuş ($p < 0.01$), buna karşılık 2 saatlik grubun sonuçları (268.25 ± 31.75 sn.) kontrolden farksız bulunmuştur (Şekil 2).

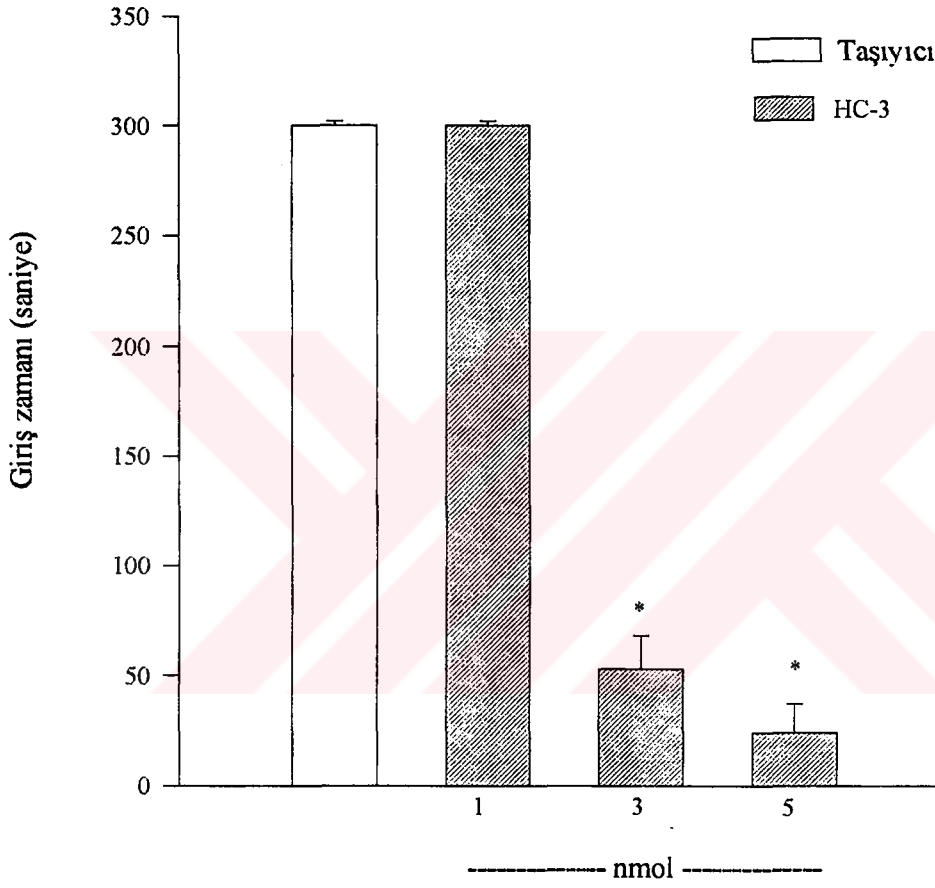
A-4'ün değişik dozlarının (10, 30, ve 50 nmol) doza bağımlı bir etkiye neden olduğu gösterilmiştir. Kontrol, taşıyıcı kullanılan kontrol grubu ve 10 nmol A-4 gruplarının karanlık odaya giriş zamanları arasında anlamlı bir fark görülmezken, 30 nmol (112.31 ± 8.68 sn.) ve 50 nmol A-4 (42.55 ± 12.54 sn.) gruplarının değerleri, kontrol, taşıyıcı kullanılan kontrol grubu ve 10 nmol gruplarından anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.01$). 30 ve 50 nmol grupları arasında da anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$). (Şekil 3).

A-4 yanıtının etki-zaman profilini çıkarmak amacıyla, 30 nmol A-4 enjeksiyonu ile ilk pasif sakınım testi (eğitim) arasında 30 dk, 1 saat ve 2 saat beklenmiştir. 30 dk. (105.67 ± 19.85 sn.), bir saat (112.31 ± 8.68) ve 2 saat (94.82 ± 17.76) gruplarının sonuçları kontrol grubu olarak kabul edilen 0. dakika grubu hayvanlarına göre anlamlı olarak azalmış ($p<0.01$) fakat birbirleri arasında fark görülmemiştir (Şekil 4).

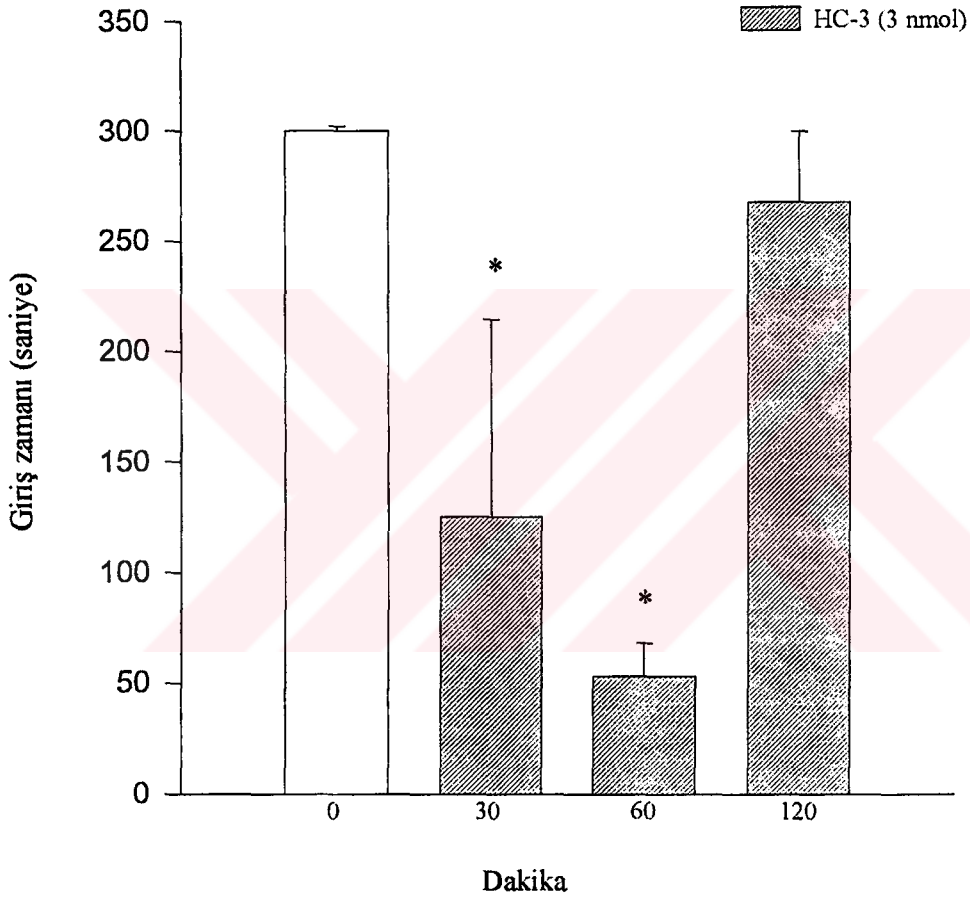
30 nmol A-4 enjeksiyonundan 3 dakika sonra 1 mmol kolin enjekte edilen ve 1 saat beklenen grubun skorları, yalnız 30 nmol A-4 enjeksiyonu yapılan gruba göre anlamlı bir şekilde yükselmiştir ($p<0.01$) (Şekil 5).

İntraperitoneal enjeksiyonlarda 10 mmol A-4 enjeksiyonu, i.p. sf enjekte edilen kontrol grubuna göre anlamlı bulunmamıştır. 20 mmol ve 40 mmol i.p. enjeksiyonlar ile giriş zamanları anlamlı bir biçimde azalmıştır ($p<0.01$). 20 ve 40 mmol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 6).



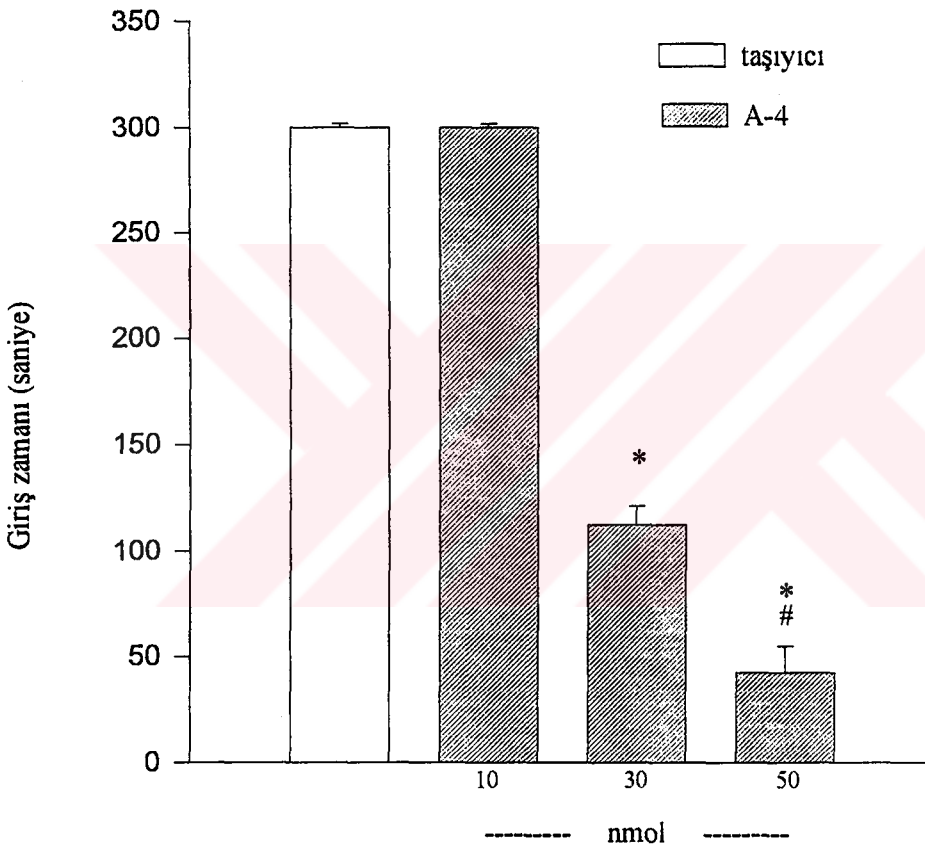


Şekil 1) İntraserebroventriküler olarak enjekte edilen serum fizyolojik (taşıyıcı) ve 1, 3, 5 nmol hemikolinium-3'ün 1. saatte pasif kaçınım performansı üzerine olan etkileri. Saniye cinsinden ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. * $p<0.01$ (kontrole göre)

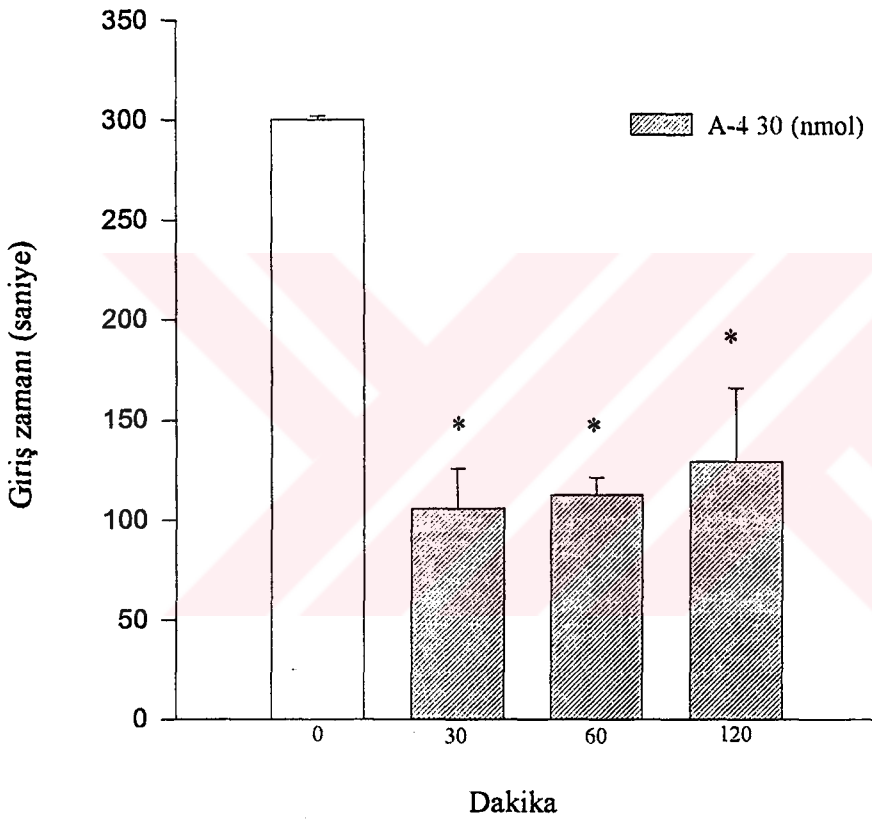


Şekil 2) İntraserebroventriküler olarak enjekte edilen 3 nmol hemikolinyum-3'ün 0, 30, 60 ve 90. dakikalarda pasif kaçınım performansı üzerine olan etkisi. Saniye cinsinden ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir.

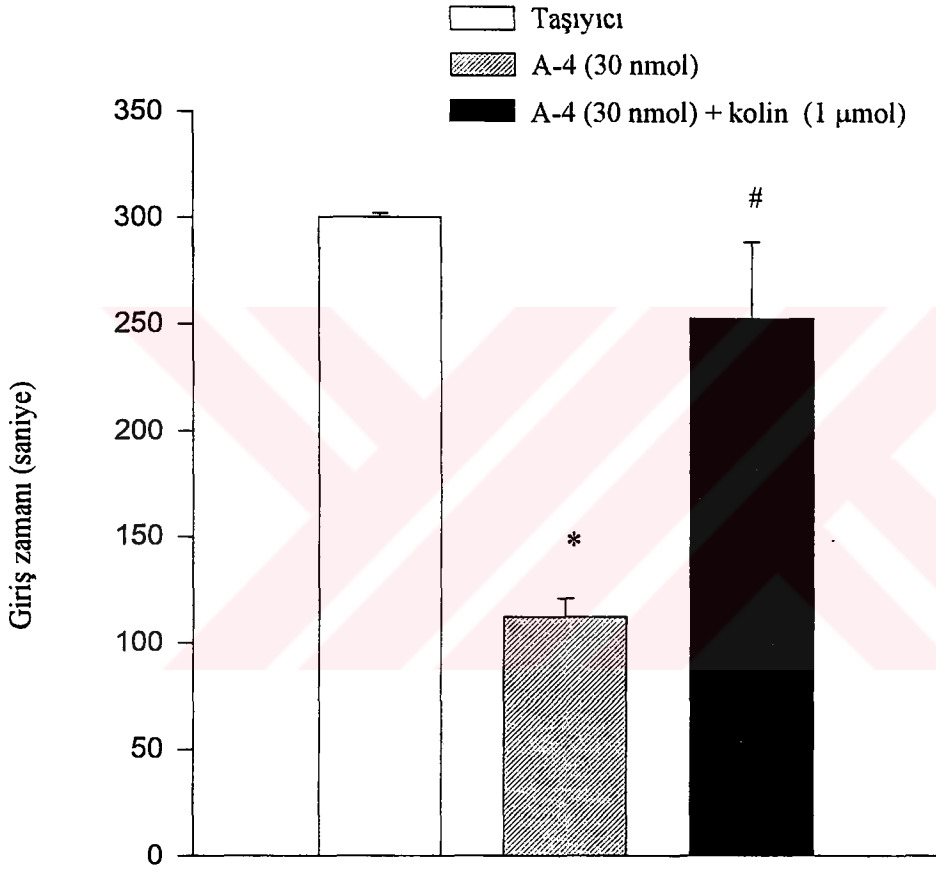
* $p < 0.01$ (0. dakikaya göre)



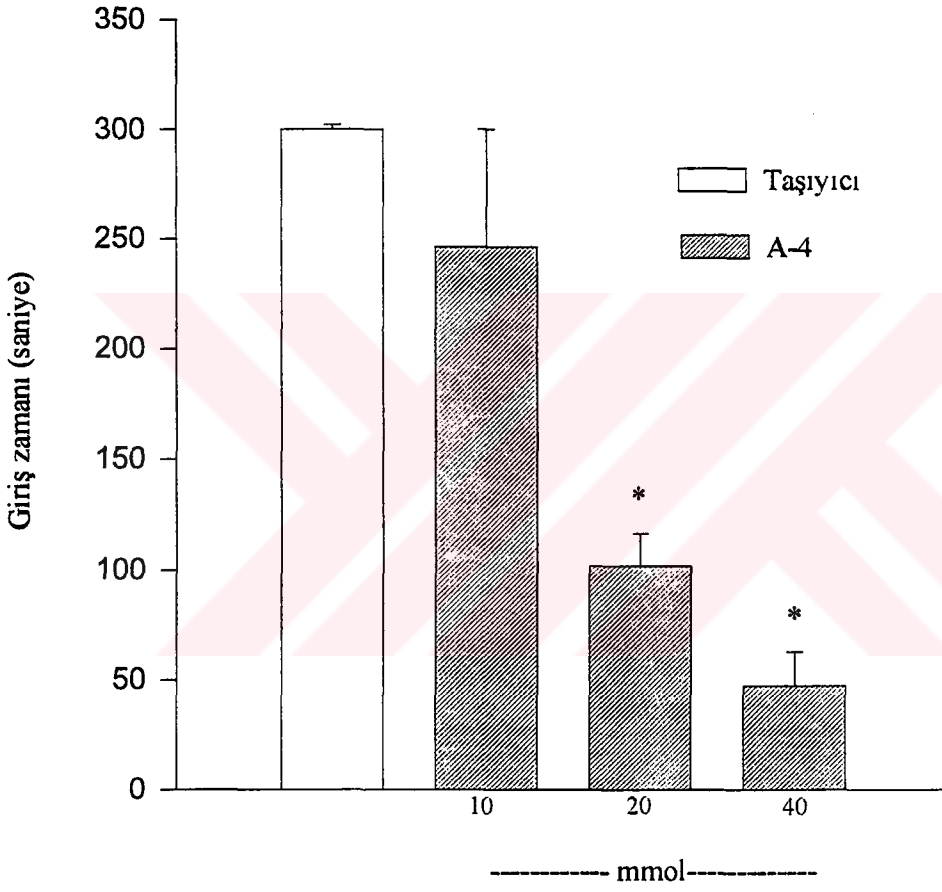
Şekil 3) İntraserebroventriküler olarak enjekte edilen sf (taşıyıcı) ve A-4'ün (10, 30 ve 50 nmol) 1. saatte pasif kaçınım performansı üzerine olan etkileri. Saniye cinsinden ortalama $\pm$ standart hata olarak belirtilmiştir.
* $p < 0.01$ (kontrole göre), # $p < 0.01$ (30 nmol'e göre)



Şekil 4) Intrasterebroventriküler olarak enjekte edilen 30 nmol A-4'ün 0, 30, 60 ve 120. dakikalarda pasif kaçınım performansı üzerine olan etkileri. Değerler saniye cinsinden ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. * $p < 0.01$ (0. dakikaya göre)



Şekil 5) Intraserebroventriküler olarak enjekte edilen 30 nmol A-4'ün 60. dakikadaki etkisinin isv 1 µmol kolin tarafından geri çevrilmesi. Değerler saniye cinsinden ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. * $p < 0.01$ (kontrole göre), # $p < 0.01$ (A-4 grubuna göre)



Şekil 6) Intraperitoneal olarak enjekte edilen sf ve A-4'ün (10, 20 ve 40 mmol) 1. saatte pasif kaçınım performansı üzerine olan etkisi. Değerler saniye cinsinden ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. * $p < 0.01$ (kontrole göre)

TARTIŞMA

Uzun yıllardan beri kolinerjik sistemin, kognitif fonksiyonlar üzerindeki rolü bilinmekte, özellikle ön beyin tabanında bulunan kolinerjik nöronların korteks ve hippokampustaki projeksiyon alanlarının öğrenme ve hafıza süreçleri ile sıkı bir ilişki içinde oldukları kabul edilmektedir (33, 34). Kolinerjik sistem etkinliğini SDHACU göstermektedir. İn vivo kolinerjik uyarı akışını azaltan ilaçların, SDHACU kapasitesini de azalttığı gösterilmiştir (62). SDHACU, kolinerjik fonksiyonda hız-sınırlayıcı aşamayı oluşturmaktadır. Kolinerjik fonksiyonu değerlendirmek amacıyla çok kullanılan parametrelerden olan ChAT aktivitesi önemli oranda inhibe edildiğinde bile, ACh düzeyinin değişiklik göstermediği bulunmuştur (18). Ayrıca kolinerjik aktivitede gerçekleşen büyük değişimler, ChAT ve AChE değişiklikleri ile paralellik göstermemektedir. SDHACU özellikle ön beyin tabanının kolinerjik fonksiyonunun azaldığı durumlarda ChAT'a göre daha da güvenilir hale gelmektedir. Kolinerjik fonksiyonun azaldığı bu durumlar ise öğrenme ve hafıza deneylerinin büyük bir bölümünü ve Alzheimer modellerini kapsamaktadır. Bu şekilde SDHACU'nin ACh sentezini ve kolinerjik nöron fonksiyonunu daha iyi yansıttığı düşünülmektedir.

SDHACU sadece kolinerjik sisteme özgü olduğu için, tersinmez bir SDHACU blokeri olan AF64A'nın kullanımı ile o ana kadar kolinerjik nöronlara spesifik hasarlama yapamamanın sıkıntısı büyük ölçüde giderilmiştir. Ancak AF64A'nın tersinmez bir bloker oluşu sebebiyle zamanla kolinerjik nöron hasarı oluşmakta, bu nedenle bu madde "nörotoksin" ya da "kolinotoksin" ismiyle de anılmaktadır.

Kolinerjik harabiyet, buna bağlı diğer nonkolinerjik sistemleri de etkilemektedir. Bu nedenle salt kolinerjik sistem ya da asetilkolinin bilişsel işlevlerdeki rolünün ayırteci bir biçimde incelenemediğine dair kuşklar bulunmaktadır. Bu özelliği nedeniyle AF64A bilişsel işlev bozukluklarından Alzheimer ve diğer demanslar için deneysel modelleme olanağı sunabilmektedir. Ancak asetilkolin ve kolinerjik sistemin fizyolojik etkilerini özgün olarak inceleyebilmek için, etkisi geriye dönüşlü bir madde gerekmektedir.

AF64A'nın toksik etkilerinin tersinmez bir bloker oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir. HC-3 de 14 günden uzun süreli infüzyon şeklinde ön beyin tabanına verildiğinde nöronal hasar oluşturmuştur. HC-3'ün sitotoksik olmadığı ve kolinerjik nöron fonksiyonunu dolaylı olarak ve hücre içine girmeden, hücre membranı üzerindeki koline özgü reseptör bölgeleri için kolinle yarışarak bozduğu bilinmektedir. Kronik infüzyon şeklinde kullanımında oluşan bu hücrel harabiyetin nedeni bilinmemektedir. Kolin geri alınımının uzun süreli blokajının hücrenin yaşamsal faaliyetini bozduğu, bu şekilde nöron kaybına neden olduğu düşünülmektedir. Bu da AF64A'nın neden sitotoksik olduğuna bir açıklama getirebilmektedir (30). Bir kolin geri alım blokerinin sitotoksik etkisinin görülmemesi için tersinir olması ve kısa süreli kullanılması gerekmektedir.

İbotenik asit, kainik asit, AMPA, ile yapılan kimyasal ve elektrolitik lezyonlar sonucu ortaya çıkan bilişsel bozuklukların fizostigmin, pilokarpin, arekolin, oksotremorin gibi kolinerjik maddelerle düzeltilmesini içeren araştırmalarda haraplamının selektif olmayışı, lezyonla oluşturulan davranışsal bozukluğun yalnızca ACh kaybindan kaynaklandığı iddiasında bulunulmasını engellemektedir. Selektiflik sorununun, yanı sıra geniş cerrahi uygulamalar büyük ölçüde hayvan tüketimine neden olduğundan doz-yanıt çalışmalarına engel olmaktadır. Buna alternatif yaklaşım, tersinir etkili bir madde kullanmayı gerektirmektedir. Bu şekilde hayvanlar kendi kontrolleri olarak da kullanılabilirler. Ridley ve arkadaşları primatlarda bu şekilde isv HC-3 ile öğrenme bozukluğu oluşturmuşlardır (63). Böylelikle doz-yanıt çalışmaları gibi deney hayvanı sayısını birkaç katına çıkaran araştırmalarda maymun gibi değerli hayvanların kullanımının olanaklı hale geldiği öne sürülmektedir.

HC-3'ün selektif ve geriye dönüşlü olarak kolinerjik terminallerde sodyuma bağımlı yüksek afiniteli kolin geri alınımını (SDHACU) inhibe ettiği ve spesifik bir kolinerjik hipofonksiyon oluşturduğu 1954'ten bu yana bilinmektedir. HC-3'ün presinaptik kolinerjik göstergelerin (örn. SDHACU, ACh düzeyi, ACh salıverilmesi) düzeylerini azaltması, ancak postsinaptik etkili olmaması (örn. muskarinik reseptör yoğunluğu üzerinde) onun presinaptik karakterini göstermektedir. Böylece HC-3 presinaptik kaynaklı, kısa etkili ve spesifik olan bir kolinerjik hipofonksiyon meydana getirmekte ve bu kolinerjik hipofonksiyon çeşitli öğrenme ve hafıza paradigmalarında performans bozukluğu

oluşturmaktadır. HC-3'ün kolinerjik nöronlar üzerindeki etki mekanizması bazı avantajlar içermektedir. Yüksek afiniteli kolin taşıyıcıları kolinerjik akson terminallerine spesifiktir. Ekzojen kolinin bu taşıyıcılar tarafından geri alınımı hız sınırlayıcı faktördür ve asetilkolin sentezi ile ilişkilidir. "Salınabilir asetilkolin"in sentezinde kullanılan kolin, yalnızca SDHACU taşıyıcıları tarafından taşınan kolindir. Bu özgülük nedeniyle kolin "geri alım taşıyıcıları"nın miktarını belirlemek için radyoaktif işaretli HC-3 kullanılmıştır. HC-3'ün etki mekanizması, taşıyıcılar üzerindeki nükleofilik aktif bölgelerin alkilasyonu yolu ile HC-3'ün bu taşıyıcılara hızla ve tersinir bir biçimde bağlanmasına dayanmaktadır.

Çalışmamızda kontrol grubundaki sıçanlar ikinci denemede karanlık odaya girmemişlerdir. Bu, çalışmada kullanılan hayvanların pasif kaçınım testinden başarıyla geçebildiklerini göstermiştir. Bu hayvanların tümü tavan değer olarak kabul edilen 300 saniyenin üzerinde performans göstermişlerdir. Taşıyıcı kullanılan kontrol grubunun, kontrol grubu ile aynı performansı göstermesi, yapılan stereotaksik cerrahi ve sf enjeksiyonunun öğrenme davranışını değiştirmediğini ortaya koymuştur. 1 nmol HC-3 enjeksiyonu yapılan sıçanlar da kontrol ve taşıyıcı kullanılan kontrol gruplarının başarısını tekrarlamışlardır. Bu da 1 nmol HC-3'ün öğrenme işlevi üzerine olumsuz bir etkisi olmadığını göstermiştir. 3 ve 5 nmol verilen gruplarda ise sıçanların karanlık odaya giriş süreleri anlamlı bir biçimde azalmıştır. 5 nmol grubunun giriş ortalaması 3 nmolden belirgin olarak daha az bulunmasına rağmen bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. HC-3'ün SDHACU blokajı yapması öğrenme bozukluğu oluşturmuştur. Bu bozulma ya kortikal kolinerjik nöronların ya da nükleus bazalisden kortekse uzanan yolakların inhibisyonuna bağlı olabilir. İkinci yolağın öğrenme ve hafıza performansında çok hassas olduğu bilinmektedir.

HC-3'ün öğrenme mekanizmaları üzerine olumsuz etkisi daha önce araştırılmış fakat pasif kaçınımda sıçanlar kullanılmamıştır. Bu çalışmada HC-3, sıçanların öğrenme davranışını pasif kaçınım testinde doza ve zamana bağlı olarak bozmuştur. HC-3 pasif kaçınım testi üzerine etkisini ilk 30 dakikada göstermeye başlamış, 1 saatte maksimuma ulaşarak 2. saatte yeniden azalma göstermiştir. Dolayısıyla 2 saatten sonraki öğrenme bozukluğunu pasif kaçınım

testi ortaya koyamamıştır. Diğer hayvanlarla ve başka deney düzenekleri ile yapılan çalışmalarda HC-3'ün 6 saate kadar etki yaptığı bildirilmiştir.

HC-3 kan-beyin bariyerini geçemediği için deneysel çalışmalarda isv uygulama zorunluluğu bulunmakta ve etki süresi de bir kaç saat ile sınırlı kalmaktadır. HC -3 analogları üzerine oldukça yoğun araştırmalar yapılmaktadır. HC-3'ün pek çok analogu arasında tersiyer yapıdaki tek bileşik olan A-4'ün in vitro kinetik analizleri yapılmış, ancak bu güne kadar in vivo davranış deneylerinde kullanılmamıştır.

Bu çalışmada A-4'ün öğrenme ve hafıza üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. 10 nmol A-4'ün isv olarak verildiği grup kontrol grubu kadar başarı göstermiştir. Dolayısıyla 10 nmol isv A-4'ün öğrenme işlevini bozucu bir etkisi gözlenememiştir. Etki 30 nmol'de başlamaktadır. 30 nmol A-4 enjekte edilen grubun ortalaması kontrol grubu, taşıyıcı kullanılan kontrol grubu ve 10 nmol grubundan anlamlı olarak farklı bulunmuştur. 50 nmol A-4 enjeksiyonu yapılan grubun ortalaması ise 30 nmol grubundan anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu da etkinin doz-bağımlı olduğunu göstermektedir. In vitro deneylerde A-4'ün SDHACU blokeri olduğu gösterilmiş, bu in vivo çalışmada da bu etki spesifik, yani doz-bağımlı olarak ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla A-4'ün oluşturduğu bu öğrenme bozukluğu olasılıkla SDHACU blokajına bağlıdır.

A-4'e yanıt 30 dk.da başlamış, 1. ve 2. saatte bu yanıt devam etmiştir. 30. dk, 1. saat ve 2. saatler arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu da etkinin azalmadan devam ettiği anlamına gelmektedir. In vitro çalışmalarda da, A-4'ün HC-3'ten çok daha uzun etkili olduğu ortaya konmuştur.

A-4'ün etkisinin kolin tarafından geri çevrilmesi, A-4 molekülünün olası başka etkileri nedeniyle değil, fakat öğrenme ve hafıza fonksiyonunu SDHACU üzerindeki inhibitör etkisinden dolayı bloke ettiğini daha da desteklemektedir. Benzer şekilde A-4'ün hipotansif etkisi üzerinde yapılan çalışmada da A-4'ün hipokolinerjik etkisi intravenöz verilen kolinklorid ile geri çevrilmiştir.

Yapılan in vitro çalışmalarda yüksek kolin konsantrasyonlarında SILACU'nun hakim hale geldiği belirtilmektedir (61). Ancak kolin enjeksiyonu ile kolin belli bir düzeyin üzerine çıkamamaktadır. Dolayısıyla 1 mmol kolin enjeksiyonu ile beyin kolin konsantrasyonu in vitro çalışmalarda belirtilen 250 mM kolin düzeyine erişmemektedir. Dolayısıyla, kolin enjeksiyonu sonrası oluşan bilişsel fonksiyonlardaki iyileşme, kolin geri

alınımını SDHACU yerine SILACU'nun üstlenmesi ile değil, bloke olan SDHACU taşıyıcıları için kolinin A-4 ile yarışması sonucu ortaya çıktığı anlaşılmaktadır.

Kolin yüklemesinin hiperaktivite yaptığı bildirilmiştir (61). Bu çalışmada hiperaktiviteye dair bir bulguya rastlanmamıştır. Ayrıca kolin enjeksiyonu yapılan hayvanlarda rot-a-rod cihazı ile ölçülen lokomotor aktivite de normal bulunmuştur.

Bugüne kadar SDHACU mekanizmalarını araştırmak üzere kullanılabilecek uygun bileşik sayısının az olmasından dolayı, bu konudaki bilgilerin henüz yeterli bir düzeyde olmadığı belirtilmektedir. En azından farklı kolin taşıyıcı tipleri olduğu, buna yönelik farklı SDHACU mekanizmaları bulunduğu iddia edilmektedir. A-4 'ün SDHACU mekanizması üzerinden etki ettiği bilinmekle birlikte, HC-3 ile tümüyle aynı mekanizmayı paylaşıp paylaşmadığını söylemek şu anda güç gözükmektedir.

A-4 ile HC-3'ün bilişsel fonksiyonlar üzerindeki etkileri aralarındaki fark ile in vitro inhibitör etkileri arasındaki fark birbiriyle uyumlu gözükmektedir (14).

A-4 sistemik kullanımında da etkili olmuş ve öğrenme davranışını bozmuştur. Bu onun tersiyer molekül yapısı ile uygunluk göstermektedir. A-4 sistemik enjeksiyonda kan-beyin bariyerini aşabilmektedir. Bu özelliği ile A-4'ün içme suyuna katılarak etki göstermesi olası gözükmektedir. A-4'ün bu özelliği öğrenme davranışının incelenmesine büyük bir kolaylık getirecektir. Demans modellemeleri çok ucuz ve çok kolay bir biçimde yapılabilecektir. Elimizde bulunan HC-3 ve A-4'ten, hem daha uzun süreli olan etkisi hem de uygulanma kolaylığı ile A-4'ün tercih edilme olasılığı yüksek gözükmektedir. Bu nedenle, davranış deneylerinde tersinir etkili, kolinerjik sisteme özgü molekül ihtiyacını A-4'ün karşılayacağı anlaşılmaktadır.

ÖZET

Bu çalışmada hemikolinyum-3 (HC-3) ve metil piperidin analogu A-4'ün Sprague-Dawley sıçanların pasif kaçınım performansı üzerine olan etkisi araştırılmıştır. İntroserebroventriküler ve intraperitoneal olarak enjekte edilen HC-3 ve A-4, pasif kaçınım davranışını doza bağımlı olarak bozmuştur. İntroserebroventriküler HC-3'e verilen pasif kaçınım testi yanıtı 30 dakika içinde başlamış, 1. saatte en düşük performans gözlenmiş, 2 saatin sonunda ise geriye dönmüştür. İntroserebroventriküler A-4'e verilen pasif kaçınım testi yanıtı ise ilk 30 dakikada başlamış ve 2 saat sonunda devam etmiştir. A-4'ün pasif kaçınım performansını bozucu etkisi isv kolin ile geri çevrilmiştir. Tersiyer molekül yapısına sahip olan A-4 intraperitoneal enjeksiyonla da pasif kaçınım performansını bozmuştur.

SUMMARY

In this study, the effect of hemicholinium-3 (HC-3) and its methyl piperidine derivation A-4 on passive avoidance performance of Sprague-Dawley rats was evaluated. Intracerebroventricular injections of HC-3 and A-4 dose-dependently impaired passive avoidance behavior. The response to icv HC-3 has begun in 30 minutes and at 1. hour the performance was significantly low as compared to control and 30-minute-group. The response has terminated at the end of the second hour. The response to icv A-4 has begun in 30 minutes and has continued at the end of the second hour. The effect of A-4 that impaired the passive avoidance performance has been reversed by icv choline. A-4, that has tertiary molecule structure also intraperitoneally impaired passive avoidance behavior.

KAYNAKLAR

- 1) Brown, A.G., Learning and memory (Ch. 18): In Nerve Cells and Nervous Systems, pp 245-253. Springer-Verlag, London, 1991.
- 2) Smith, A., Bellek (Ch. 10): In İnsan Beyni ve Yaşamı, pp 207-220, İnkılab kitabevi, İstanbul, 1995.
- 3) Smith C.U.M., Memory (Ch.18): In Elements of Molecular Neurobiology, pp 433-444., Wiley Medical Publication, 1989.
- 4) Roediger H.L., Rajaram S., Srinivas K., Specifying criteria for postulating memory systems: In The Development and Neural Basis of Higher Cognitive Functions. Annals of New York Academy of Sciences. V.608, pp 572-596, New York, 1990.
- 5) Whitehouse P.J., Price D.L., Struble R.G., Clark A.W., DeLong M.R., Alzheimer's Disease and senile dementia: loss in the basal forebrain. *Science*, 215: 1237-1239, 1982.
- 6) Carlson N.R., Learning and memory (Ch 14): In Physiology of Behavior (5th ed), pp 431-447, Allyn and Bacon, 1994.
- 7) Dokla C.J., Thal L.J., Effect of cholinesterase inhibitors on Morris water task behavior following lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Behavioral Neuroscience*, 102 (6) : 861-871, 1988.
- 8) Dunnet S.B., Comparative effects of cholinergic drugs and lesions of nucleus basalis or fimbria-fornix on delayed matching in rats. *Psychopharmacology*, 87: 357-363, 1985.
- 9) Alheid G.F., Heimer L., New perspective in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders; The striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience*, 27(1): 1-39, 1988.
- 10) Overstreet D.H., Russel R.W., Animal models of memory disorders: In Neuromethods (Vol.19), Animal models in psychiatry II, The Humana Press Inc, 1991.
- 11) Olton D.S., The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. *Physiology and Behavior*, 40: 793-797, 1987.

- 12) Lamberty Y., Gower A.J., Gobert J., Hanin I., Wulfert E., Behavioral, biochemical and histological effects of AF64A following injection into the third ventricle of the mouse. *Behavioral Brain Research*, 51: 165-177, 1992.
- 13) Tedford C.E., Schott M.J., Flynn J.R., Cannon J.G., Long J.P. A-4, a bis tertiary amine derivative of hemicholinium-3 produces in vivo reduction of acetylcholine in rat brain regions. *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, 240 (2): 476-485, 1987.
- 14) Chatterjee T.K., Long J.P., Cannon J.G., Bhatnagar R.K., Methyloperidine analog of hemicholinium-3: a selective, high affinity noncompetitive inhibitor of sodium dependent choline uptake system. *European Journal of Pharmacology*, 149: 241-248, 1988.
- 15) Özkutlu U., Shaffer R.A., Lewis S.J., Long J.P., A-4, a tertiary amine analog of HC-3, lowers arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 272: 1352-1358, 1996.
- 16) Sheff K.Y., Mark A.Y., Long J.P., Hemicholinium-3 derivatives A-4 and A-5 alter choline metabolism in NB41A3 neuroblastoma cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 257: 323-330, 1991.
- 17) Sheff K.Y., Yorek M.A., Long J.P., Hemicholinium-3 derivatives A-4 and A-5 affect choline and acetylcholine metabolism. *European Journal of Pharmacology*, 206: 105-112, 1991.
- 18) Jope R.S., High affinity cholin transport and acetylcholin production in brain and their roles in the regulation of acetylcholine synthesis. *Brain research review*, 1: 313-344, 1979.
- 19) Hagan J.J., Jansen J.H.M., Broekkamp C.L.E., Hemicholinium-3 impairs spatial learning and the deficit is reversed by cholinomimetics. *Psychopharmacology* 98: 347-356, 1989.
- 20) Dolezal V., Wecker L., Modulation of acetylcholine release from rat striatal slices: Interaction between 4-aminopyridine and atropine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 762-766, 1991.
- 21) Grigoryan G.A., Mitchell S.N., Hodges H., Sinden J.D., Gray J.A., Are the cognitive-enhancing effects of nicotine in the rat with lesions to the forebrain cholinergic projection system mediated by an interaction with the noradrenergic system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 49(3): 511-521, 1994.

- 22) Opello K.D., Stackman R.W., Ackerman S., Walsh T.J., AF64A (Ethylcholine mustard aziridinium impairs acquisition and performance of a spatial, but not a cued water maze task: relation to cholinergic hypofunction. *Physiology and Behavior*, 54: 1227-1233, 1993.
- 23) Fortuna S., Pintor A., Michalek H., Adaptive processes of the central and autonomic cholinergic neurotransmitter system: Age-related differences, *Life Sciences*, 48 (8): 831-842, 1991.
- 24) Brandeis R., Brandys Y., Yehuda S., The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *International Journal of Neuroscience*, 48: 29-69, 1989.
- 25) Wecker L., The synthesis and release of acetylcholine by depolarized hippocampal slices is increased by increased choline available in vitro prior to stimulation. *Journal of Neurochemistry*, 57 (4): 1119-1126, 1991.
- 26) Chrobak J.J., Spates M.J., Stackman R.W., Walsh T.J., Hemicholinium prevents the working memory impairments and the cholinergic hypofunction induced by ethylcholine aziridinium ion (AF64A). *Brain Research*, 504 : 269-275, 1989.
- 27) Dunnet S.B., Toniola G., Fine A., Ryan C.N., Björklund A., Iversen S.D., Transplantation of embryonic ventral forebrain neurons to the neocortex of rats with lesions of nucleus basalis magnocellularis-II. Sensorimotor and learning impairments. *Neuroscience*, 16(4): 787-797, 1985.
- 28) Morris R., Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11: 47-60, 1984.
- 29) McNamara R.K., Skelton R.W., The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Research Review*, 18: 33-49, 1992.
- 30) Hurlbut B.J., Lubar J.F., Switzer R., Dougherty J., Eisenstadt L., Basal forebrain infusion of HC-3 in rats: Maze learning deficits and neuropathology. *Physiology and Behavior*, 39: 381-393, 1987.
- 31) Bekkers J.M., Stevens C.F., Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 346 (23 Aug) 724-728, 1990.
- 32) Wecker L., Mobley P.L., Detbarn W.D., Central cholinergic mechanisms underlying adaptation to reduced cholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology*, 26: 633-636, 1977.
- 33) Francis P.T., Pangalos M.N., Bowen D.M., Animal and drug modelling for Alzheimer synaptic pathology. *Progress in Neurobiology*, 39 (5): 517-545, 1992.

- 34) Giacobini E., Pharmacotherapy of Alzheimer disease: New drugs and novel strategies. In Progress in Brain Research, Cuello A.C. (Ed), Vol. 98, pp 447-454.
- 35) Nilsson O.G., Shapiro M.L., Gage F.H., Olton D.S., Bjorklund A., Spatial learning and memory following fimbria-fornix transection and grafting of fetal septal neurons to the hippocampus. *Experimental Brain Research*, 67: 195-215, 1987.
- 36) Nakamura S., Tani Y., Maezono Y., Ishihara T., Ohno T., Learning deficits after unilateral AF64A lesions in the rat basal forebrain: Role of cholinergic and noncholinergic systems. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 42: 119-130, 1992.
- 37) Collerton D., Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer disease. *Neuroscience*, 19 (1): 1-28, 1986.
- 38) Altavista, M.C., Rossi P., Bentivoglio A.R., Crociani P., Albanese A., Aging is associated with a diffuse impairment of forebrain cholinergic neurons. *Brain Research*, 508: 51-59, 1990.
- 39) Barnes C.A., Aging and the physiology of spatial memory. *Neurobiology of aging* 9: 563-568, 1988
- 40) Decker M.W., The effects of aging on hippocampal and cortical projections of the forebrain cholinergic system. *Brain Research Reviews*, 12: 423-438, 1987.
- 41) Perry E.K., Tomlinson B.E., Blessed G., Bergmann K., Gibson P.H., Perry R.H., Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *British Medical Journal* 2: 1457-1459, 1978.
- 42) Fischer W., Chen K.S., Gage F.H., Bjorklund A., Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain cholinergic neurons in rats during aging, *Neurobiology of aging*, 13:1, 9-23, 1992.
- 43) Riekkinen P.Jr., Sirviö J., Riekkinen P., The effects of THA on medial septal lesion-induced memory defects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 36: 237-241, 1990.
- 44) Meguro K., Yamaguchi S., Arai H., Nakagawa T., Doi C., Yamada M., Ikarashi Y., Maruyama Y., Sasaki H., Nikotin improves cognitive disturbance in senescence-accelerated mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49: 769-772, 1994.

- 45) Marighetto A., Micheau J., Jaffard R., Effects of intraseptally injected glutamatergic drugs on hippocampal sodium-dependent high affinity choline uptake in naive and trained mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49(3): 689-699, 1994.
- 46) Sasaki H., Matsuzaki Y., Meguro K., Ikarashi Y., Maruyama Y., Yamaguchi S., Sekizawa K., Vitamin B12 improves cognitive disturbance in rodents fed a cholin-deficient diet. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 43: 635-639, 1992.
- 47) Sheff K.Y., Yorek M.A., Long J.P., Characterization of the effect of two 4-methyl piperidine derivatives of hemicholinium-3, A-4 and A-5 on choline transport. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 255: 357-363, 1990.
- 48) Whishaw I.Q., Cholinergic receptor blockade in the rat impairs locale but not taxon strategies for place navigation in a swimming pool. *Behavioral Neuroscience* 99(5): 979-1005, 1985.
- 49) Holley L.A., Miller J.A., Chmielewski P.A., Dudchenko P., Sarter M., Interactions between the effects of basal forebrain lesions and chronic treatment with MDL 26479 on learning and markers of cholinergic transmission. *Brain Research*, 610: 181-193, 1993.
- 50) Mannisto P.T., Tuomainen P., Kutepova O., Borisenko S.A., Zolotov N., Voronina T., Effects of bilateral cholinotoxin infusions of the behavior and brain biochemistry of the rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49(1): 33-40, 1994.
- 51) Dekker A.J., Gage F.H., Thal L.J., Delayed treatment with nerve growth factor improves acquisition of a spatial task in rats with lesions of the nucleus basalis magnocellularis: evaluation of the involvement of different neurotransmitter systems. *Neuroscience*, 48:1, 111-120, 1992.
- 52) Ingram D.K., London E.D., Goodrick C.L., Age and neurochemical correlates of radial maze performance in rats. *Neurobiology of Aging*, 2: 41-47, 1981.
- 53) Williams L.R., Rylett R.J., Exogenous nerve growth factor increases the activity of high affinity choline uptake and choline acetyltransferase in brain of Fischer-344 male rats, *Journal of Neurochemistry*, 55: 1042-1049, 1990.
- 54) Sheff K.Y., Tedford C.E., Flynn J.R., Yorek M.A., Cannon J.G., Long J.P. Stereoisomers of quaternary and tertiary 4-methyl piperidine analogs of hemicholinium-3. *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, 247 (2): 640-644, 1988.

- 55) Dunbar G.L., Rylett R.J., Schmidt B.M., Sinclair R.C., Williams L.R., Hippocampal choline acetyltransferase activity correlate with spatial learning in aged rats. *Brain Research*, 604: 266-272, 1993.
- 56) Tarricone B.J., Keim S.R., Simon J.R., Low W.C., Intrahippocampal transplants of septal cholinergic neurons: high-affinity choline uptake and spatial memory function. *Brain Research*, 548: 55-62, 1991.
- 57) Baratti C.M., Huygens P., Mino J., Merlo A., Gardella J.Jr. Memory fascilitation with posttrial injection of oxotremorine and physostigmine in mice. *Psychopharmacology*, 64: 85-88, 1979.
- 58) Bartus R.T., Evidence for direct cholinergic involvement in the scopolamine-induced amnesia in monkeys: effects of concurrent administration of physostigmine and methylphenidate with scopolamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 9: 833-836, 1978.
- 59) Sitaram N., Weingartner H., Gillin J.C., Human serial learning : Enhancement with arecholine, choline and impairment with scopolamine. *Science*, 201: 274-276, 1978.
- 60) Miyamoto M., Shintani M., Nagaoka A., Nagawa Y., Lesioning of the rat basalforebrain leads to memory impairments in passive and active avoidance tasks. *Brain Research*, 328 (1): 97-104, 1985.
- 61) Wecker L., Schmidt D.F., Central cholinergic function relationship to choline administration. *Life Sciences*, 25:4, 1979
- 62) Trimarchi G.R., Buccafusco J.J., Changes in regional brain synaptosomal high affinity choline uptake during the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Neurochemical Research* 12 (3): 247-254, 1987.
- 63) Ridley R.M., Barrat N.G., Baker H.F., Cholinergic learning deficits in the marmoset produced by scopolamine and icv hemicholinium. *Psychopharmacology*, 83(4): 340-5, 1984.
- 64) Tedford C.E., Flynn J.R., Bhatnagar R.K., Cannon J.G., Long J.P. Alterations in acetylcholine metabolism in rat striatal slices by a 4-methyl piperidine analog of hemicholinium-3. *The Journal of Pharmacology and expeimental Therapeutics*, 247 (2): 460-465, 1988.
- 65) Long J.P., Schueler F.W., A new series of choline esterase inhibitors. *Journal of American. Pharmacology Association*, 43:79-86, 1954.

- 66) Sahakian B., Janes G., Levy R., Gray J., Warburton D., The effects of nicotine on attention, information processing, and short-term memory in patients with dementia of the Alzheimer type. *British Journal of Psychiatry* 154: 797-800, 1989.
- 67) Vickroy T.W., Presynaptic cholinergic actions by the putative cognitive enhancing agent duP 996. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 264(2): 910-917, 1993.
- 68) Mouton P.R., Meyer E.M., Dunn A.J., Millard W., Arendash G.W., Induction of cortical cholinergic hypofunction and memory retention deficits through intracortical AF64A infusions. *Brain Research*, 444: 104-118, 1988.
- 69) Nijst T.Q., Wevers R.A., Schoonderwaldt H.C., Hommes O.R., de Haan A.F., Vitamin B12 and folate concentrations in serum and cerebrospinal fluid of neurological patients with special reference to multiple sclerosis and dementia. *Journal of Neurology Neurosurgery and psychiatry*, 53(11): 951-4, 1990.
- 70) Gottfries C.G., Pharmacological treatment strategies in Alzheimer type dementia. *European Neuropsychopharmacology*, 1(1): 1-5, 1990.
- 71) Paxinos G., Watson C., The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (2nd Ed.). Academic Press
- 72) Yamaguchi, F., Richards, S.J., Beyreuther, K., Salbaum, M., Carlson, G.A., Dunnett, S.B., Transgenic mice for the amyloid precursor protein 695 isoform have impaired spatial memory. *Neuroreport*, 12(2): 781-785, 1991.
- 73) Sirvio J., Riekkinen P.Jr., Valjakka A., Jolkkonen J., Riekkinen P.J., The effects of noradrenergic neurotoxin, DSP-4, on the performance of young and aged rats in spatial navigation task, *Brain Research* 563(1-2), 297-302, 1991.
- 74) Fischer W., Nilsson O.G., Bjorklund, A., In vivo acetylcholine release as measured by microdialysis is unaltered in the hippocampus of cognitively impaired aged rats with degenerative changes in the basal forebrain. *Brain Research*, 556 (1): 44-52, 1991.