

Siliyer Aktivitelinin Kontrolünde Kolinergic Mekanizmalar

K. KAYMAK

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi
(Yard. Doç. Dr.) EDİRNE

ÖZET :

Kullandığımız organizma duysal algılamaya, eksitabil membrana ve ağrı hareket cevaplarına sahip bir hücreli bir hayvan olan paramesyumdu.

Gözlemlerimizi % 0.15 marul infuzyonunda çoğaltığımız paramesyum hücrelerinde faz kontrast mikroskop ile yaptık. Paramesyum hareketine kolinergic ligantların etkisini oda sıcaklığında araştırdık. Asetikolinin mikromolar konsantrasyonları paramesyumda yüzece hareketin hızlandırır. Ouabain ve nikotinin mikromolar konsantrasyonları ise inhibe eder.

Sonuçlar paramesyumun eksitabil zarının iyon permeabilitesinin kolinergic kontrol altında olduğunu göstermektedir. Burada sil hareketi üzerine elde edilen verilerin zorluğu ve kolinergic ligantların etkileri arasındaki fark tartışılmaktadır.

SUMMARY : We continued our observations by phase contrast microscope on paramecia which were grown at room temperature in 0.15 per cent lettuce infusion medium. We examined at room temperature the effects of various cholinergic ligands on the motion of paramecia. Macromolar concentrations of acetylcholine increase the swimming behaviour in paramecium, while micromolar concentrations of ouabain and nicotine inhibit it.

CHOLINERGIC MECHANISM ON THE CONTROL OF CILIARY ACTIVITY

The organism we use is Paramecium, a unicellular animal that has sensory reception, an excitable membrane and several motile responses.

We continued our observations by the phase contrast microscope on paramecia which were grown at room temperature in 0.15 per cent lettuce infusion medium. We examined at room temperature the effects of various cholinergic ligands on the motion of paramecia. Macromolar concentrations of acetylcholine increase the swimming behaviour in paramecium, while micromolar concentrations of ouabain and nicotine inhibit it.

The results indicate that tonic permeability across the excitable membrane of paramecium may be under cholinergic control. The difficulty of obtaining data on the ciliary movement, and the difference between the effects of cholinergic ligands are discussed.

GİRİŞ :

Sil hareketi, sillili bir hücreli canlılarda gözleendiği gibi çok hücreli canlıların özel bazı hücrelerinde de görülmektedir. Silin hareketi, ilkel canlıların bir kısmında, organizmanın bir yerden bir yere hareketini, çevresindeki maddelerin uzaklaştırılmasını veya yaklaştırmasını sağlar.

K. KAYMAK

İzmir Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoloji Bölümü

İzmir 35150, TURKEY

Deney materyelimiz olan paramesyumda hareket, ektoplazmada bulunan bazal cisimlerden çıkan ve hücre zarı ile sarilarak perifere uzanan sillerin belirli bir düzen içinde ritmik olarak kuvvetli ve yavaş vuruşlarıyla bağlandığı. Sitofarinkse yakın bir yerden, yani 'motorium' adı verilen bölgeden çıktıgı kabul edilen kinetodezmal fibrillere, bazal cisimleri birbirine bağlayıp sillerin ritmik ve düzenli çalışmasını sağladığından 'nöromotor sistem' adı da verilmektedir.

Sillerin, flagellumların ve sperm kuyruğunun hareketi için gerekli kuvvet, silde çevresel bulunan dokuz çift mikrotübülün kollarındaki ATPaz özelliği gösteren 'dynein' protein tarafından sağlanır. Bu kuvvet, sildeki komşu çevresel mikrotübül çiftlerinin aktif olarak kaymasını sağlar^{1, 5, 17, 18, 21}. Son deneysel çalışmalar, siller yada flagellumlarla yaratılan dalgalı hareketin aksonem yapısındaki çevresel mikrotübül çiftlerinin kayması ile sağlandığını göstermektedir. Silde çevresel mikrotübüler simetrik olarak düzenlenliğinden, oluşan bu kuvvet karşı tarafın etkisiyle bozulabilir.

JENNINGS tarafından 1906 yılında paramesyumda başlatılan elektrofizyolojik çalışmalar^{23, 25} daha sonra pek çok araştırcı tarafından ilerletilmiştir. Silvuruşunun aktivitesi zarda yaratılan reseptör potansiyeli ile birlikte; kontrolü henüz aydınlatılamamıştır^{9, 10, 13, 14}.

Öldürücü doz altında olmak koşuluyla kimyasal maddelerin çoğu paramesyumun öne doğru hareketini, bir kısmı da geri yüzme hareketini hızlandırır. Benzer cevaplar Browning ve Nelson² tarafından da kaydedilmiştir.

Asetilkolin ve kolinesteraz inhibitörüyle paramesyumun galvanotaktik cevaplarının değiştiği kaydedilmiştir^{12, 19}. Daha sonraki çalışmalarında, paramesyumda K⁺la meydana gelen ters yüzme hareketi ve asetilkoline olan cevaplar sitrat yada EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) gibi Ca²⁺ bağlayıcı maddeler ile durdurulabilmektedir²⁹.

Asetilkolin, kuvvetli muskarinik ve zayıf nikotinik reseptör antagonisti karbamikolin ve nikotinik reseptör antagonisti haksametanyum gibi maddelerin yüksek konsantrasyonları paramesumu immobilize ederler.³⁰ Eserin ve difisopropilfluorofosfat silli Tetrahymena'nın hareketini inhibe eder^{16, 22, 28}. Bazı araştırcılar Tetrahymena'da ve hücre parçalarında lokalize olmuş kolinesteraz aktivitesi bulmuşlardır.

Çalışmamızda kolinergic ligantların belirli konsantrasyonlarındaki eriyiklerinde hücrenin doğrusal yüzme hızını ölçerek hareket üzerine etkilerini gözlemlayı amaçladık ve ölçümlerimizi serbest yüzerek yaşayan bir hücrede, yani deney koşullarına uygunluğu ideal olan siliyat paramesumda yaptık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER :

Hücre hareketine kolinergic ligantların etkisini incelemek amacıyla serbest yaşayan siliyat paramesumların kuru ot infuzyonunda stok kültürü yapıldı. Bu

SİLİYER AKTİVİTENİN KONTROLÜNDE KOLİNERJİK MEKANİZMA

kültürden, Karl Zeiss stereomikroskopu altında mikropipetle izole edilen hücreler (% 0,15 marul infuzyonunda oda ısısında üretildi).

% 0,15 marul ortamı iki aşamada gerçekleştirildi: Marul tozunun hazırlanması, infuzyonun yapılması.

Fırında kurutulmuş marul tozunun hazırlanması: Marul yaprakları birer birer koparılarak kahverengi ve benekli olmayan yapraklar alındı. Bunlar akan çeşme suyunda yıkandıktan sonra deionize saf sudan geçirildi. Filtre kağıdı ile suyu alındı. Yapraklar açık kahverengi olana kadar 110°C'de fırında yaklaşık iki saat kurutuldu. Koyu kahverengi ve kahverengi olmamış yapraklar atılıp, uygunlar bir porselen havanda ezilerek ince toz haline getirildi.

Marul infuzyonunun yapılması: Yeni deionize saf suyun litresine 15 g (% 0,15) marul tozu konup su banyosunda 10-15 dakika kaynatıldı. Soğuduktan sonra滤re kağıdından süzüldü. Kaynama sırasında kaybolan su kadar deionize saf su eklenerek temiz ve renkli şişelere konarak buzdolabında saklandı.

Hazırlanan infuzyonun uygunluk testi için stereomikroskopta mikropipetle izole edilen tek hücre, lamel üzerindeki bir damla infuzyon ortamına alındı. Bu lamel, asılı damla teknigi ile ters çevrilerek (damla çukur boşluğununa gelecek şekilde) yerleştirildi. Dammanın kurumaması için halka ile lamelin arasına imersiyon yağı yürüldü. Bir gün 25°C'de inkübe edildikten sonra 5-6 bölünme görülen ortam uygun sayıldı. Hücre sayımı için % 1 NiCl₂ kullanıldı.

Hücre hareketini yavaşlatıp, daha iyi inceleme olanağı bulmak için % 2 metilselüloz (Tylose MH 300) jelı kullanıldı. Mikroskoba adapte edilebilen, organizmanın bulunduğu preparatin yerleştirildiği ısı gradient odasının ısısı bir ısı stabilizatörü ile ayarlandı. Präparati bulunduran bölümün altından sıcaklığı ölçülebilen ve geçisi de damla sayısıyla ayarlanan su dolaştırıldı.

Hücre hareketine etkisi incelenen üç maddenin, yani asetilkolin klorit, ouabain ve nikotinin 10⁻² — 10⁻⁶ M arasında, beş belirli konsantrasyonda eriyikleri deionize saf su ile hazırlandı.

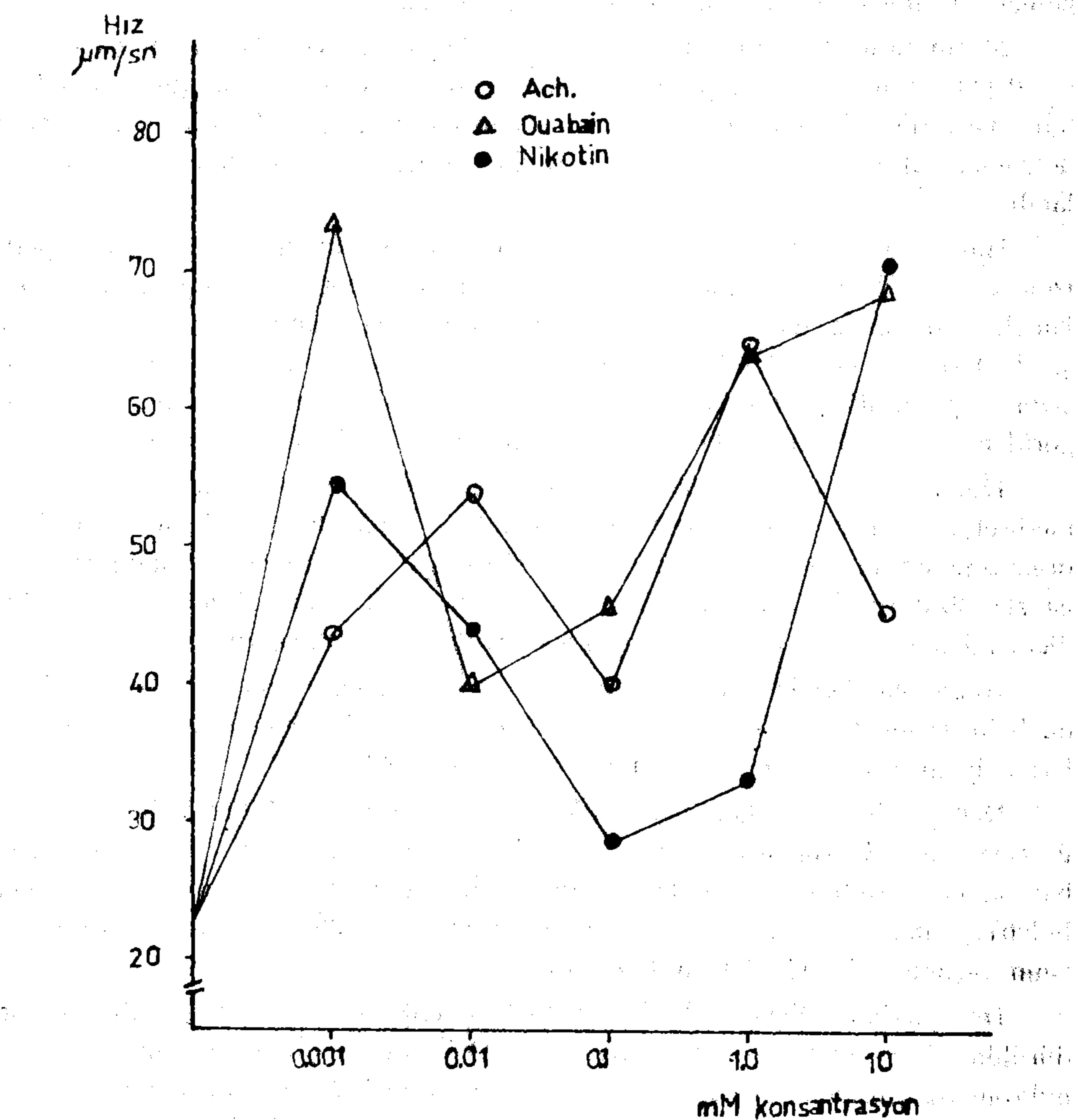
Deney için temiz lam üzerine küçük bir damla % 2 metilselüloz, bunun üzerine eşit miktarda test eriyiği ve birkaç adet hücre konarak bir topluğne başıyla karıştırıldı ve lamel ile kapatıldı. Hücrelerin bulunduğu ortam suyunun buharlaşmaması için lamel kenarına likit vazalin sürüldü. Hücrenin yüzme hızının ölçümü için 15 dakika beklandı.

Deneylerimiz Olympus BHB faz kontrast mikroskopta x 20 büyütmede sürdürdü. Mikrometrik sistemle taksimatlı okülerin iki çizgisi arasındaki uzunluğu mikrometre cinsinden saptandı. Deney eriyiklerinin her konsantrasyonda enazı beş aralığı doğrusal olarak yüzme süreleri kronometre ile ölçüldü. Bu işlem, her konsantrasyonda on kez yinelendi. Ölçümler 24 ± 1°C ısında yapıldı.

Deneysel ortamı oluşturan maddelerin belirli konsantrasyonlarındaki her bir deneyde kronometre ile tespit edilen zaman ve bu zamanda alınan yoldan (μm) saniyedeki hız hesaplandı.

BULGULAR :

Hücrelerin hareketine etkileri incelenen maddelerin belirli konsantrasyonlarındaki eriyiklerinde, onar kez tekrarlanan deneylerde elde edilen ortalama hızlar ($\mu\text{m}/\text{sn}$), Çizelge 1'de ve Şekil 1'de verilmektedir. Ortamların konsantrasyonları 0.001, 0.01, 0.03, 0.1, 1.0 ve 10 mM olmak üzere iki farklı seviyede (0.001 ve 10 mM) verilmiştir.



Şekil : 1. Maddelerin konsantrasyonlarında hücrelerin yüzme hızları

SİLİYER AKTİVİTENİN KONTROLUNDU KOLINERJİK MEKANİZMA

yonları ile hız arasındaki ilişki katsayı, t değeri ve önemlilik düzeyi Çizelge 2'de yer almıştır. Değişik maddelerin belirli konsantrasyonlu eriyiklerinin yüzme hızına etkileri, çizelgeler ve şekildeki verilerin istatistiksel değerlerine göre belirlendi. Bu değerler 0.05'ten küçük ise iki ortalama arasındaki farkın önemli, değilse rasgele meydana geldiği kabul edildi.

Çizelge 1 : Maddelerin belirli konsantrasyonlarında yüzme hızı ortalamaları

Deney ortamı	Değerler	Konsantrasyondaki (mM/L) hız ($\mu\text{m/sn}$)				
		10	1	0.1	0.01	0.001
Asetilkolin	X	45.00	64.51	39.66	53.81	43.47
	SH	1.15	1.48	1.19	1.76	0.70
Ouabain	X	68.41	64.00	45.49	39.87	73.65
	SH	2.11	2.63	2.02	1.26	2.21
Nikotin	SH	70.25	33.03	28.73	44.22	54.60
	X	1.21	1.90	0.99	1.09	1.70

Çizelge : 2 Maddelerin konsantrasyonlarıyla ortalama hızın ilişki katsayıları ve önemlilik düzeyleri

Maddeler	İlişki katsayı (r)	t değeri	Önemlilik düzeyi
Asetilkolin	-0.164	-0.292	$0.50 < p < 0.90$
Ouabain	0.409	0.850	$0.20 < p < 0.50$
Nikotin	0.769	3.262	$0.02 < p < 0.05$

Deney ortamı olarak kullanılan maddelerin değişik konsantrasyonlarında hücrelerin yüzme hızları Çizelge 1 - 2'de ve Şekil 1'de karşılaştırılmıştır. Verilere göre en yüksek ve en düşük yüzme hız ortalamaları şöyle bulundu:

Asetilkolinde en yüksek hız ortalaması $64.51 \pm 1.48 \mu\text{m/sn}$ ile 1 mM'de, en düşük hız $39.66 \pm 1.19 \mu\text{m/sn}$ ile 0.1 mM'de görülürken; ouabainde $73.65 \pm 2.21 \mu\text{m/sn}$ ile en yüksek hızı 0.001 mM'de, $39.87 \pm 1.26 \mu\text{m/sn}$ ile en düşük hız 0.01 mM'de görüldü. Nikotinde ise en yüksek ortalama yüzme hızı $70.25 \pm 1.21 \mu\text{m/sn}$ ile 10 mM'de, en düşük hız da $28.73 \pm 0.99 \mu\text{m/sn}$ ile 0.1 mM'de bulundu. Nikotin konsantrasyonlarının hücrenin yüzme hızına etkisi önemli bulundu ($0.02 < p < 0.05$).

TARTIŞMA VE SONUÇ :

Paramesyumun yüzmeye hareketi sil zarının elektriksel aktivitesiyle düzenlenir^{3, 8, 9}. Bu kontrol, ortaya çıkan mediatörün zarı uyarması ve eksitabl zarın iyon permeabilitesi değişmesi sonucu zarın elektriksel cevaplarıyla olur.

K^+ 'la yaratılan hareket cevaplarının modifikasyonu olan etkili sil ters vuruşunda ve sil zarının Ca^{2+} permeabilitesinde voltaj sensitif mekanizmanın aktivasyonu kolinerjik ligantlardan asetilkolinin bir fonksiyonu olarak kabul edilir. İzole sillerde asetilkolin esteraz aktivitesi bulunmuştur^{2, 4, 6, 28}. Andrivon, enzimin rolünü bildirmemesine rağmen paramesyum ekstraktlarında spesifik kolinerjik esteraz aktivitesi olduğunu kaydetmiştir. Paramesyum embriyolojik olarak kolinerjik bir sisteme sahiptir. Bunun için gerekli protein de vardır, ama fizyolojik rolü aydınlatılamamıştır.

Ekstraselüler olarak kullanılan asetilkolin, K^+ 'la ortaya çıkan sil ters vuruşu üzerine iki türlü etkili olur: Birincisi, asetilkolinin mikromolar konsantrasyonları siliyer ters vuruşun sürekliliğini artırmak; ikincisi, yüksek konsantrasyonlarda çok kısa 'şok cevaplar' yaratmaktadır. Son çalışmalarda^{7, 15, 19, 21} paramesyumda K^+ 'la yaratılan sil ters vuruşu üzerine kolinin inhibitör etkide olması, hücre zarı dinlenim potansiyeli üzerine etkisi dikkat çekicidir.

Hem gallamin (flaksedil) hem de d-tübokürarin spesifik nikotinik reseptör antagonisti olarak tanınır. d-tübokürarin K^+ 'la meydana gelen siliyer ters vuruş cevaplarının özelliklerini değiştirir. Gallaminin mikromolar konsantrasyonları paramesyumu immobilize eder. Bu immobilizasyon K^+ varlığında daha da uzun sürmetkedir.

Ni^{2+} 'in, sil zarındaki Ca-ATPaz üzerine belirgin bir inhibitör etkisi olduğu asetilkolinin ise ne bu ATPaz'a nede aksinemdeki 'dynein' protein ATPaz aktivitesi üzerine etkili olmadığı bildirilmektedir^{3, 13}.

DOUGHTY⁶, paramesyumun eksitabl zarında Ca^{2+} permeabilitesinin kolinerjik kontrol altında olduğunu bildirmektedir. Asetilkolinin, karbamilkolin, eserin ve diisopropilflourofosfatın siliyat tetrahimena ve paramesyumda hareketi inhibe ettiği saptanmıştır. Bizim bulgularımıza göre hareketi aktive ettiği görülmektedir. Paramesyumlarda lokalize asetilkolin esteraz aktivitesinin bulunması^{7, 18, 19, 21} K^+ ile meydana gelen sil vuruşlarının asetilkolinin bir hidroliz ürünü olan kolin ile inhibe olması asetilkolinin depolarizasyon işlevinde katkısı olduğunu düşündürmektedir.

K^+ ile uyarılan sil vuruşu değişiminde ve sil zarında voltaja duyarlı Ca^{2+} permeabilitesinin aktivasyonunda asetilkolinin rolü olduğu düşünülmektedir.

SİLİYER AKTİVİTENİN KONTROLÜNDE KOLİNERJİK MEKANİZMA

Nikotin, K^+ 'la uyarılan siliyer ters vuruş cevapları üzerine önemli bir inhibitör işlevi sahiptir. Nikotinin aşağıdaki konsantrasyonları, asetilkolinle benzer önde olduğu harket hızında önemli bir artmaya neden olur. Deneylerimizde nikotinin konsantrasyonları ve hücrenin yüzme hızı arasında önemli bir ilişki gözledik ($0.02 < p < 0.05$). Asetilkolin ve ouabain konsantrasyonları ile hücrenin yüzme hızı ortalamaları arasında önemli ilişki bulunmadı. Ancak ilkel bir hücrenin hareketine bu maddelerin de en azından etkili olmaları, metazoan hücre fonksiyonlarındaki önemleri bakımından ilgi çekici olarak düşünülmektedir.

KAYNAKLAR :

1. Allen, R. D.: A reinvestigation of cross-sections of cilia. *J. Cell Biol.*, 37: 825 — 831, 1968.
2. Brownin, J. L., Nelson, D. L.: Biochemical studies of the excitable membrane of *Paramecium aurelia*. $^{45}Ca^{2+}$ fluxes across resting and excited membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 448: 338 — 351, 1976.
3. Chin, J. H.: Differential sensitivity of calcium channels to dihydropyridines. The modulated receptor hypothesis. *Biochem. Pharmacol.*, 35: 4115 — 4120, 1986.
4. Cong, Z., et al.: Actions of membrane-active drugs on agonist occupation and functional state of nicotine acetylcholine receptors. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*, 6: 231 — 236, 1985.
5. Doughty, M. J.: Control of ciliary activity in *Paramecium* — I modification of K^+ — induced ciliary reversal by temperature and ruthenium red. *Com. Biochem. Physiol.*, 61: 369 — 373, 1978.
6. Doughty, M. J.: Control of ciliary activity in *Paramecium* — II modification of K^+ — induced ciliary reversal by cholinergic ligands and quaternary ammonium compounds. *Com. Physiol.*, 61: 375 — 384, 1978.
7. Doughty, M. J., Dodd, G. H.: Fluorimetric determination of the resting potential changes associated with the chemotactic response of *Paramecium*. *Biochem. Biophys. Acta*, 451: 592 — 603, 1978.
8. Dunlap, K.: Localization of Ca^{2+} channels in *Paramecium caudatum*. *J. Physiol. (Lond.)*, 271: 119 — 133, 1977.
9. Evans, P. D., et al.: Receptors and ion channels. *J. Exp. Biol.*, 124: 1 — 4, 1986.
10. Huvelle, E., et al.: Direct methods of measuring ciliary beats. *Rev. Med. Liege*, 42: 140 — 155, 1987.
11. Klotz, I. M.: Ligand — receptor interactions. *Q. Rev. Biophys.*, 18: 227 — 259, 1985.

12. Kohtoyants, K. H., Kokina, N. N.: On the role of acetylcholine—cholinesterase system in the phenomenon of galvanotaxis and summation of stimuli in *Paramecium*. *Biofizika*, 2 : 47 — 50, 1957.
13. Machemer, H.: Interactions of membrane potential and cations in regulation of ciliary activity in *Paramecium*. *J. Exp. Biol.*, 63 : 427 — 433, 1976.
14. Machemer, H., Eckert, R.: Ciliary frequency and orientation responses to clamped voltage steps in *Paramecium*. *J. Comp. Physiol.*, 104 : 247 — 260, 1975.
15. Mishina, M.: Structure and function of the nicotinic acetylcholine receptor. *Seikagaku*, 58 : 1275 — 1291, 1986.
16. Murakami, A.: Control of ciliary beat frequency in the gill of *Mitilus* — 1. Activation of the lateral cilia by cyclic AMP. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86 : 273 — 279, 1987.
17. Noguchi, M., Inoué, H., Kubo, K.: Calcium — activated Adenosine Triphosphatase Activity of Pellides from *Paramecium caudatum*. *J. Biochem.*, 85 : 367 — 373, 1979.
18. Omoto, C. K., Kung, C.: The pair of central tubules rotates during ciliary beat in *Paramecium*. *Nature*, 279 : 532 — 534, 1979.
19. Preston, R. R., et al.: Localization of the chemoreceptive properties of the surface membrane of *Paramecium tetraurelia*. *J. Comp. Physiol.*, 160 : 537 — 541, 1987.
20. Price, M., et al.: Regional distribution of muscarinic receptors preferring gallamine in the rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 35 : 4171 — 4176, 1986.
21. Satir, B., Sale, W. S., Satir, P.: Membrane renewal after dibucaine deciliation of *Tetrahymena*. *Exp. Cell Res.*, 97 : 83 — 91, 1976.
22. Seaman, G. R., Houlihan, R. K.: Enzyme systems in *Tetrahymena geleii*. Acetylcholinesterase activity. Its relation to coordinated ciliary action in general. *J. Cell Comp. Physiol.*, 37 : 309 — 321, 1951.
23. Shuster, F. L., Prazak, B., Ehret, C. F.: Indaction of trichocyst discharge in *Paramecium bursaria*. *J. Protozool.*, 14 : 483 — 485, 1967.
24. Sonneborn, T. M.: Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. *J. Exp. Zool.*, 113 : 87 — 147, 1950.
25. Sonneborn, T. M.: Methods in *Paramecium* research. *Meth. Cell Physiol.* 4 : 241 — 339, 1970.
26. Steinbach, J. H., et al.: Function of nicotinic acetylcholine receptors. *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, 41 : 19 — 42, 1987.
27. Stroud, R. M., et al.: Acetylcholine receptor structure, function, and evolution. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1 : 317 — 351, 1985.
28. Van Eys, J., Warnock, L. G.: Inhibition of motility of ciliates through methonium drugs. *J. Protozool.*, 10 : 465 — 467, 1963.