



T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SUBSTANTIA NIGRA'DAKİ DOPAMİN NÖRONLARINDA
KAİNAT RESEPTÖR ALT BİRİMLERİNİN EKSPRESYONU**

Dr. Fulya TOSUN

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2008



T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SUBSTANTIA NIGRA'DAKİ DOPAMİN NÖRONLARINDA
KAINAT RESEPTÖR ALT BİRİMLERİNİN EKSPRESYONU**

Dr. Fulya TOSUN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Fatma Zehra MİNBAY

Bursa – 2008

İÇİNDEKİLER

Türkçe Özet.....	ii
İngilizce Özet.....	iv
Giriş.....	1
Glutamat ve Glutamat Reseptörleri.....	1
Dopamin, Dopaminerjik Nöronlar ve Bazal Ganglion.....	4
Substansiya Nigradaki DAerjik Nöronlar ve Glutamat Reseptörleri.....	7
Gereç ve Yöntem.....	10
Bulgular.....	20
Tartışma ve Sonuç.....	34
Kaynaklar.....	42
Ekler.....	48
EK-1: Kısaltmalar.....	48
EK-2: Çalışmada kullanılan solüsyonların hazırlanışı.....	50
Teşekkür	52
Özgeçmiş	54

ÖZET

Dopaminerjik nöronların, memeli beyinde birbirinden bağımsız alanlarda yerleştiği (arkuat çekirdek, substansiya nigra, ventral tegmental alan gibi) ve glutamaterjik akson sonlanmaları ile sinaps yaptıkları gösterilmiştir. Bu alanlardan biri substansiya nigra (SN)'dır ve merkezi sinir sisteminin değişik bölgelerinden glutamaterjik innervasyon alır. Glutamat etkisini metabotropik ya da iyonotropik glutamat reseptörlerine bağlanarak gösterir ve bu reseptörlerin Parkinson hastalığı ve benzeri nörodejeneratif hastalıkların patolojik süreçlerinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Parkinson hastalığı ile yakından ilişkili SN'da iyonotropik glutamat reseptörlerinden NMDA ve AMPA reseptörlerinin varlığı, *in situ* hibridizasyon ve immunohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir. Ancak, kainat reseptörleriyle ilgili çalışmalar sınırlıdır ve çelişkili sonuçlar vermektedir. Çalışmamızda, SN dopamin nöronlarında kainat reseptörlerinin varlığının ve cinsiyetler arası ekspresyon farklılığının gösterilmesi amaçlandı. Erişkin sıçan beyinlerinden kriyostat ile alınan seri kesitlere tirozin hidroksilaz (TH) ve kainat reseptör alt birimleri (GluR5, GluR6, GluR7 ve KA2) antikoru ile ikili immunofluoresan işaretleme yapıldı. TH-pozitif nöronların tümü KA2 proteini eksprese ederken, GluR5 eksprese eden TH-pozitif nöronlar dişilerde % 67.8 ve erkeklerde % 65 olarak belirlendi. Bu oranlar, GluR6 için, dişilerde % 70.2, erkeklerde % 78.2, ve GluR7 için dişilerde % 81.1, erkeklerde % 82.6 olarak bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonucu cinsiyetler arasında fark olmadığı belirlendi. Bu sonuçlar, SN dopamin nöronlarının büyük bir kısmının kainat reseptör altbirim proteinlerini eksprese ettiğini göstermekte ve NMDA ve AMPA reseptörlerinin yanı sıra kainat reseptörlerinin de dopaminerjik nöronların glutamaterjik modülasyon ve regülasyonuna aracılık ettiğini düşündürmektedir. Bu reseptörlerin SN'daki varlığı, eksitatör aminoasitlerin neden olduğu nöronal toksisite göz önüne alındığında, Parkinson hastalığındaki selektif dopaminerjik nöron ölümünün temelinde, hücresel glutamat reseptörlerin rol oynayabileceği görüşünü desteklemektedir.

(Bu alışma, TÜBİTAK 106S029 no'lu proje (F.Z.Minbay) kapsamında desteklenen çalışmanın bir bölümüdür).

Anahtar kelimeler: substansiya nigra, kainat reseptörleri, tirozin hidroksilaz, immunohistokimya, kolokalizasyon

SUMMARY

Kainate Receptor Subunit Expression in Dopamine Neurons in Substantia Nigra

Dopaminergic neurons are discretely localized in the mammalian brain, including arcuate nucleus, substantia nigra (SN) and ventral tegmental area and form synapses with glutamatergic axonal endings. SN is one of these areas and receives glutamatergic innervations from different parts of the central nervous system. Glutamate exerts its effects by binding to metabotropic or ionotropic glutamate receptors and these receptors are thought to play an important role in the pathological processes of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease. *In situ* hybridization as well as immunohistochemical studies revealed that NMDA and AMPA receptors are localized in SN, the area known to be effected in Parkinson's disease. However, there is very little number of studies about kainate receptors and these studies report controversial results. In our study we aimed to detect the localization of kainate receptors in SN dopamine neurons and determine expression differences, if any, between two genders. Dual immunofluorescence labeling was employed on cryostat sections of adult rats for tyrosine hydroxylase (TH) and one of the kainate receptor subunit antibodies (GluR5, GluR6, GluR7 or KA2). While almost all of the TH-positive neurons express KA2 protein, the percentages of GluR5-expressing TH-positive neurons in female and male were detected as 67.8% and 65%, respectively. Similar numbers were found for GluR6 (70.2 % for females and, 78.2% for males) and GluR7 (81.1% for females and, 82.6% for males). Statistical analyses revealed no significant differences between genders. These results showed that a large population of SN dopamine neurons express kainate receptors and suggested, in addition to NMDA and AMPA receptors, that kainate receptors may also be participated in the modulation and regulation of dopaminergic neurons. When the neuronal

toxicity caused by excitatory amino acids is taken into consideration, the presence of glutamate receptors in SN supports the idea that these cellular glutamate receptors play an important role in the basis of selective death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease.

(This study was supported by a grant from TUBITAK (106S029) to F.Z.Minbay).

Key words: substantia nigra, kainate receptors, tyrosine hydroxylase, immunohistochemistry, colocalization.

GİRİŞ

Memeli merkezi sisteminde (MSS) dopaminerjik (DAerjik) nöronların yoğun olarak bulunduğu bölgelerden biri substansiya nigra pars kompaktadır (SNC). Organizmanın motor kontrolü ile direkt ilişkili olan SNC, striatumun DAerjik innervasyonunu sağlar. Bu nigrostriatal yolağın ilerleyici dejenerasyonu Parkinson hastalığı gibi nörolojik bozukluklarla sonuçlanır. MSS'nin başlıca eksitator nörotransmitteri olan glutamatın (GLU), SNC'nin DAerjik hücrelerinin aktivitesini düzenlediği ve Parkinson hastalığındaki selektif nöron kaybından sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bu etkileri nedeniyle glutamat reseptörlerinin orta beyindeki dopamin (DA) nöronlarındaki lokalizasyonunun gösterilmesi önemlidir (1,2).

Glutamat ve Glutamat Reseptörleri

Glutamat, MSS ana eksitator nörotransmitterdir (3–8). GLU, presinaptik terminallerdeki veziküllerden voltaj bağımlı Ca^{2+} kapılarının bulunduğu mekanizma ile salınır. Serebral iskemi gibi, zardaki Na^+ ve K^+ gradientinin azaldığı durumlarda ise GLU salınımı, GLU taşıyıcılarının ters çalışması ile de gerçekleşebilir (7).

Eksitator aminoasit nörotransmisyonu, esas olarak, G–protein kapılı metabotropik ve iyon kanalı oluşturan iyonotropik GLU reseptörleri tarafından düzenlenir (3–5, 9–14). İyonotropik GLU reseptörleri, hızlı eksitator postsinaptik potansiyel oluşturarak nöronal depolarizasyon yaparken, metabotropik reseptörler, nörotransmisyonda modülatör olarak fonksiyon yapmaktadır (15). İyonotropik GLU reseptörleri, agonistlerine göre sınıflandırılır: *N*–metil–*D*–aspartat (NMDA), α –amino–3–hidroksi–5metil–4–izoazolpropionik asit (AMPA) ve 2–karboksi–3–karboksimetil–4–izopropenilpirolidin (kainat) reseptörleri (4,6,8,11,13–17).

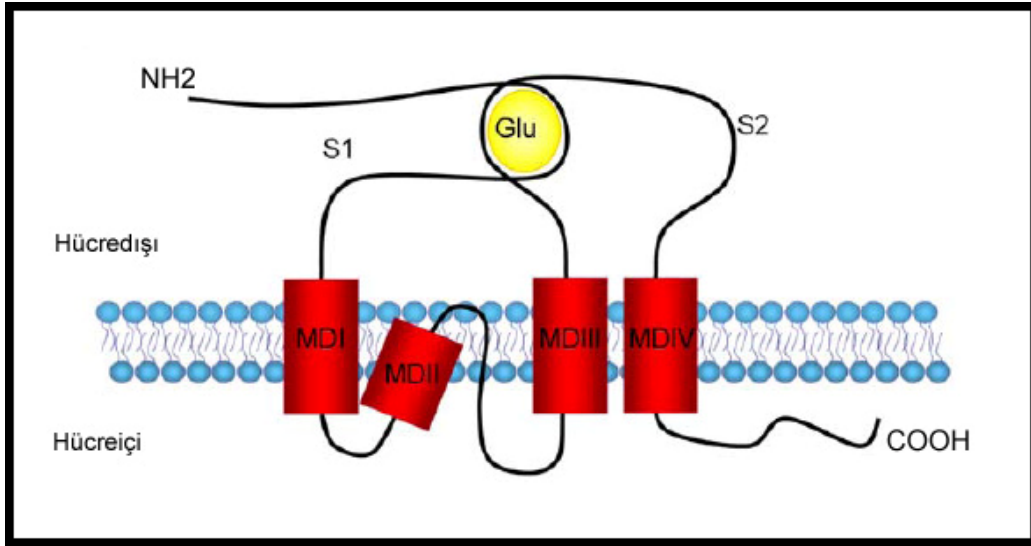
İyonotropik NMDA ve AMPA reseptörleri, eksitator nörotransmisyon, sinaptik plastisite ve nörotoksisiteyi düzenleyici Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} için iyon

kanalı olarak işlev görür (9). NMDA reseptörleri Ca^{2+} 'a yüksek geçirgenliği olan NMDAR1, 2A–D alt birimlerinden oluşur (9,15). AMPA reseptörleri, homomerik ya da heteromerik konfigürasyondaki GluR1–4 GLU reseptör alt birimlerinden oluşur. Bunların intrasellüler Ca^{2+} girişleri ya da geçirgenlikleri, GluR2'nin bulunmasıyla belirlenir (9). AMPA ve kainat reseptörleri Na^+ 'un, bazı reseptörlerinde ise Ca^{2+} 'un hücre içine alınması ve K^+ 'un dışarı verilmesi ile transmisyonu sağlar (18). NMDA reseptörleri, hafıza formasyonu, striatum ve SN'daki presinaptik DA terminallerinde, DA salınımının kontrolü, DA nöronlarının uyarılması ve nörotoksisitede önemlidir. AMPA ve kainat reseptörleri, MSS'de hızlı eksitator transmisyonundan sorumludur (6,18–20). NMDA reseptörleri ise yavaş komponentinden sorumludur, nöral gelişim ve sinaptik plastisitede önemlidir (6,14,20).

Kainat reseptör alt birimleri 1990'lı yılların başında klonlanmıştır (21,22). Kainat reseptörleri de AMPA reseptörleri gibi büyük moleküllerdir, yaklaşık 900 aminoasitten oluşur ve moleküler ağırlıkları 100 kDa'dur (23,24). Kainat reseptörlerini oluşturan beş farklı alt grup bulunmaktadır. GluR5, GluR6, GluR7, KA–1 ve KA–2 (11,17,23,25). Bu beş alt birim, yapısal benzerlik ve [3H] kainat affinitesine göre iki gruba ayrılır (4,11,23,24,26). GluR5–7, düşük affiniteli grup, %75–80 benzerlik gösterir; KA1 ve KA2, yüksek affiniteli grup, %68 benzerlik gösterir. İki grup arasındaki benzerlik oranı ise %45'dir (17,23,26). Kendi aralarındaki benzerliğin yanı sıra, AMPA (%30–35) ve NMDA (%10–20) reseptör alt birimleri ile de benzerlik gösterir (11,17,20). Ancak AMPA reseptör alt birimleri olan GluR1–4 ile kanal yapısı oluşturmazlar (27). GluR5–7, tek başına homomerik kanal yapısı oluştururken, KA1 ve KA2, yalnızca diğer alt birimlerle (GluR5–GluR7) birlikte eksprese edildiklerinde kanal oluşturabilirler (17,23,25).

Kainat reseptörleri AMPA ve NMDA reseptörleri ile aynı transmembran topoloji ve sitoşometriyi paylaşırlar (11,14,17,20). Her birinin ligand bağlama bölgesi bulunduran tetramerler olduğu düşünülmektedir. Membran içine gömülü, hidrofobik rezidülden oluşan, MDII segmenti olarak adlandırılan aminoasit uzantıları ile kanal lümeni oluşumuna katılırlar. Bunun yanı sıra her alt birim, üç transmembran segmentine sahiptir: MDI, MDIII ve MDIV. Her

proteinin NH₂-terminal ucu hücre dışında, COOH-terminal bölgesi hücre içinde yerleşiktir (4,11,13,14,17,20). İyonotropik reseptör altbirimlerinin amino terminalleri GLU tanıma bölgesi (S1) bulundurur. MDIII-MDIV halkasında ise ikincil GLU tanıma bölgesi (S2) bulunmaktadır (Şekil-1). Kainat reseptörlerinin GLU bağlama bölgelerinin, MDIII, MDIV ve NH₂-terminal arasındaki halkada dağılmış olarak bulunan rezidülerden oluştuğu düşünülmektedir (17).



Şekil-1: İyonotropik glutamat reseptörlerinin transmembran topolojisi. Dört domain (MDI-MDIV) ve iki glutamat tanıyan bölge (S1 ve S2) görülmektedir (27).

S1 ve S2 bölgeleri, iki loblu GLU bağlanma ceplerini oluşturur (13,20). Ligand bağlanma bölgesi, S1 ve S2 aksları arasındaki yarıktadır (13). Transmembran bölümlerin tanıma bölgelerine bağlanan kısa segmentleri, AMPA ve NMDA reseptör kanallarının oluşumunda (gating) major rol oynar (20). Hücre içi karboksiterminalleri ise sinyal transdüksiyonu, reseptör bağlanması fonksiyonlarına katılır ve reseptör aktivitesini düzenleyici fosforilasyon bölgeleri bulundurur (20). Presinaptik nörondan salınan GLU'ya cevap olarak, iyonotropik GLU reseptörlerinde konformasyon değişikliği meydana gelir ve transmembran iyon kanalları açılır. Desensitizasyon ya da GLU'nun deaktivasyonu ile kanallar spontan olarak kapanır (13).

Kainat reseptörleri diğer iyonotropik reseptörlerden farklı olarak, sıklıkla aynı nöronda olmak üzere, presinaptik ve postsinaptik lokalizasyonlara sahiptir (8,11,28–30). Presinaptik kainat reseptörleri, transmitter salınımını (GLU ve diğer transmitterler), postsinaptik kainat reseptörleri ise eksitator sinaptik transmisyonu düzenler (11,29,30). Farklı lokalizasyonlarda farklı subunit kompozisyonları olduğunu ve bazı durumlarda, klasik iyonotropik fonksiyonlarının yanında G protein–bağımlı sinyalizasyon fonksiyonlarının da olduğunu gösteren kanıtlar vardır (30,31). Presinaptik terminallerde, G proteinleri ve protein kinaz C aktivasyonu ile GABA salınımını baskımlarken, düşük dozlardaki kainat agonistleri GABA salınımını arttırmaktadır (32,33). Kainat reseptörleri, medulla spinalis, korteks, retina, amigdala ve striatumdaki sinaptik transmisyonla da katılmaktadır (11,29).

Dopamin, Dopaminerjik Nöronlar ve Bazal Ganglion

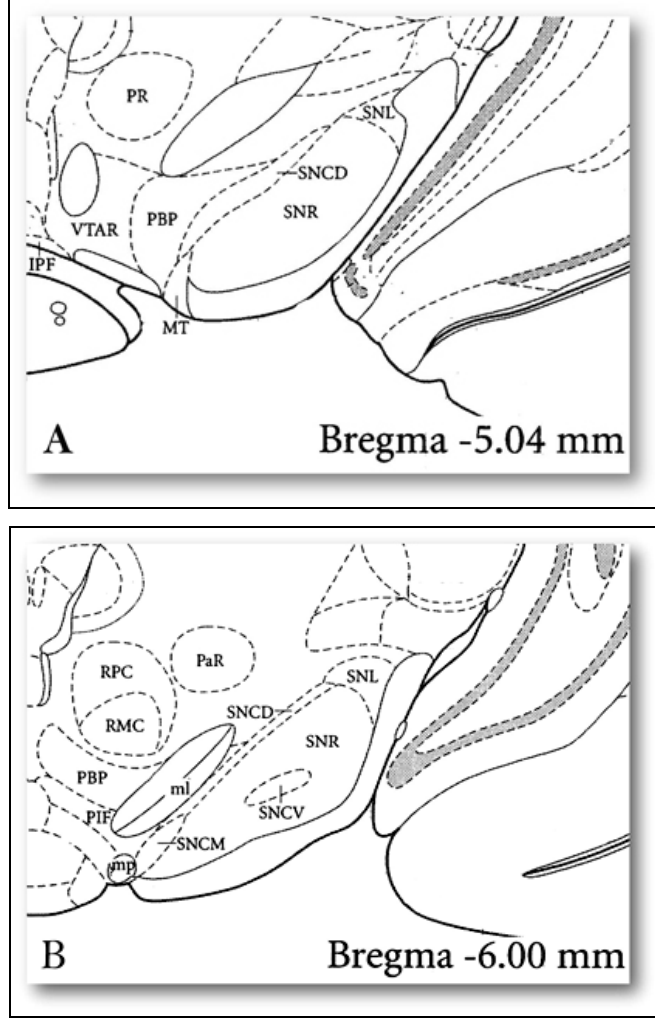
Katekolamin grubundan bir nörotransmitter olan DA (34), birçok mental ve nörolojik hastalığa katılımındaki rolü nedeniyle, en yoğun olarak çalışılan nörotransmitterlerden biridir (35). Beyindeki tüm nöronların %1'inden azını oluşturmasına karşın (35), DAerjik nöronlar, inen ve çıkan uzantıları ile motor kontrol, kardiyovasküler, respiratuvar, gastrointestinal ve davranış kontrolüne katılmaktadır (9,34,35).

MSS'deki çeşitli DAerjik nöron kümeleri, ortak yönleri DA nörotransmitter sentezi olan, birbirlerinden bağımsız hücre grupları olarak değerlendirilebilirler (35). Bu gruplar farklı anatomik pozisyon ve uzantılara sahiptir, ayrıca farklı hücresel fonksiyonlarda önemli rol oynarlar (9,35). Medulla oblongatadan hipotalamusa kadar uzanan bölgede oniki farklı (A1–A12) DAerjik nöron grubu vardır. Ayrıca, diensefalon, olfaktor bulbus ve retinada (A13–A17) beş grup daha bulunmaktadır (36). Beyindeki toplam DAerjik hücrelerinin yaklaşık %90'nını oluşturan en belirgin DAerjik hücre grubu mezensefalonun ventral bölgesinde yerleşiktir. Orta beyinde retrorubral

alan (A8), SN (A9) ve ventral tegmental alan (A10)'daki DAerjik nöronlar, memeli MSS'deki DA'in ana kaynağını oluşturur (35,36).

Fonksiyonel olarak korteks ve talamus arasında yerleşik (37) ve diğer elemanları, korpus striatum (kaudat nukleus, putamen ve globus pallidus [GP]), subtalamik nukleus (STN) olan bazal ganglionun bir parçası kabul edilen SN, nörodejeneratif hastalıklarla ilgisi nedeniyle üzerinde yoğun araştırmalar yapılan bir beyin bölgesidir. Bu bölgedeki DAerjik nöronların selektif dejenerasyonu Parkinson hastalığının nedenidir. Ekstrapiramidal motor hastalıklara ek olarak şizofreni, manik-depressif hastalık ve tardif diskinezi gibi affektif hastalıklarla da ilişkilidir (38). SN ve ventral tegmental alan (VTA) ilaç bağımlılığı gelişimi ve zevk (pleasure) duyusunda anahtar rol oynar. Yine bu bölge, gonadal hormonlar, otonomik sinir sistemi, stres ve davranış güçlendirmesi ve klinik hastalıklar ile davranış süreçlerinde de yer alır (38). SN-VTA aktivitesinin bu kadar geniş etki alanına sahip olması, bölgenin anatomik, fizyolojik ve moleküler özelliklerinin kompleksliği ile paralellik gösterir (38).

SN-VTA, orta beyinin ventral tegmentumunda yerleşiktir. Rostro-kaudal düzlemde 2.5 mm medial-lateral düzlemde 3 mm genişliğindedir. SN, 0.3 mm³ hacindedir ve her bir taraf yaklaşık 10,000-12,000 nöron içerir. SN nörokimyasal ve fonksiyonel olarak birbirleri ile ilişkili bölgelerden oluşur. Çoğunluğunu DAerjik nöronların oluşturduğu substansiya nigra pars kompakta (SNC), bir tabaka şeklinde, GABAerjik nöronlardan oluşan sunstantiya nigra pars retikülata (SNR)'nın üzerinde yer alır (38,39). SNC'nın lateral uzantısı olan substansiya nigra lateralis (SNL) diğer iki bölge ile pek çok benzerlik gösterir (38) (Şekil-2). SNC, büyük pigmente nöronlardan oluşmuş hücreden zengin bölgedir. SNR, morfolojik olarak strionigral projeksiyonlarda bulunan hücrelere benzeyen nöronlardan oluşmuş, hücre içeriği daha az olan bölgedir. SNC'da DA, SNR'te GABA nöronları yoğundur ve her iki nöron grubunda aynı uyarıları almaktadır (39-41).



Şekil-2: Substansiya nigra'nın bölümleri. **IPF:** interpedinküler fossa, **ml:** medial lemniskus, **mp:** mammillar pedinkül, **MT:** medial terminal nukleus (aksesuar optik yolağın), **PaR:** pararubral nukleus, **PBP:** parabrakial pigmentli nukleus (VTA'nın), **PIF:** parainterfasiküler nukleus (VTA'nın), **PR:** prerubral alan, **RMC:** red nukleus, magnosellüler bölüm, **RPC:** red nukleus, parvisellüler bölüm, **SNCD:** substansiya nigra pars kompakta, dorsal bölüm, **SNCM:** substansiya nigra, pars kompakta, medial bölüm, **SNCV:** substansiya nigra pars kompakta, ventral bölüm, **SNL:** substansiya nigra, lateral bölüm, **SNR:** substansiya nigra pars retikülata, **VTAR:** ventral tegmental alan, rostral bölüm (42).

SNC'da sıkıca bir araya gelmiş yaklaşık soma çapı 11 x 20 µm olan orta büyüklükte DAerjik nöronlar bulunur. Ekzantrik yerleşmiş çekirdeklerinde bazofilik invajinasyonlar vardır. SNC'nın özellikle ventral bölümünde yerleşik olan bu nöronlar, dendritik uzantıları nedeniyle baş aşağı duruyormuş gibi gözlenir. Yine bu nöronlardan çıkan birkaç apikal uzun dendrit SNR'e uzanır. İkinci tip nöronlar ise SNC'nın dorsal tarafında yerleşik orta büyüklükte

fuziform şekilli nöronlardır. SNC'da bulunan üçüncü tip nöronlar ise 10–12 µm çaplı küçük yıldız biçimli hücrelerdir. SNC'daki nöronların %10'unu oluşturan bu hücrelerin berrak bir sitoplazması ve büyük bir çekirdekleri vardır. Bu hücreler DAerjik olmayan ara nöronlardır (38).

Substansiya Nigradaki DAerjik Nöronlar ve Glutamat Reseptörleri

SN'ya, striatum, SNR ve globus pallidusdan gelen uyarıların tümü GABAerjik inhibitördür. Pedinkülopontin nukleus, prefrontal korteks ve STN'tan gelen eksitatör uyarılar glutamaterjik (GLUerjik)'tir (33,37,41,43).

Memeli beyinde DA nöronları, esas olarak, iyonotropik reseptörler aracılığı ile etki eden eksitatör aminoasitler tarafından düzenlenir. Her üç tip GLU reseptörünün orta beyindeki DAerjik nöronlarda bulunduğunu gösteren kanıtlar vardır (6,44–46). Anatomik çalışmalarla, orta beyindeki DA nöronlarına uzanan GLUerjik afferentlerin olduğu ve bunların frontal korteks, STN ve pedinkülopontin nukleustan orijin aldığı gösterilmiştir (12,39,45). Morfolojik çalışmalar ve mikro kültürlerde beyinde, GLU içeren akson terminallerinin, DA bulunduran bölgelerde yoğun olarak dağılım gösterdiği ve DA nöronları ile sinaps yaptığı gösterilmiştir (1,2,9). GLU ya da GLU reseptörlerinin diğer agonistlerinin, DA nöronlarının aktivitesini etkilediğini ve DA salınımını düzenlediğini gösteren fizyolojik ve farmakolojik kanıtlar da bulunmaktadır (9). Elektrofizyolojik ve farmakolojik çalışmalarda, AMPA ve NMDA reseptörlerinin DAerjik nöron soma ve dendritlerinde yerleşimleri gösterilmiştir (40).

AMPA ve NMDA reseptörlerinin, orta beyindeki DAerjik nöronlarda ekspresyonunu gösteren immunohistokimya ve *in situ* hibridizasyon çalışmaları bulunmaktadır (9,39,40,47–49). Bu çalışmalarda orta beyindeki DAerjik nöronların AMPA (GluR1, GluR2/3, GluR4) ve NMDAR1 reseptör alt birimleri için de immunoreaktif olduğu, SNC'da metabotropik reseptörlerden sadece mGluR1'in DAerjik nöronlarda eksprese edildiği gösterilmiştir (6,41). Bu çalışmalarda, NMDA reseptörlerinin beyinde yaygın bir dağılım gösterdiği, AMPA reseptörlerinin ise daha sınırlı bir dağılımı olduğu gösterilmiştir. İkili

immunohistokimyasal çalışmalarla, AMPA reseptör alt birimlerinden GluR1 ve GluR2/3'ün DA nöronlarında ekspresyonu gösterilmiştir. GluR4 ekspresyonu ise nadirdir (6,9). Mikro kültürlerde, DA nöronlarının hedef nöronlarla GLUerjik sinaptik bağlantılar yaptığı gösterilmiştir (1). İkili immun işaretleme çalışmalarında, sıçanlarda SN ve VTA nöronlarının %91'inin, maymunlarda %86'sının TH ve GLU için immunoreaktif olduğu gözlenmiştir. Kültür hücrelerinde VTA'da nöronların %84'ünde GluR4 immunoreaktivitesi belirlenmiştir (2). Ayrıca araştırmacılar tarafından bu GLU reseptörlerinin nörodejeneratif hastalıkların patolojisinde rolü olabileceği ileri sürülmektedir (9).

SNC'daki selektif DAerjik nöron hasarı ile cinsiyet arasındaki bağlantının olası nedenleri araştırılmakta olan bir konudur (50–55). Şöyleki; Parkinson hastalığının prevalansı erkeklerde daha yüksektir ve hastalığın insidansı ile ilgili veriler, tüm yaş gruplarında erkek popülasyonunun en az iki kat daha fazla Parkinson hastalığı riski taşıdığını göstermektedir (55,56). Cinsiyet ayrıca hastalığın klinik özelliklerini ve ilişkili risk faktörlerini de etkiler (57–59). Parkinson hastalığının cinsiyete özgü karakteristiklerin, bazal ganglionda DA metabolizmasındaki cinsiyete özgü farklılıklarla da ilişkili olduğu bulunmuştur. Hem sağlıklı kadınlarda DA işaretleycilerinin yoğunluğunun daha fazla olduğu hem de hasta kadınlarda DA uptake alanlarının daha fazla korunduğu bulunmuştur (60).

Bu veriler, DA ve GLU arasında anatomik ve fonksiyonel olarak bağlantı olduğunu göstermektedir. GLUerjik nörotransmisyonundaki değişimler, iskemi ve hipoglisemi ataklarından sonra görülen nöronal hasarla ilişkili olduğu gibi, epilepsi (28), Alzheimer hastalığı, Huntington koresi, amiyotrofik lateral skleroz gibi bir seri nörolojik hastalığın etiyolojisinde de rol almaktadır (7,15,17,26). İnsanlarda substansiyal DA nöronlarındaki atrofi ya da kaybın, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarla sonuçlandığı gösterilmiştir (2,9,48,61). DA ve GLU arasındaki etkileşimin tam olarak gösterilmesi, bu hastalıkların tedavilerinde yeni yöntemlerin bulunmasında yol gösterici olabilir. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, AMPA ve NMDA reseptör alt birimlerinin, DA nöronları ile kolokalizasyonu, *in situ* hibridizasyon,

elektrofizyolojik çalışmalar ve immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Kainat reseptör alt birimlerinin (KA1, KA2, GluR5, GluR6, GluR7) DA nöronları ile kolokalizasyonu, çelişkili sonuçlar bildiren *in situ* hibridizasyon yöntemi ile gösterilmiş olup (10,12,62,63), bu konuda yapılmış immunohistokimyasal çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, SN'nın DA nöronlarında, kainat reseptör alt birimlerinin ekspresyonunun ve DAerjik nöron hasarında risk faktörü olduğu düşünülen cinsiyetin, reseptör ekspresyonundaki etkinliğinin immunohistokimyasal olarak gösterilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Dokuların hazırlanması

Çalışmada Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Uygulama Merkezi'nden sağlanan, 5 adet dişi ve 5 adet erkek, 60–90 günlük Sprague–Dawley türü sıçanlar kullanıldı. Derin eter anestezisi altında deneklerin göğüs kafesleri açılarak, kalp apeksinden aorta içine kateter yerleştirilerek sabitlendi. Dolaşım sistemi 125 ml, %0.9 NaCl ile temizlendi. 0.13 M Sorenson'un fosfat tamponu içinde hazırlanan %4'lük paraformaldehit ile perfüzyon fiksasyonu yapıldı (350 ml/denek). Çıkarılan beyinler aynı fiksatifte hazırlanan %10 sükröz solüsyonunda tüm gece bekletildi. Beyinler 0.13 M fosfat tamponda (pH 7.4) hazırlanan %20 ve %30 sükröz solüsyonunda ikişer gün bekletildi. Beyinler dondurulduktan sonra, kriyostat ile 4 seri halinde 20 µm'lik kesitler alınarak tampon solüsyon içinde toplandı. Kesitler, Tris–HCl tampon solüsyonu ile yıkanarak fiksatiften arındırıldıktan sonra, kriyoprotektan içerisinde –20°C' de saklandı.

İmmunohistokimya

Yüzen kesit immunohistokimyasında, inkübasyon ve yıkama işlemleri, sallayıcı yardımı ve uygun ajitasyonla viyaller içinde gerçekleştirildi. Yıkama işlemlerinde Tris–HCl tamponu (pH 7.6) ve anti–serumların seyreltilmesinde Tris–HCl tamponda hazırlanan bloklayıcı serum (%10 normal at serumu, %0.1 sodyum azid ve %0.2 triton–X 100) kullanıldı. Kesitler –20°C'den çıkarılıp oda sıcaklığına gelmeleri beklendi. Kriyoprotektandan arındırmak için tampon solüsyonu ile yıkanıp, spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla bloklayıcı serum uygulandı.

SNC'da GluR5, GluR6, GluR7 ve KA2 Reseptör Alt Birim Proteinlerinin Belirlenmesi için İmmunoperoksidaz Boyaması: İlk olarak SNC'da KA reseptör alt birimlerinin dağılımını belirlemek amacıyla aşağıda belirtilen

yöntemle immunoperoksidaz boyaması yapıldı. Reseptör proteinlerini işaretlemek için keçide geliştirilmiş anti-GluR5, anti-GluR6 ve anti-GluR7 antikorumları ile tavşanda geliştirilmiş anti-KA2 antikoru kullanıldı.

1. Kriyoprotektandan çıkarılan kesitler Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dk yıkandı.
2. Bloklayıcı serum ile 2 saat inkübe edildi.
3. Primer antikor uygulaması: Keçi anti-GluR5 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); keçi anti-GluR6 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); keçi anti-GluR7 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); tavşan anti-KA2 (1:3000; R52-4, Jennes and Eyigor) antikorumları ile 72 saat inkübe edildi.
4. Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkandı.
5. Sekonder antikor uygulaması: Biotinli eşek anti-keçi IgG (1:200; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA) ya da biotinli eşek anti-tavşan (1:300; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA) ile 2 saat inkübe edildi.
6. Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkandı.
7. Avidin biyotin kompleksi (ABC Elite Kit, Vector Labs, Burlingame, CA) solüsyonu ile 1 saat inkübe edildi (Solüsyon üretici firmanın önerisine göre hazırlandı).
8. Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkandı.
9. Substrat kromojen solüsyonu (DAB) ile inkübe edildi.
10. Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkandı.
11. Kesitler lamlara alınıp kurutuldu, DPX ile kapatıldı.

Dopaminerjik Nöronlarda Kainat Reseptör Alt Birim Proteinlerinin Belirlenmesi – İkili İmmunofluoresan Yöntemi: Bu amaçla 20 µm kalınlığındaki yüzen kesitlere aşağıda ayrıntıları verilen ikili fluoresan işaretleme yöntemi uygulandı. SNC'da yerleşik DAerjik nöronları işaretlemek amacıyla, DA sentezinin birinci basamağında rol alan tirozin hidroksilaz (TH) enzimine karşı tavşan ve farede geliştirilmiş anti-TH antikoru kullanıldı.

TH ve GluR5 için ikili immunofluoresan yöntemi

1. Kriyoprotektandan çıkarılarak Tris–HCl tamponu ile 3 x 10 dk yıkanan kesitler, bloklayıcı serum ile 2 saat inkübe edildi.
2. Bloklayıcı serum ile 2 saat inkübe edildi.
3. Primer antikor uygulaması: Tavşan anti–TH (1:2000; Chemicon International Inc.) ve keçi anti–GluR5 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) karışımı ile +4°C’de 72 saat inkübe edildi.
4. Tris–HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkandı.
5. Sekonder antikor uygulaması: Biotinli eşek anti–keçi IgG (1:200; Jackson Immuno Research Laboratories Inc. West Grove, PA) ile 2 saat inkübe edildi.
6. Tris–HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkandı.
7. FITC işaretli eşek anti–tavşan IgG (1:300; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA) ve Texas Red–streptoavidin (1:100; Vector Laboratories) ile 2 saat inkübe edildi.
8. Tris–HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkanan kesitler lamlara alınarak kurutuldu ve Prolong[®] Antifade Kit (Molecular Probes, Oregon, USA) ile kapatıldı.

TH ve GluR6 için ikili immunofluoresan yöntemi

1. Kriyoprotektandan çıkarılarak Tris–HCl tamponu ile 3 x 10 dk yıkanan kesitler, bloklayıcı serum ile 2 saat inkübe edildi.
2. Primer antikor uygulaması: Tavşan anti–TH (1:2000; Chemicon International Inc.) ve keçi anti–GluR6 (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) karışımı ile +22°C’de 72 saat inkübe edildi.
3. Tris–HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkandı.
4. Sekonder antikor uygulaması: Biotinli eşek anti–keçi IgG (1:200; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA) ile 2 saat inkübe edildi.
5. Tris–HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkandı.

6. FITC işaretli eşek anti-tavşan IgG (1:300; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA) ve Texas Red-streptoavidin (1:100; Vector Laboratories) ile 2 saat inkübe edildi.
7. Tris tamponu ile 3 x 10 dakika yıkandı.
8. Kesitler lamlara alınarak kurutuldu, Prolong[®] Antifade Kit (Molecular Probes, Oregon, USA) ile kapatıldı.

TH ve GluR7 için ikili immunofluoresan yöntemi

1. Kriyoprotektandan çıkarılarak Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dk yıkanan kesitler, bloklayıcı serum ile 2 saat inkübe edildi.
2. Primer antikor uygulaması: Tavşan anti-TH (1:2000; Chemicon International Inc.) ve keçi anti-GluR7 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) karışımı ile +4°C'de 72 saat inkübasyon yapıldı.
3. Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkandı.
4. Sekonder antikor uygulaması: Biotinli eşek anti-keçi IgG (1:200; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA) ile 2 saat inkübe edildi.
5. Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkandı.
6. FITC işaretli eşek anti-tavşan IgG (1:300; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA) ve Texas Red-streptoavidin (1:100; Vector Laboratories) ile 2 saat inkübe edildi.
7. Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkandı.
8. Kesitler lamlara alınarak kurutuldu, Prolong[®] Antifade Kit (Molecular Probes, Oregon, USA) ile kapatıldı.

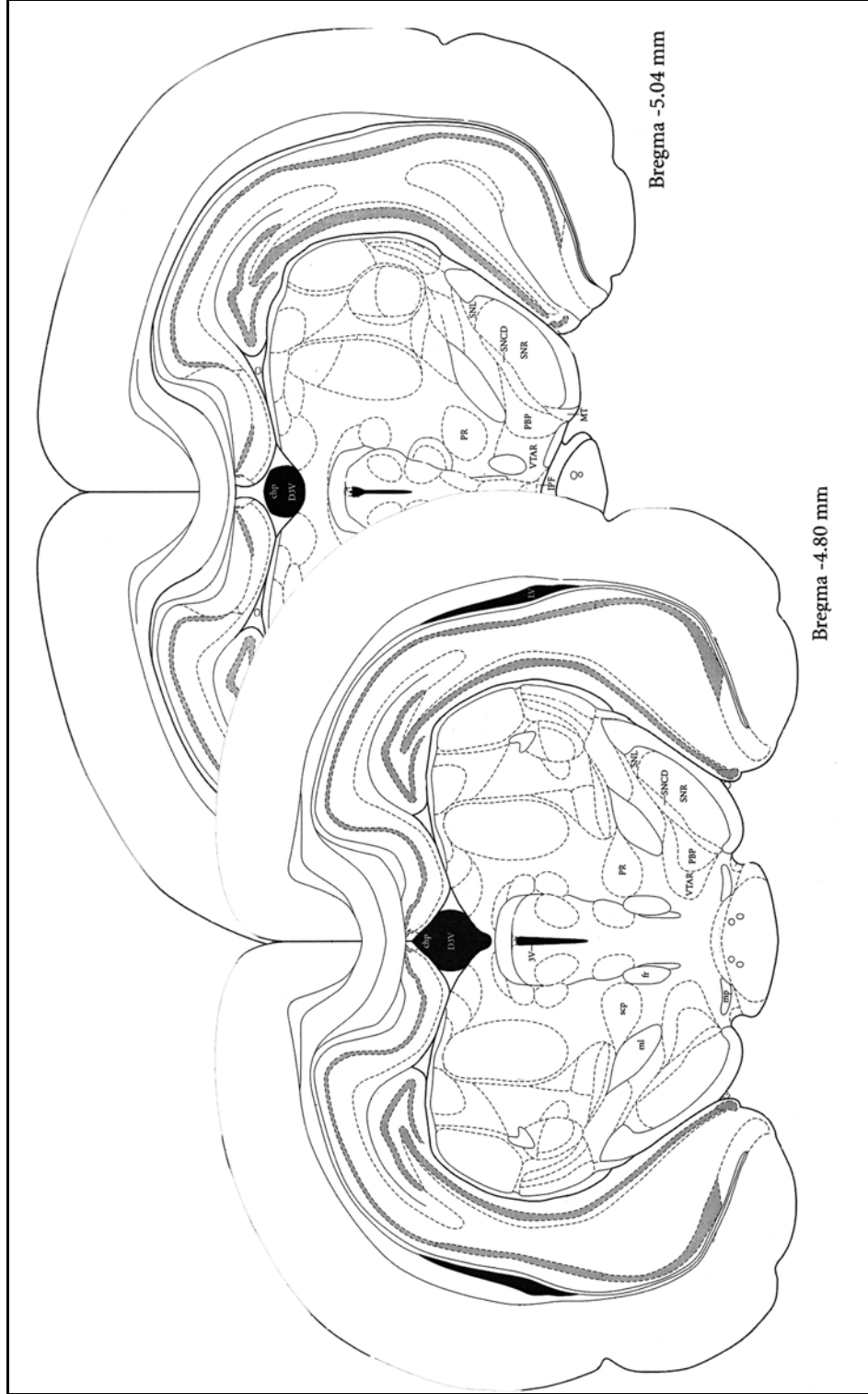
TH ve KA2 için ikili immunofluoresan yöntemi

1. Kriyoprotektandan çıkarılan kesitler Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dk yıkandı.
2. Bloklayıcı serum ile 2 saat inkübe edildi.

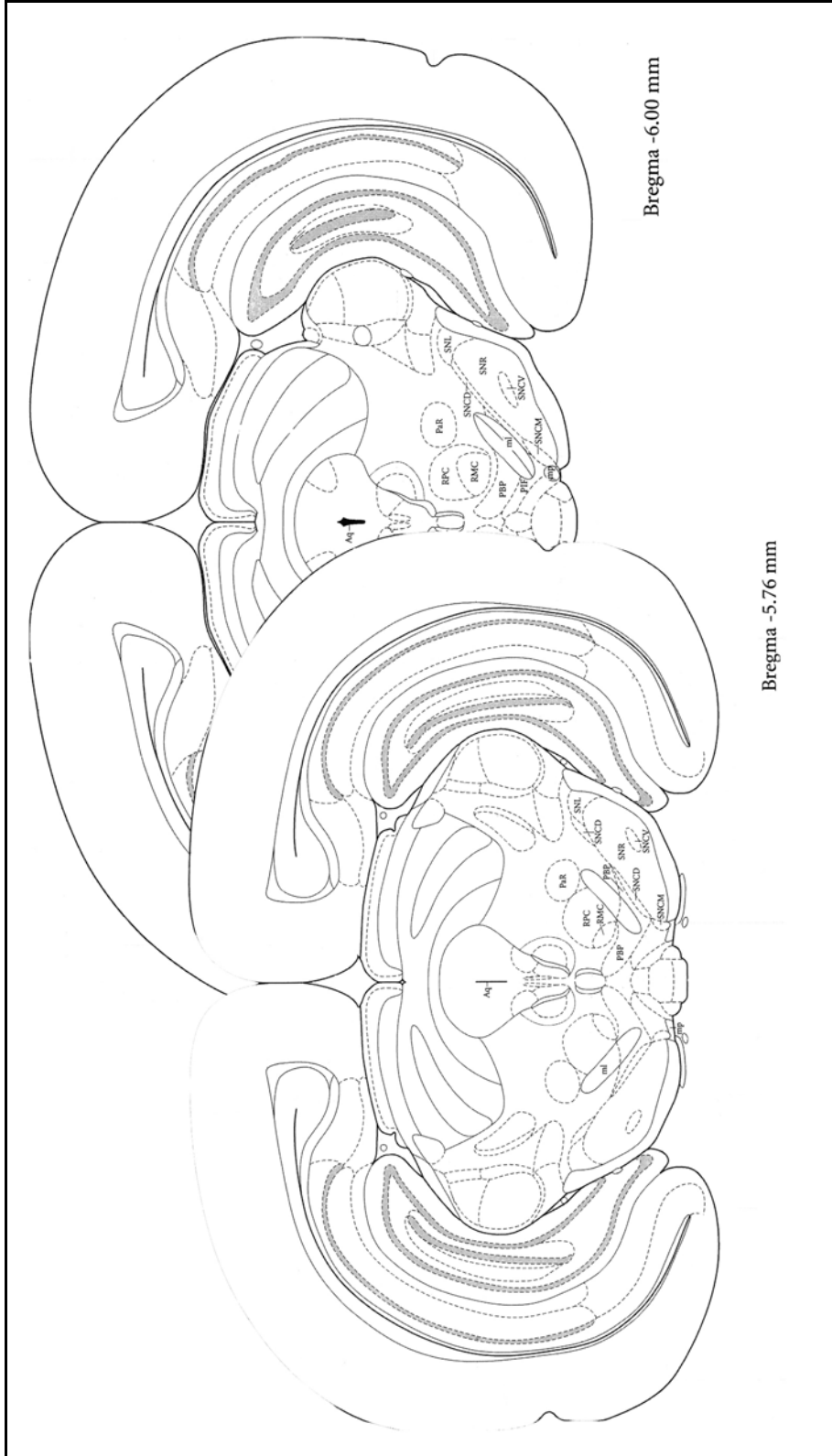
3. Primer antikor uygulaması: Fare anti-TH (1:1000; Chemicon International Inc.) ve tavşan anti-KA2 (1:2000; R52-4, Jennes ve Eyigör) karışımı ile +4°C de 72 saat inkübe dildi.
4. Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkandı.
5. FITC işaretli eşek anti-fare IgG (1:100; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA) ve Cy3 işaretli eşek anti-tavşan (1:200; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA) ile 2 saat inkübe edildi.
6. Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkandı.
7. Kesitler lamlara alınarak kurutuldu, Prolong® Antifade Kit (Molecular Probes, Oregon, USA) ile kapatıldı.

İstatistiksel Analiz

Histolojik olarak değerlendirilecek kesitlerin aralığı Paxinos'un beyin atlasına (42) göre belirlendi. Buna göre en rostralde bregma -4.8 mm, en kaudalde ise bregma -6.36 mm'ye uyan SN kesitleri kullanıldı (Şekil-3). Bu aralıkta rostrokauzal düzlemde SN'nın 4 farklı seviyesinden alınan kesitlerde sayım işlemleri yapıldı. Kesitlerin her denek için aynı koordinatta olmasına dikkat edildi. Sayımlar 40X objektif kullanılarak dijital kamera ile bilgisayar ekranına alınan görüntüler üzerinde anında tarama yapılarak iki kişi tarafından gerçekleştirildi. Belirlenen kesitlerde, sadece TH immunoreaktif dopaminerjik nöronlar ve hem TH hem de glutamat reseptörü eksprese eden dopaminerjik nöronlar çift taraflı sayıldı. Elde edilen değerlerden, denek başına sayılan TH eksprese eden dopaminerjik nöronlardan ne kadarının glutamat reseptörü için de immunoreaktif olduğu (sayısal ve yüzde olarak) belirlendi. Çalışmanın analizleri SPSS 13.0 programında yapıldı. Her glutamat reseptörü için deneklere ait sayısal ve yüzde verileri üzerinden ortalama ve SEM (standard error mean) hesaplandı. Cinsiyetler arası karşılaştırmada Mann Whitney-U testi kullanıldı. $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.



Şekil-3: Paxinos'un sıçan beyin atlasına (42) göre belirlenerek histolojik olarak değerlendirilen kesitlerin aralığı. Buna göre en rostralde bregma -4.8 mm, en kaudalde ise bregma -6.36 mm'ye uyan SN kesitleri kullanıldı.



Şekil-3: (devam)

fossa, **ml**: medial lemniskus, **mp**: mammillar pedinkül, **MT**: medial terminal nukleus (aksesuvar optik yolağın), **PaR**: pararubral nukleus, **PBP**: parabrakial pigmentli nukleus (VTA'nın), **PIF**: parainterfasikular nukleus (VTA'nın), **PN**: paranigral nukleus (VTA'nın), **PR**: prerubral alan, **RMC**: red nukleus, magnosellüler bölüm, **RPC**: red nukleus, parvisellüler bölüm, **scp**: superior serebellar pedinkül, **SNCD**: substansiya nigra, pars kompakta dorsal bölüm, **SNCM**: substansiya nigra pars kompakta medial bölüm, **SNCV**: substansiya nigra, pars kompakta ventral bölüm, **SNL**: substansiya nigra, lateral bölüm, **SNR**: substansiya nigra pars retikülata, **tth**: trigeminotalamik yolak, **VTAR**: ventral tegmental alan rostral bölüm, **vtgd**: ventral tegmental çaprazlaşma.

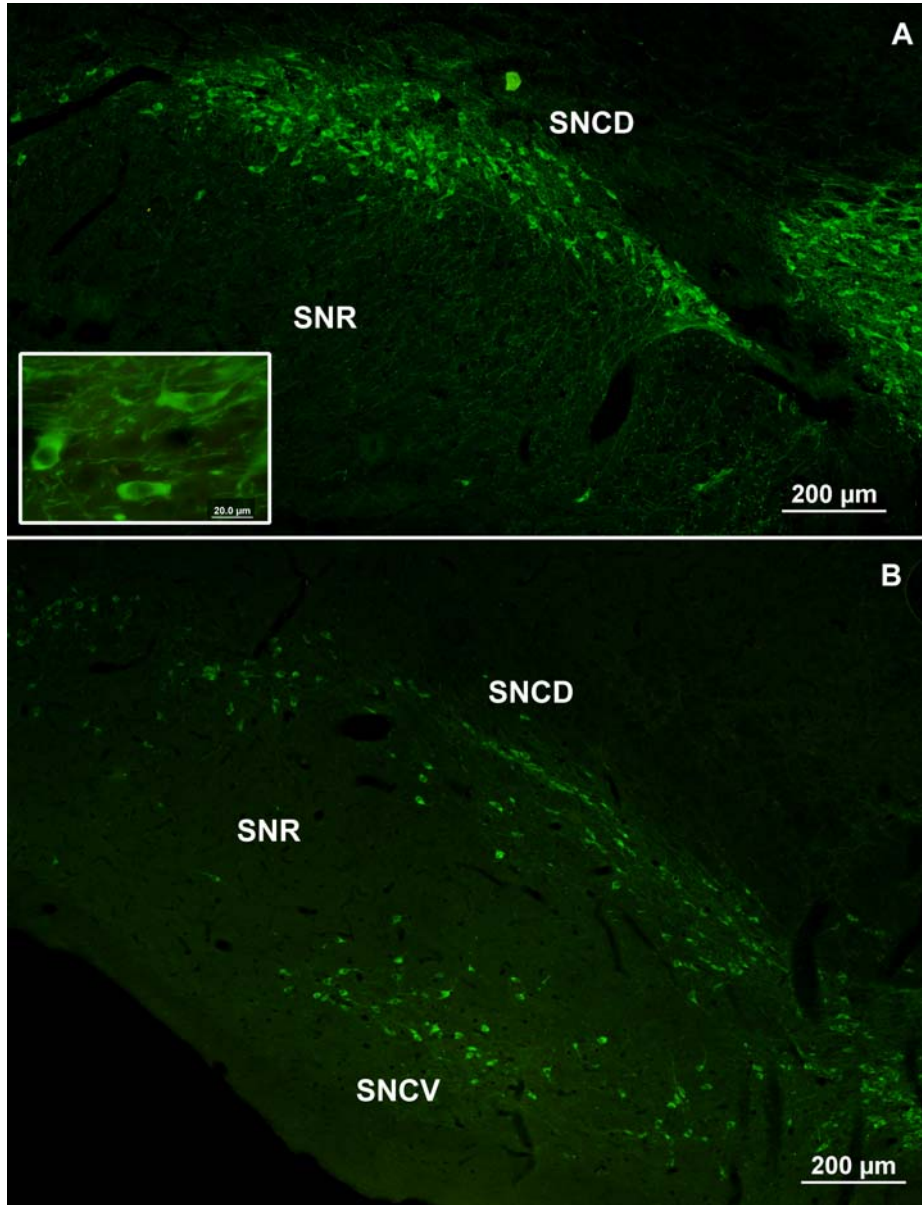
BULGULAR

Uygulanan immunoperoksidaz yöntemi sonunda DAB reaksiyonu kahverengi ve tonlarında izlendi. Dopaminerjik nöronları işaretlemek amacıyla tavşan ve fare anti-TH antikor kullanıldı. İmmunofluoresan yöntemle, FITC işaretli sekonder antikor uygulaması ile görünür hale getirilen antijen-antikor reaksiyonu sonucunda, dopaminerjik nöronlar yeşil, Teksas kırmızısı ya da Cy3 ile görünür hale getirilen reseptör proteinleri ise kırmızı olarak izlendi. TH immunoreaktif olup aynı zamanda kainat reseptör alt birim proteinlerinden birini eksprese eden nöronlar ise ekspresyonun derecesine göre sarı ve tonlanlarında gözlemlendi.

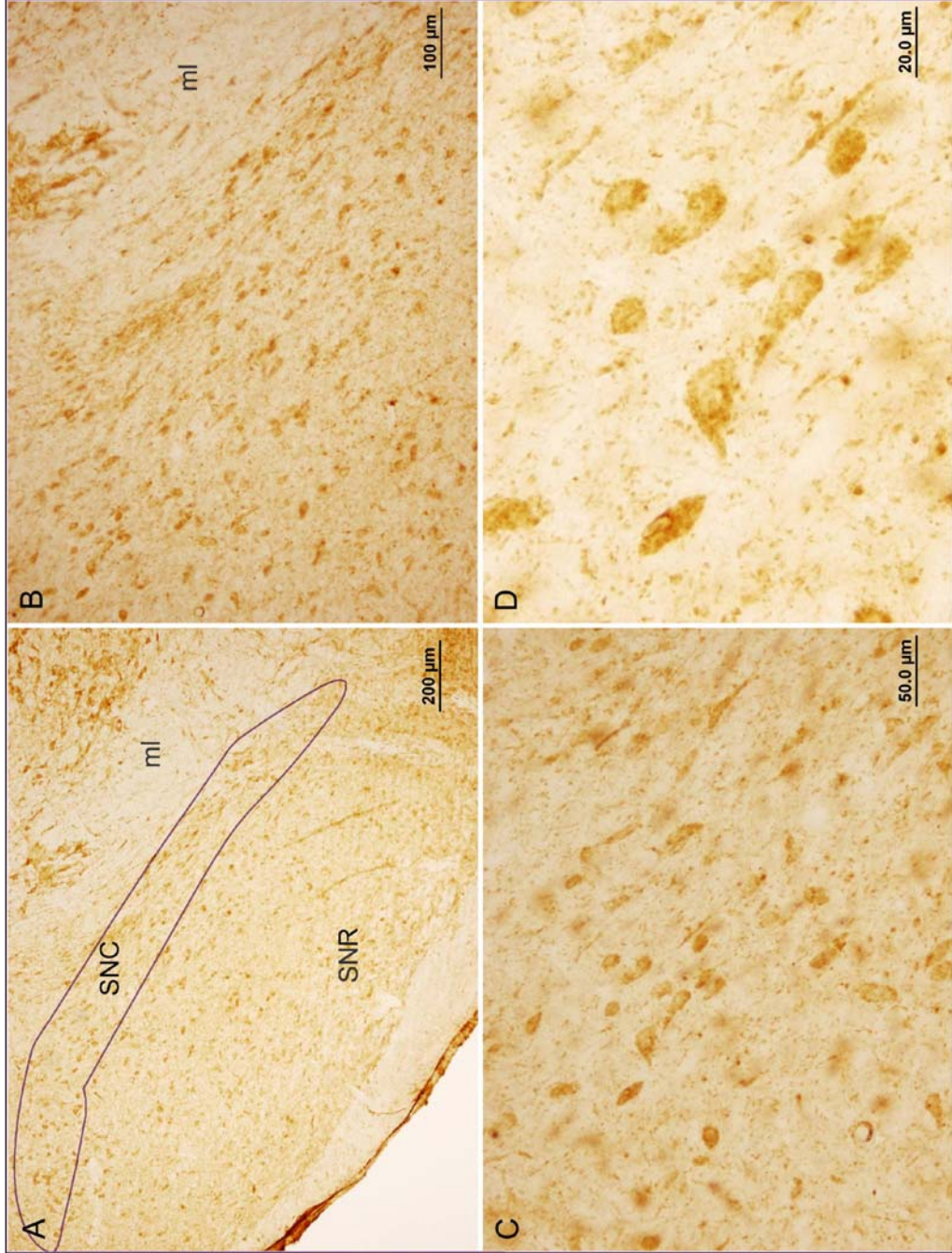
TH Ekspresyonu: SNC'nın dopaminerjik nöronlarının soma ve dendritlerinde yoğun TH immunoreaktivitesi izlendi. SNC'nın dorsal bölümünde orta büyüklükte fuziform şekilli nöronlar belirlendi (Şekil-4A). SNC'nın ventral bölümünde ise SNR'e yönelmiş dendritik uzantıları ile orta büyüklükte dopaminerjik nöronlar izlendi (Şekil-4B).

GluR5 Ekspresyonu: İmmunoperoksidaz boyamasında, SNC'ya uyan bölgede orta yoğunlukta hücrenin GluR5 reseptör proteini için immunopozitif olduğu görüldü. SNC'nın ventral ve dorsal bölümlerinde GluR5 immunoreaktif hücrelerin dağılımı incelendiğinde bölgesel farklılık tespit edilmedi (Şekil-5A, B). GluR5 reseptör alt birim proteini için elde edilen DAB reaksiyonu hücre gövdelerinde belirgindi. Proksimal dendritlerde GluR5 ekspresyonuna rastlanmadı (Şekil-5C, D ve 6).

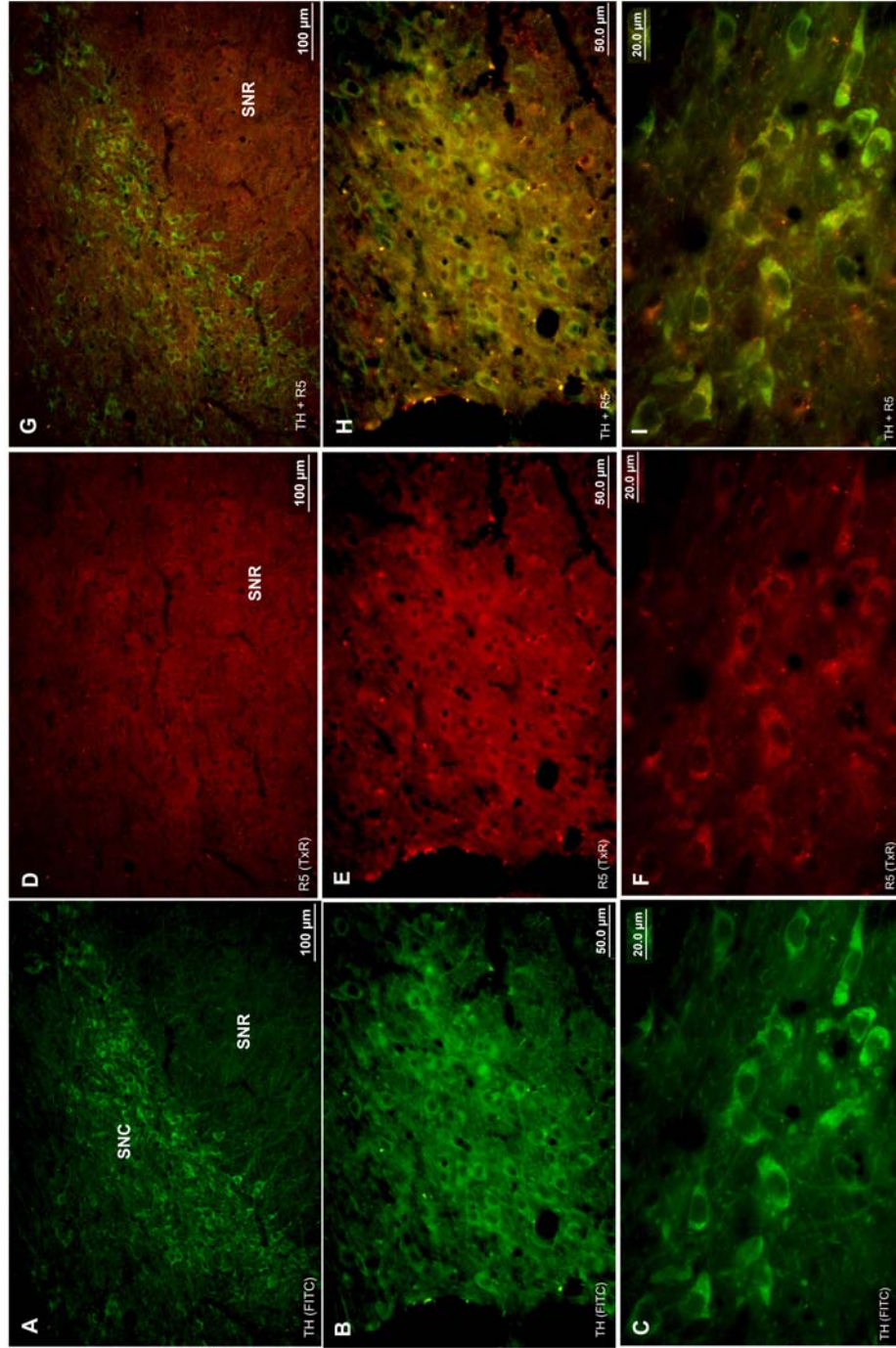
TH eksprese eden dopaminerjik nöron sayısı dişilerde 4840, erkeklerde 4605; GluR5 immunoreaktif olan dopaminerjik nöron sayısı ise dişilerde 3525, erkeklerde 3613 olarak belirlendi (Tablo-1). GluR5 reseptör proteinini eksprese eden TH immunopozitif nöronların oranı dişilerde %67.9, erkeklerde %65.1 olarak bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonucu cinsiyetler arasında fark olmadığı belirlendi (Tablo-2).



Şekil-4: SNC'nin dopaminerjik nöronlarının soma ve dendritlerinde yoğun TH immunoreaktivitesi izlendi. SNC'nin dorsal bölümünde (SNCD) orta büyüklükte fuziform şekilli nöronlar belirlendi (A). SNC'nin ventral bölümünde (SNCV) ise SNR'e yönelmiş dendritik uzantıları ile orta büyüklükte dopaminerjik nöronlar izlendi (B). İç resim: Fuziform şekilli TH immunopozitif dopaminerjik nöronların büyük büyütmedeki görünüşü. **SNCD:** Sunbstansiya nigra, pars kompakta dorsal bölüm, **SNCV:** Sunbstansiya nigra, pars kompakta ventral bölüm **SNR:** Sunbstansiya nigra, pars retikülata



Şekil-5: GluR5 reseptörlerinin SN'daki dağılımı, immunoperoksidaz boyaması. A: SNC'nın dorsal bölümünde GluR5 reseptör proteini eksprese eden nöronların görünüşü. B ve C'de sırası ile X10 ve X20 objektif ile elde edilen GluR5 immunopozitif nöronların görünüşü. D: GluR5 immunoreaktivitesi hücre gövdelerinde belirgindi. Proksimal dendritlerde GluR5 ekspresyonuna rastlanmadı. **ml**: medial lemniskus, **SNC**: substansiya nigra pars kompakta, **SNR**: substansiya nigra pars retikülata.



Şekil-6: Kainat reseptör alt birimi GluR5 proteini eksprese eden dopaminerjik nöronları ikili fluoreşan işaretleme ile elde edilen fotomikrografları. A, B ve C: SNC'nın dorsal bölümünde yerleşik TH immunoreaktif DAerjik nöronların artan büyütmeledeki görüntüleri. D, E, F de, aynı nöronlardaki GluR5 immunoreaktivitesi izlenmektedir. G, H ve I'da iki proteini de eksprese eden nöronlar izlenmektedir. Dopamin ekspresyonu yeşil, GluR5 protein ekspresyonu ise kırmızı gözlenmektedir. Her iki proteini de eksprese eden nöronlar ise sarı olarak izlenmektedir. **SNC:** Substansiya nigra, pars kompakta, **SNR:** Substansiya nigra, pars retikülata.

Tablo-1: SNC'nin TH immunoreaktif DAerjik nöronlarında GluR5 reseptör alt birim proteini ekspresyonu.

Denek #	TH		TH/GluR5		%GluR5	
	Dişi	Erkek	Dişi	Erkek	Dişi	Erkek
1	1124	1032	743	659	66.01	66.16
2	1039	1007	723	658	69.58	62.48
3	1014	1133	736	807	72.58	63.44
4	801	1172	801	693	71.16	63.69
5	862	972	522	796	60.05	69.58
Toplam	4840	4605	3525	3613	–	–
*Ort.	968 ± 59.42	1110.6 ± 46.97	705 ± 47.66	722.6 ± 32.86	67.89 ± 2.23	65.07 ± 1.28

TH: Dört kesitte bilateral sayılan TH immunoreaktif DAerjik nöron sayısı (n=5)

TH/GluR5: Glutamat reseptörü eksprese eden TH immunoreaktif DAerjik nöron sayısı

%GluR5: İkili işaretlenen (TH/GluR) nöron yüzdesi

***Ort.:** Ortalama ± SEM

Tablo-2: Dişi ve erkek deneklerin TH immunoreaktif DAerjik nöronlarındaki GluR alt birim ekspresyonlarının karşılaştırılması.

	TH		TH/GluR		%GluR	
	Dişi	Erkek	Dişi	Erkek	Dişi	Erkek
GluR7	944 ± 49.62	1046.80 ± 40.20	770 ± 61.92	866.80±41.26	81.10 ± 2.25	82.69 ± 0.92
p	0,22		0,42		0,69	
GluR6	1063.2 ± 38.18	1075.6 ± 38.87	832.40 ± 32.78	755.00±26.56	78.27 ± 1.03	70.24 ± 1.09
p	1,00		0,22		0,008*	
GluR5	968 ± 59.42	1110.6 ± 46.97	705 ± 47.66	722.6 ± 32.86	67.89 ± 2.23	65.07 ± 1.28
p	0,15		1,00		0,31	

TH: Dört kesitte bilateral sayılan TH immunoreaktif DAerjik nöron sayısı (n=5).

TH/GluR: Glutamat reseptörü eksprese eden TH işaretli DAerjik nöron sayısı.

%GluR: İkili işaretlenen (TH/GluR) nöron yüzdesi.

*p<0.05.

GluR6 Ekspresyonu: TH–pozitif dopaminerjik nöron sayısı dişilerde 5378, erkeklerde 5316; TH/GluR6–pozitif nöron sayısı dişilerde 3775, erkeklerde 4162 olarak belirlendi GluR6 reseptör proteinini eksprese eden TH nöronlarının oranı dişilerde %78.3, erkeklerde %70.3 olarak bulundu. (Tablo–3). Dişi ve erkek deneklerde istatistiksel karşılaştırmada sayısal olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo–2).

Tablo–3: SNC'nın TH immunoreaktif DAerjik nöronlarında GluR6 reseptör alt birim proteini ekspresyonu.

Denek #	TH		TH/GluR6		%GluR6	
	Dişi	Erkek	Dişi	Erkek	Dişi	Erkek
1	1128	1032	762	826	67.55	80.03
2	1110	1007	751	754	67.65	74.87
3	1146	1133	828	911	72.25	80.40
4	1064	1172	771	903	72.46	77.04
5	930	972	663	768	71.29	79.01
Toplam	5278	5316	3775	4162	–	–
*Ort.	1063.2 ± 3 8.18	1075.6 ± 38.87	832.40 ± 32.78	755.00±26.56	78.27 ± 1.03	70.24 ± 1.09

TH: Dört kesitte bilateral sayılan TH immunoreaktif dopaminerjik nöronların sayısı (n=5).

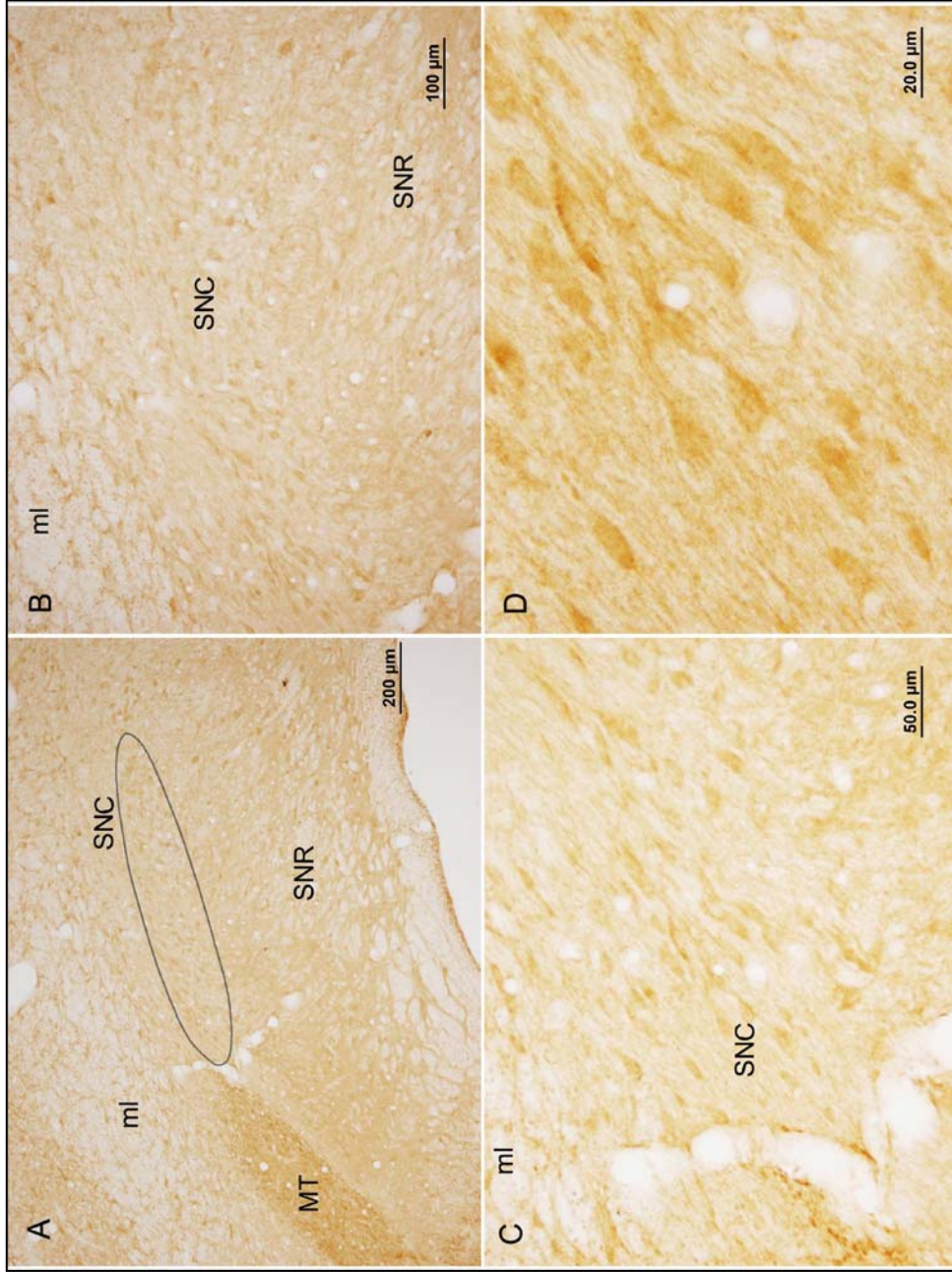
TH/GluR6: Glutamat reseptörü eksprese eden dopaminerjik nöron sayısı.

%GluR6: İkili işaretlenen (TH/GluR) nöronlarının yüzdesi.

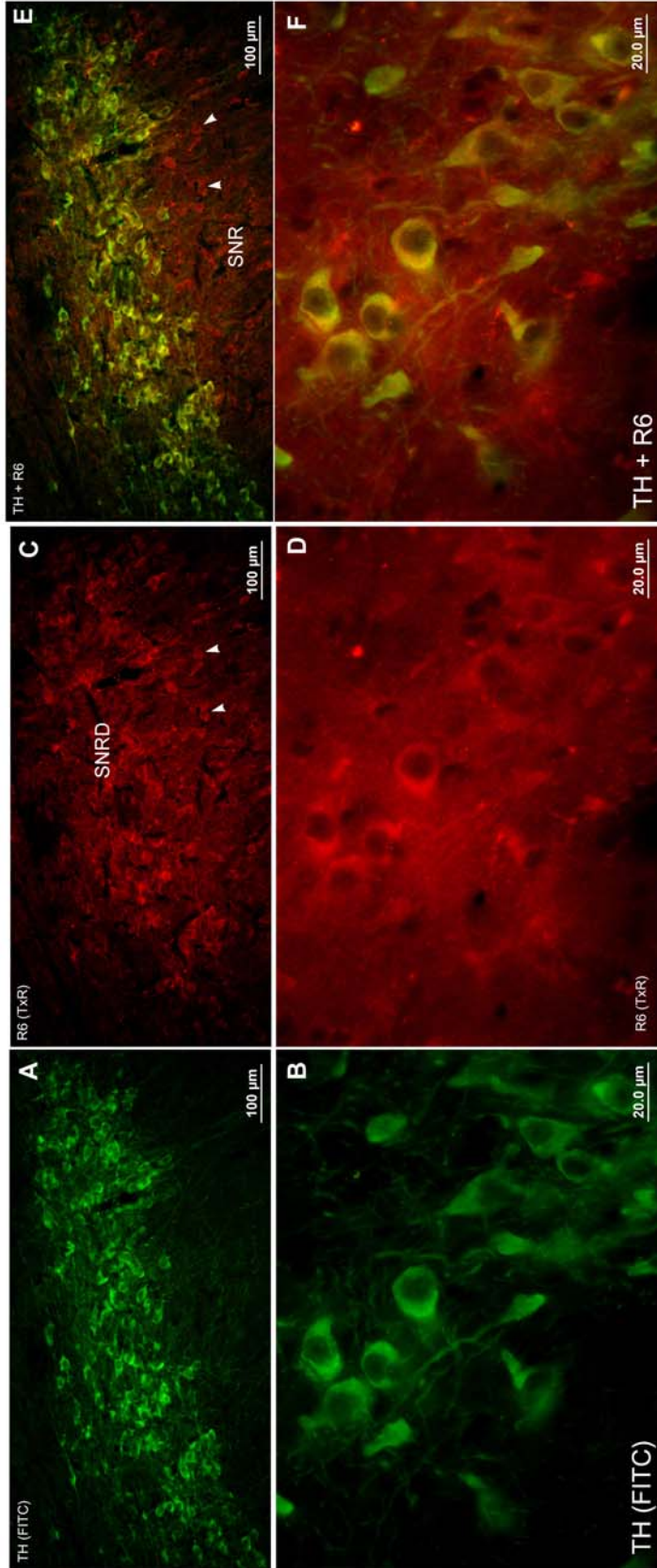
***Ort.** = Ortalama ± SEM.

GluR6 immunopozitif nöronların SNC'nın dorsal tabakasında daha yoğun olduğu gözlemlendi (Şekil–7A, B ve 8C, E). SNC nöronlarında GluR6 proteinin hücre içi ekspresyon yoğunluğu gerek immunoperoksidaz yöntemi gerekse immunofluoresan yönteminde küçük büyütmede diğer alt birimlere göre daha az belirgin olup (Şekil–7A, B ve 8C) büyük büyütmede daha kolay ayırt edildi (Şekil–7C, D ve 8C). Morfolojik değerlendirmede, GluR6 alt birim ekspresyonu hücre uzantılarında da görülmekle birlikte sıklıkla hücre gövdelerinde belirgindi (Şekil–7D ve 8D). Her iki proteini de eksprese eden

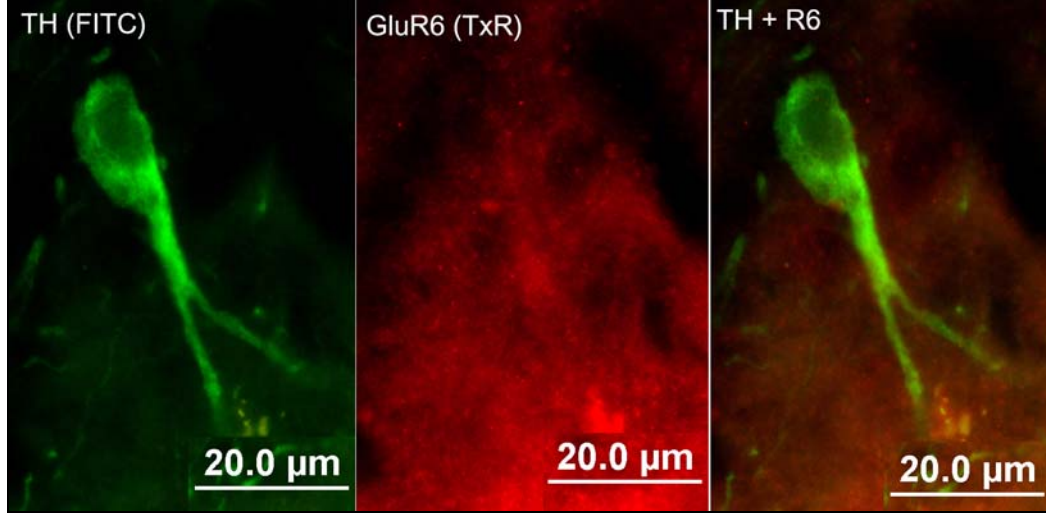
nöronlar ekspresyonunun derecesine göre sarı ve tonlarında izlendi (Şekil-8E, F ve 9).



Şekil-7: GluR6 reseptör proteininin SN'daki dağılımı, immunoperoksidaz boyaması. GluR6 reseptörlerinin SNC'nın dorsal bölümünde daha yoğun olarak dağılım gösterdiği izlenmekle birlikte (A ve B), DAB reaksiyonu büyük büyütmede daha rahat ayırt edildi (C). Büyük büyütmede, SNC'nın dorsal bölümünde yerleşik orta büyüklükte fuziform şekilli nöronların hücre gövdelerinde GluR6 immunreaktivitesi gözlemlendi (D). **ml**: medial lemniskus, **MT**: medial terminal nukleus (aksesuar optik yolağa ait), **SNC**: substansiya nigra pars kompakta, **SNR**: substansiya nigra pars retikülata.



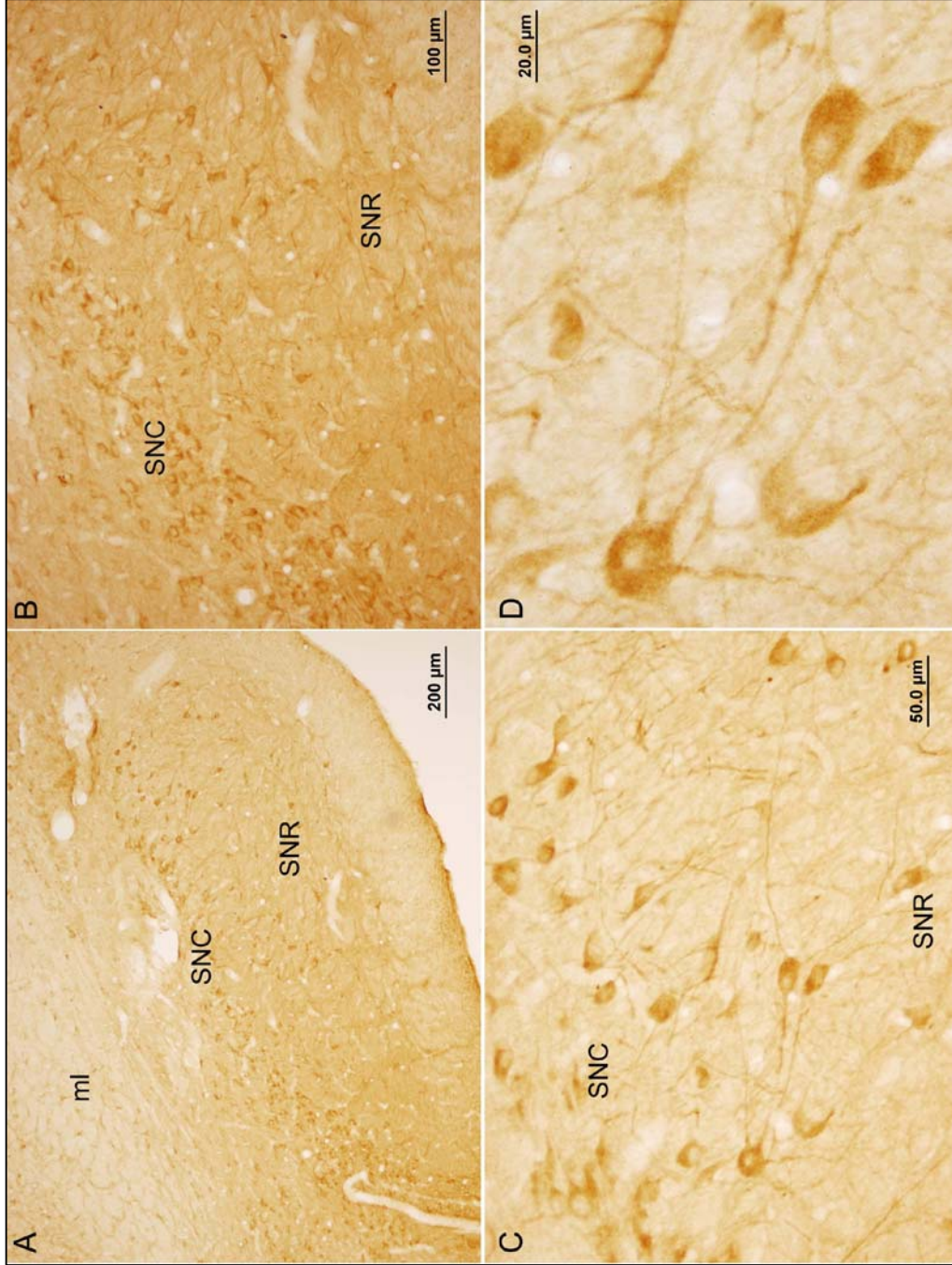
Şekil-8: Kainat reseptör alt birimi GluR6 proteini eksprese eden DAerjik nöronların floresan işaretli sekonder antikorların kullanımı sonrası elde edilen fotomikrografları. Küçük büyütmede SNCD'da yerleşik TH-pozitif (A), GluR6 reseptör alt birim protein içeren (C) görünüşü. SNR'te de GluR6 immunoreaktif non-dopaminerjik nöronlar izlenmektedir (C). DAerjik nöronların hücre uzantılarında da belirgin TH ekspresyonu izlenirken (B), GluR6 ekspresyonu hücre gövdelerinde daha belirgindi (D). Her iki proteini de eksprese eden nöronlar (E, F) ekspresyonun derecesine göre sarı ve tonlarında izlendi. **SNCD:** Substansiya nigra, pars kompakta dorsal bölüm, **SNR:** Substansiya nigra pars retikülata.



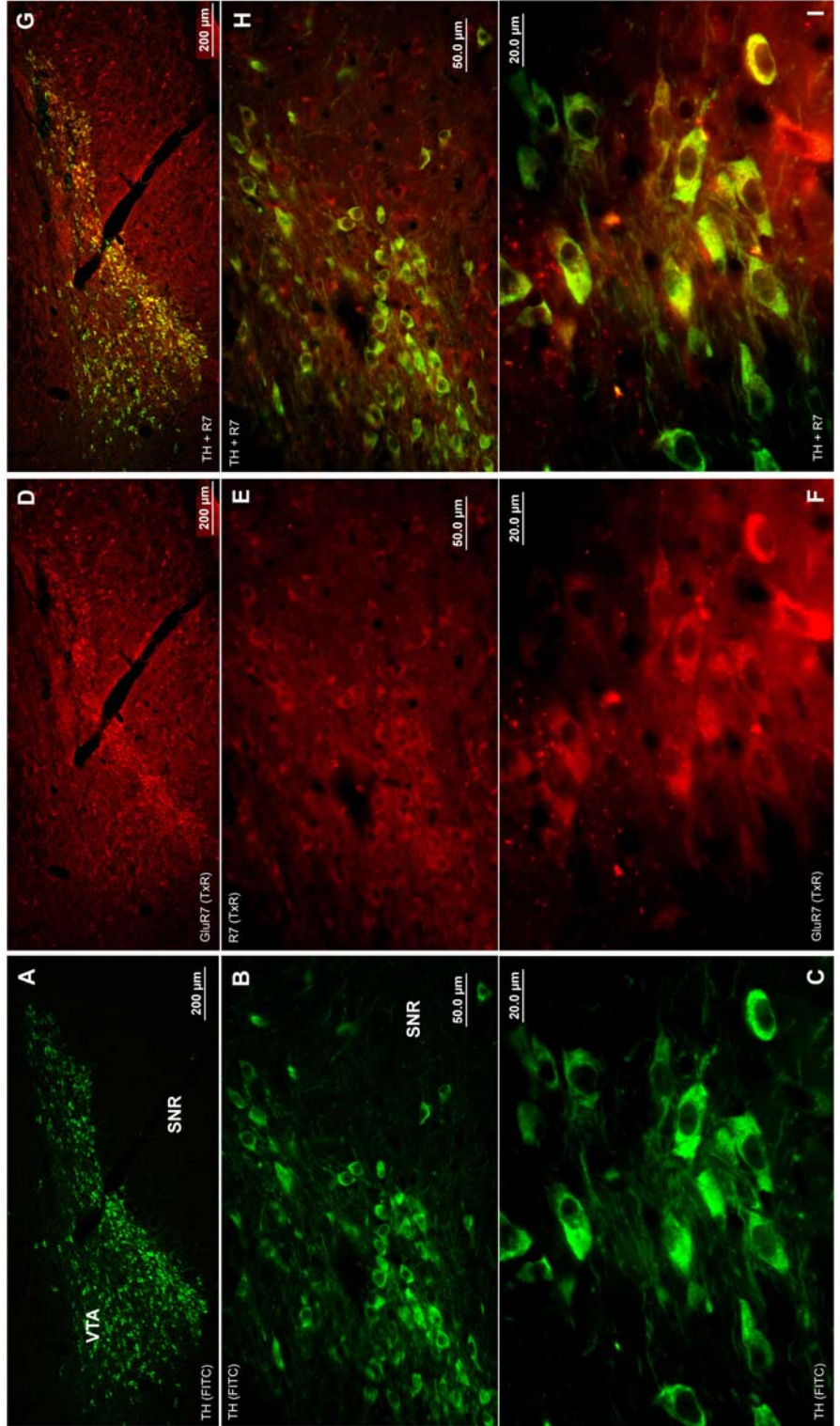
Şekil-9: Kainat reseptör alt birimi GluR6 protein ekspresyonu gözlenmeyen DAerjik nöronun fotomikrografı.

GluR7 Ekspresyonu: İmmunoperoksidaz yöntemi ile SN'nın her iki bölümünde de (SNC ve SNR) kolaylıkla ayırt edilebilen heterojen GluR7 immunoreaktivitesi belirlendi. GluR7 immunoreaktif nöronlar SNC'da yoğun olarak gözlenirken, SNR'te daha az miktarda izlendi (Şekil-10A, B). Bu immunoreaktivite her iki bölgede de hücre gövdelerinde daha belirgin olmakla birlikte, dendritik uzantılarda da gözlendi (Şekil-10C, D ve 11). GluR7 pozitif TH nöronlarının SN'daki dağılımında bölgesel farklılık gözlenmedi (Şekil-11).

GluR7 ekspresyonu için işaretlenen kesitlerde sayılan TH immunoreaksiyonu ile izlenen dopaminerjik nöron sayısı dişilerde 4723, erkeklerde 5234; TH ve GluR7'yi birlikte eksprese eden nöron sayısı dişilerde 3853, erkeklerde 4334 olarak belirlendi (Tablo-4). GluR7 reseptör protein eksprese eden dopamin nöronlarının oranı dişilerde %81.1, erkeklerde %82.6 olarak bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonucu cinsiyetler arasında fark olmadığı belirlendi (Tablo-2).



Şekil-10: GluR7 reseptörlerinin SN'daki dağılımı, immunoperoksidaz boyaması. Heterojen GluR7 immunoreaktivitesi, hücre gövdelerinde belirgin olup, SNC'da, SNR'a oranla daha yoğun olarak izlendi (A ve B). SNC ve SNR'te, DAB reaksiyonu hücre gövdelerinde belirgindi. Aynı zamanda GluR7 pozitif hücrelerin dendritik uzantılarında da immunoreaktivite gözlemlendi (C ve D). **ml:** medial lemniskus, **SNC:** substansiya nigra, pars kompakta, **SNR:** substansiya nigra pars retikülata.



Şekil-11: Kainat reseptör alt birimi GluR7 proteini eksprese eden DAerjik nöronların immunfluoresan yöntemle elde edilen fotomikrografı. Küçük büyütmede SNCD'daki TH-pozitif (A), GluR7-pozitif (D) nöronların görünüşü. SNR'te de GluR7-pozitif non-DAerjik nöronlar izlenmektedir (D). DAerjik

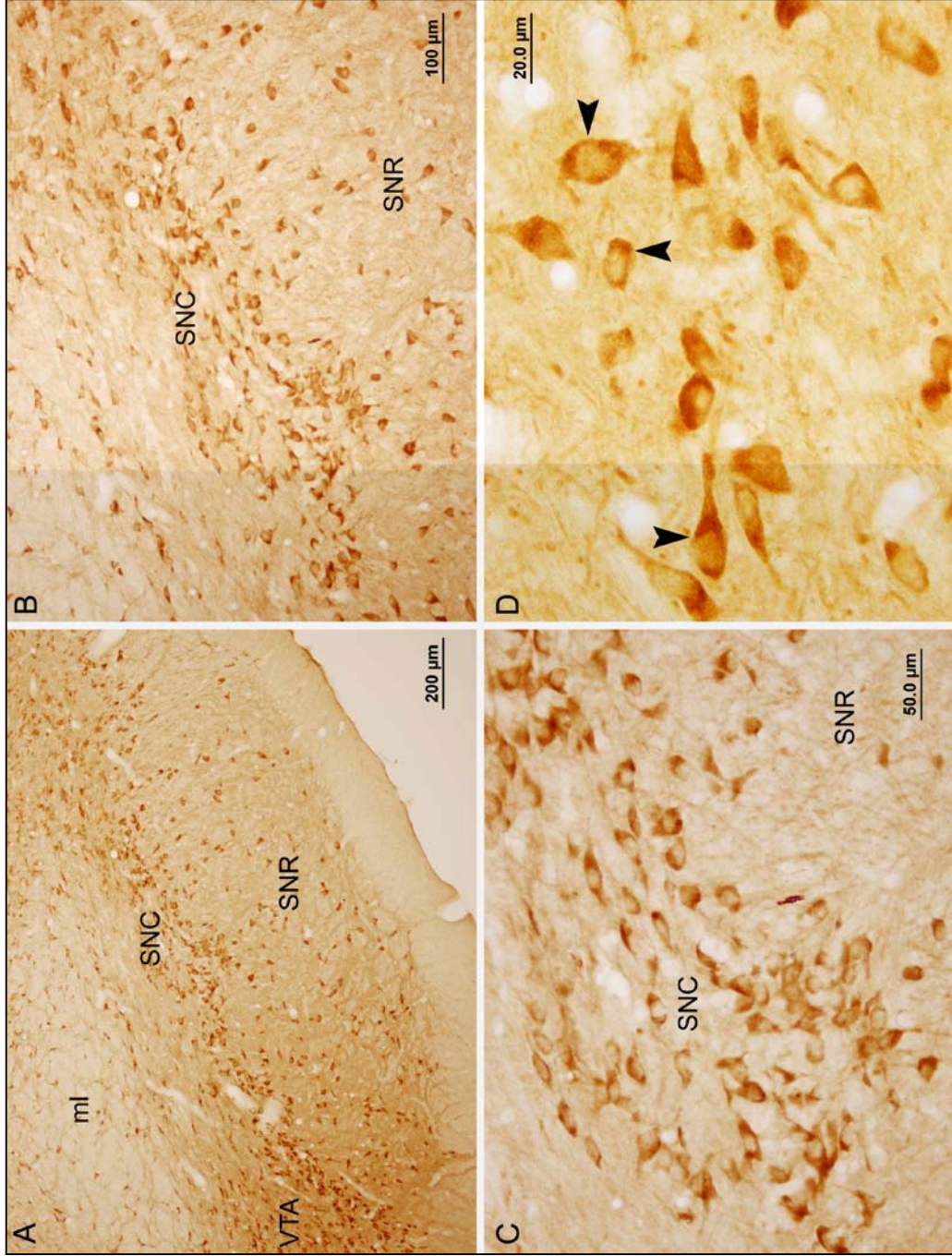
nöronların hücre uzantılarında da belirgin TH (C) ve GluR7 ekspresyonu (E) vardı. Her iki proteini de eksprese eden nöronlar (G, H, I) ekspresyonun derecesine göre sarı ve tonlarında izlendi. **SNR:** Substansiya nigra pars retikülata, **VTA:** Ventral tegmental alan.

Tablo-4: SNC'nin TH immunoreaktif DAerjik nöronlarında GluR7 reseptör alt birim proteini ekspresyonu.

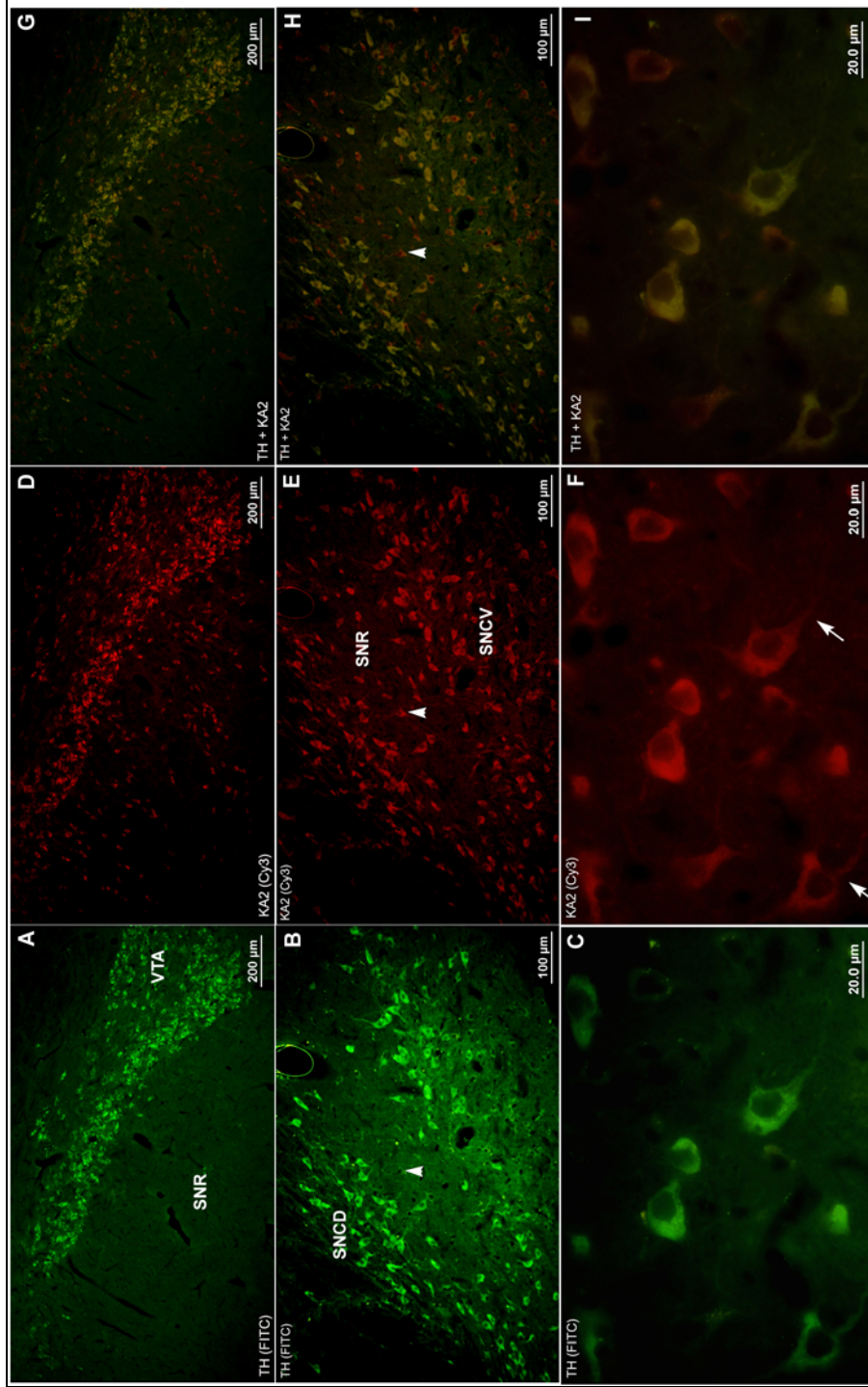
Denek #	TH		TH/GluR7		%GluR7	
	Dişi	Erkek	Dişi	Erkek	Dişi	Erkek
1	822	1157	619	995	75.3	85.99
2	1063	1053	916	879	86.17	83.47
3	1062	960	920	783	86.62	81.56
4	891	954	698	772	78.33	80.92
5	885	1110	700	905	79.09	81.53
Toplam	4723	5234	3853	4334	–	–
*Ort.	944 ± 49.62	1046.80 ± 40.20	770 ± 61.92	866,80±41.26	81,10 ± 2.25	82.69 ± 0.92

TH: Dört kesitte bilateral sayılan TH immunoreaktif DAerjik nöron sayısı (n=5).
TH/GluR7: Glutamat reseptörü eksprese eden TH işaretli DAerjik nöron sayısı.
%GluR7: İkili işaretlenen (TH/GluR) nöron yüzdesi.
***Ort.** = Ortalama ± SEM.

KA2 Ekspresyonu: İmmunoperoksidaz yöntemi ile yapılan boyamalarda SN'daki DAerjik ve non-DAerjik nöronlarda KA2 immunoreaktivitesi belirlendi (Şekil-12A, B). İşaretlenmenin özellikle hücre gövdelerinde; aynı zamanda az sayıda dendritik uzantılarında da belirgin olduğu görüldü (Şekil-12C). Hüresel düzeyde incelendiğinde; immunoreaktivitenin bazı nöronların sitoplazmalarında uniform dağılım gösterirken, bir kısım nöronda ise nöroplazmanın belli bölgelerinde toplandığı izlendi (Şekil-12D). İmmunofluoresan yöntemle işaretlenen kesitler incelendiğinde, erkek ve dişilerde SNC'nın dorsal ve ventral bölümlerindeki TH-pozitif DAerjik nöronların tümünün kainat reseptör alt birimi KA2 proteini eksprese ettiği belirlendi (Şekil-13).



Şekil-12: KA2 reseptörlerinin SN'daki dağılımı, immunoperoksidaz boyaması. SN'daki DAerjik ve non-DAerjik nöronlarda KA2 immunoreaktivitesi olduğu (A), işaretlenmenin özellikle hücre gövdelerinde (B) ve bazı dendritik uzantılar da belirgin olduğu izlendi (C). Hüresel düzeyde, immunoreaktivitenin bazı nöronların sitoplazmalarında uniform dağılım gösterdiği, bir kısım nöronda ise nöroplazmanın belli bölgelerinde toplandığı izlendi (D). **Ok başı:** Nöroplazmasında bölgesel KA2 immunoreaktivitesi gösteren nöronlar. **ml:** medial lemniskus, **SNC:** substansiya nigra pars kompakta, **SNR:** substansiya nigra pars retikulata, **VTA:** ventral tegmental alan.



Şekil-13: SNC'nin dorsal (A) ve ventral (B) bölümünde TH-pozitif DAerjik nöronların görünüşü. SNC'nin dorsal ve ventral bölümleri arasında kainat reseptör alt birimi KA2 proteini ekspresyonu açısından fark gözlenmedi. Ayrıca, SNR'in non-DAerjik nöronlarında da KA2 ekspresyonu belirlendi (D, E). SNC'nin TH ekspresyon eden DAerjik nöronlarının tümünde KA2 reseptör alt birim proteini ekspresyonu gözlemlendi (G, H). **Ok başı**, sadece KA2-pozitif olan bir nöronu göstermektedir. Büyük büyütmede TH (C), KA2 (F) ve heriki proteini ekspresyon eden nöronlar (I) izlenmektedir. KA2-pozitif hücrelerin hem somaları hem de uzantılarında (**ok**) ekspresyon görüldü. **SNR**: Substansiya nigra pars retikülata, **SNCD**: SNC dorsal bölüm, **SNCV**: SNC ventral bölüm, **VTA**: Ventral tegmental alan.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Sunulan çalışmada, ikili immunofluoresan işaretleme yöntemi ile SN'nın DAerjik nöronlarında, KA reseptör alt birimlerinden KA2, GluR5, GluR6 ve GluR7'nin farklı miktarlarda eksprese edildiği gösterildi. TH pozitif nöronların tümünde KA2 protein ekspresyonu vardı. Düşük affiniteli kainat reseptör alt birimleri arasında en belirgin ekspresyon GluR7 proteinine aitti. DAerjik nöronların yaklaşık %81 (dişi) – %83 (erkek)'ünde GluR7 immunoreaktivitesi belirlendi. Daha belirgin olarak hücre gövdelerinde gözlenen GluR6 protein ekspresyonunun hücre içi ekspresyon yoğunluğu diğer reseptör proteinlerine göre daha azdı. En az oranda immunoreaktif olan kainat reseptör alt birim proteini GluR5'ti. DAerjik nöronların yaklaşık %68 (dişi) – %65 (erkek)'inin GluR5 reseptör alt birim proteini eksprese ettiği belirlendi.

Bazal ganglion, serebral hemisferlerin beyaz cevherinde bilateral yerleşmiş beş çift nukleustan oluşur; kaudat nukleus, putamen, STN, SN ve GP. SN'nın, pars retikülatası, bazal ganglionun ana çıkış sistemini oluştururken pars kompaktasının dopaminerjik nöronları, baskın olarak striatumu innerve eden nigrostriatal DAerjik yolağı meydana getirir (49). SNC'nın dopaminerjik nöronları hem inhibitör hem de eksitator girdiler (inputs) alır. Bu girdilerin çok büyük bir kısmı (\leq %90) inhibitördür ve kaudat–putamen kompleksi ve pallidumdan kaynaklanır (33,43). Eksitator girdiler başta STN (64) olmak üzere pedinkülopontin nukleus (65) ve serebral korteksten (49,66) gelir. Bu girdiler GLUerjiktir (9,37,67). Morfolojik çalışmalar, SNC'da glutamat içeren akson sonlanmalarının olduğunu gösterirken (39,40,68), elektrofizyolojik ve farmakolojik veriler, glutamat ve agonistlerinin dopamin nöronlarının aktivitesini etkilediğini ve dopamin salınımını düzenlediğini ortaya çıkarmıştır (33,37,45,67,69). Salınan glutamat fizyolojik koşullarda eksitator nörotransmitter olarak DAerjik nöronların aktivitesini düzenler. Buna karşın glutamatın aşırı ve uzun süreli uyarısı, dopaminerjik nöronlarda progressif dejenerasyona neden olabilir (6,49).

NMDA ve AMPA reseptörlerinin eksitatör aminoasitler tarafından uyarılan nöronal toksisite ile ilgili olduğu gösterilmiştir (19,70). Örneğin, Parkinson hastalığında artmış GLU miktarına bağlı DAerjik nöron hasarının (6,47), şizofrenide, glutamat reseptörlerinin azalmış fonksiyonuna bağlı DA hiperaktivitesinin patofizyolojide rol oynadığı düşünülmektedir (62,71).

GLU reseptörlerinin aşırı uyarılması nöron ölümüne neden olur. Bu fenomen eksisitotoksisite olarak adlandırılır. SNC'tadaki DAerjik nöron dejenerasyonunda pekçok patojenik faktörün etkili olduğu bilinmesine karşın asıl mekanizma hala açıklanamamıştır (72). Giderek artan veriler bazal gangliondaki nöronal dejenerasyonda ve Parkinson hastalığının patogenezinde glutamatın aracılık ettiği eksisitotoksistenin kritik rol oynadığını göstermektedir (73). GLU'ın üç farklı mekanizma ile nörodejeneratif olaylara katıldığı düşünülmektedir (7): İlk mekanizmaya göre, GLU reseptörlerine etki eden eksojen GLU ya da ilişkili moleküller diyetle alınabilir ve bu da beyin hasarı oluşturabilir. İkinci mekanizmada, nöronlardan salınan endojen GLU'ın, serebral iskemi ve beyin travmalarında görülen akut nörodejenerasyona katılma olasılığı vardır. Son mekanizmada ise GLU reseptörlerinin aktivasyonunun, kronik nörodejeneratif hastalıklardaki (motor nöron hastalığı, ALS, Huntington hastalığı, Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalığı gibi) hücre ölümüne katılması söz konusudur (7).

GLU, NMDA, AMPA; kainat ve Grup I metabotropik reseptörlerde agonist etki yoluyla nörotoksik olabilir. Bu farklı sınıflardaki reseptörlerin relatif katılımı, etkilenen nöronlara ve diğer şartların çeşitliliğine göre değişim gösterir. Örneğin; status epileptikus takiben gözlenen selektif nöronal hücre hasarının özellikle NMDA reseptör aktivasyonuna, geçici global ve fokal serebral iskemi sonrası izlenen nöronal dejenerasyonun ise hem NMDA hem de AMPA reseptörlerine bağlı olduğu sanılmaktadır (7,27,40,74). Deneysel Parkinson modeli oluşturulmuş deneklere iyonotropik reseptör antagonistlerinin uygulamasının DAerjik nöronlar üzerinde koruyucu etkisinin olduğunun bildirilmesi, nörodejeneratif hastalıklardaki eksisitotoksistide bu reseptörlerin aktivasyonunun etkili olabileceğini düşündürmektedir (8,47,75,76).

GLU, etkisini metabotropik ve iyonotropik reseptörler üzerinden gösterir (3–5, 9–14, 43). İyonotropik glutamat reseptör alt grubundan biri olan ve MSS'de oldukça yaygın dağılımı bulunan KA reseptörleri eksitatör ve inhibitör nörotransmisyonunda rol alır (30). KA reseptörlerinin mezensefalonda ve striatumda yoğun olarak bulunduğu (10,12) ve hem orta beyin hem de striatal nöronların bazal aktivite ve plastisite kontrolünde önemli rol oynadığı bilinmektedir (63). Ventral orta beyin DAerjik nöronları, hareket ve davranış organizasyonunda önemli rol oynamaktadır (2). KA reseptörlerinin bazal ganglion ve mezensefalonda yoğun şekilde eksprese edilmesi, DAerjik transmisyonun kontrolüne katıldığını düşündürmektedir (63).

DA ve GLU, bazal ganglionun çeşitli bölgelerinde kognitif ve motor fonksiyonları düzenlemek için, presinaptik ve post sinaptik düzeyde etkileşim içindedir (45,77). GLUerjik efferentler, nigrostriatal ve mezolimbik dopaminerjik nöronlara projeksiyonlarını göndermektedir (62). GLU, striatumda DA salınımını düzenlediği gibi, SN ve VTA'da DA salınım ve aktivitesini değiştirebilir (62). *In situ* hibridizasyon ve immunohistokimyasal çalışmalar ile iyonotropik glutamat reseptörleri olan NMDA ve AMPA reseptör alt birimlerinin, orta beyinin DAerjik nöronlarındaki ekspresyonu belirlenmiştir (9,39–41,47–49). Mikro kültürlerde, DA nöronlarının hedef nöronlarla GLUerjik sinaptik bağlantılar yaptığı gösterilmiştir (1). Buna karşın kainat reseptör alt birimlerinin sinir dokusu ve özellikle bazal gangliondaki dağılımı ile ilgili veriler sınırlıdır ve ayrıca; çalışmaların sonuçları arasında farklılıklar bulunmaktadır (10,12,17,62,63). GluR5 reseptör alt birimi için SNC'da ekspresyon görülmediğini bildiren çalışmalar yanında (10,17), SNC'da çok yüksek seviyede eksprese edildiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (12,62,63). Wüllner ve ark (10), oligodeoksisiribonükleotid problemleri kullandıkları *in situ* hibridizasyon çalışmalarında sıçan SNC'sında GluR5 mRNA ekspresyonu olmadığını bildirilmektedir. Buna karşın Bischoff ve ark (12), çinçila farelerde yaptıkları ve riboprob kullandıkları *in situ* hibridizasyon çalışmalarında, SNC'da GluR5 mRNA'sının yüksek oranda eksprese edildiği göstermişlerdir. Mueller ve ark (62), insan otopsi materyallerinde *in situ* hibridizasyon tekniği ile beş tip kainat reseptör alt birim mRNA'sının

ekspresyonunu göstermişlerdir. Bu çalışmaya göre en yoğun ekspresyon GluR6, daha az olarak ta GluR5 ve KA2 alt birimine aittir. Lilliu ve ark (63), RT-PCR tekniği ile erişkin sıçanların ventral mezansafalonunda beş tip glutamat reseptör gen ekspresyonunun olduğunu göstermişlerdir. Sunulan çalışmada, GluR5 alt biriminin, SNC'da TH immunoreaktif DAerjik nöronlardaki ekspresyon oranı dişi deneklerde yaklaşık %68, erkek deneklerde ise %65 olarak bulundu.

GluR6 ekspresyonunun, striatum ve STN'ta belirgin, SNR nöronlarında orta derecede, serebellar granül hücreleri, dentat girus, hipokampus CA3 bölgesinde yoğun olarak bulunurken SNC nöronlarında eksprese edilmediğini gösteren çalışmaların (10,17) yanı sıra, SN'nin DAerjik nöronlarında GluR6 immunoreaktivitesi olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (12,62,63). Sunulan çalışmada, GluR6 alt biriminin SNC'da TH immunoreaktif DAerjik nöronlardaki ekspresyon oranı oldukça yüksek bulundu. Oran dişi denekler için %78, erkek denekler için %70 olarak belirlendi. Bu sonuç Mueller ve ark (62)'nin insan beyinde yaptığı *in situ* hibridizasyon çalışmasında GluR6'nın SNC'da en yüksek oranda ekspresyonu olan kainat reseptör alt birimi olduğunu bildiren çalışması ile uyumluydu. Bischoff ve ark (12) ise GluR6 mRNA'nın SNC'nin ventral bölümünde daha fazla olmak üzere eksprese edildiğini göstermiştir. Diğer bir *in situ* hibridizasyon çalışmasında Wüllner ve ark. (10), sıçan beyinde SNC'da GluR6 ekspresyonunun olmadığı bildirilmektedir. Sunulan çalışmada hücre içi yoğunluğu az olmakla birlikte SNC'da GluR6 reseptör protein ekspresyonunun belirlenmesi, GluR6'nın bölgede bulunan kainat reseptör komplekslerinin yapısına katılabileceğini düşündürmüştür.

Kainat reseptör agonisti olan kainat uygulaması, hücre içi Ca^{2+} miktarının artışıyla sonuçlanır ve pek çok beyin bölgesinde nöronal apoptoza neden olan Ca^{2+} -bağımlı yolları tetikler. Kemirgenlerde kainatın sistemik enjeksiyonu, nörodejeneratif hastalıklarda gözlenen glial hücre aktivasyonu ve enflamatuvar yanıtı neden olur (27). Striatum ve hipokampusun CA3 bölgesi gibi kainat eksitotoksitesine özellikle duyarlı olan bölgelerde, GluR6 ve KA2 kainat reseptör gen ekspresyon seviyesi yüksektir (78,79). Yüksek

afiniteli kainat reseptörlerinin (KA1 ve KA2) nörodejenerasyon sürecine katılımının olası olmasına karşın, bunu gösteren direkt bulgular nadirdir (27). CA3 bölgesinde yapılan immunohistokimyasal morfolojik ve farmakolojik çalışmalar eksisitotoksisitenin tetiklenmesinde anahtar reseptörün GluR6 olduğunu göstermiştir (80,81). İntranigral kainik asit uygulaması, SN'nın DAerjik nöronlarında dejenerasyona sebep olmaktadır (74). Sunulan çalışmadan elde edilen sonuçlar ve literatür verileri birlikte değerlendirildiği zaman SNC'daki DAerjik nöron kaybında GluR6 reseptörünün de etkisi olabileceğini düşündürmüştür.

GluR7 reseptör proteininin beyindeki ekspresyonu sınırlıdır. Serebral korteksin derinlerinde, hipotalamik nukleusların bazılarında, striatumda, serebellumun moleküler tabakasındaki inhibitör nöronlarda, GP, VTA, SNC ve STN'da eksprese edilir (10,12,17,82). İn situ hibridizasyon ve immunohistokimyasal çalışmalar, bazal ganglionda en yüksek GluR7 ekspresyonunun SNC'da olduğunu bildirmektedir (10,12,83). Sunulan çalışmada elde edilen veriler, TH immunoreaktif dopaminerjik nöronların soma ve proksimal dendritlerinde en fazla eksprese edilen düşük affiniteli kainat reseptör alt birim proteininin GluR7 olduğunu gösterdi. Bu da SNC'da GLUerjik innervasyon alan DAerjik nöronların soma ve proksimal dendritlerindeki GluR7 reseptör alt biriminin postsinaptik lokalizasyonu ile bağdaşmaktadır ve assendan nigrostriatal DAerjik feedback devrelerinde eksprese edildiğini göstermektedir. Ek olarak, SNC'nın DAerjik nöronlarında en yüksek oranda gözlenen kainat reseptör alt biriminin GluR7 olduğunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi, uygun DAerjik girdinin sağlanmasında gerekli olan eksitator gücü sağlayan anahtar kainat reseptör alt birimi olabileceği görüşünü de desteklemektedir (12). Ayrıca, GluR7, DAerjik nöronların soma ve dendritlerinde yerleşik presinaptik DA otoreseptörleri ile de ilişkili olabilir. DA'in somatodendritik salınımını tetikleyebilir ve böylece DA transmisyonunu kontrol eden presinaptik feedback aksına katılabilir (67). Yine, SNC'nın dopaminerjik nöronlarında sentezlenen GluR7 reseptör proteininin bir kısmının kaudat putamen ve/veya nukleus akumbensteki DAerjik sinir sonlamalarına taşınıyor olması

muhtemeldir. Nitekim, GluR7 ve KA2, SNC'da en yüksek oranda eksprese edilen kainat reseptör alt birimleri olmasına karşın, SN'da [³H] kainat bağlama oranının çok düşük olduğu gösterilmiştir (10,12). Bu literatür verisi de GluR7 ve KA2'nin DAerjik sinir sonlanmalarında presinaptik yerleşiminin olabileceği düşüncesini desteklemektedir. Veziküler glutamat taşıyıcıları (VGluT) GLUerjik nöronlarda, glutamatın sinaptik veziküller içinde toplanmasını sağlar. Bu noktalar birlikte değerlendirildiği zaman, DAerjik feedback aksının regülasyonunda ve homeostatik nöronal aktivitenin sürdürülmesinde GluR7'nin kritik bir rol oynadığı düşünülmüştür.

KA2 ekspresyonu beyinde yaygın bir dağılım gösterir. Bazal ganglion içinde ise striatum, STN'ta yoğun, GP ve SNR'te düşük seviyede eksprese edilmektedir {10,17,23}. Wüllner ve ark. (10) SNC'da orta dereceli ekspresyon olduğunu bildirirken, Bischoff ve ark (12), SNC'da KA2 ekspresyonu olmadığını bildirilmektedir. Sunulan çalışmada cinsiyet farklılığı olmaksızın SNC'nın DAerjik nöronların tümünde KA2 immunoreaktivitesi belirlendi. Kainat reseptör alt birimlerinin dağılımları ile ilgili çalışmalar arasındaki çelişkiler, kullanılan yöntemlere ve/veya çalışılan canlı türünün farklılığına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Kainat reseptörleri, katyonlara geçirgen, düşük konsantrasyonda kainat ile uyarılan ve hızlı aktivasyon ve desensitizasyon özelliği olan ligand-kapılı kanallardır. Beynin değişik bölgelerindeki hücreler, farklı farmakolojik ve elektrofizyolojik özellikleri olan kainat reseptör alt birim kombinasyonları eksprese ederler (27,78). Dolayısıyla alt birim sitoşimetretrisindeki değişim kainat reseptör fonksiyonları üzerinde etkili olabilir. GluR5 homomerleri ve GluR5/6 içeren reseptörler, homomerik GluR6 reseptörlerinden daha hızlı desensitize olmakta ve onlardan daha yavaş desensitizasyondan kurtulmaktadır (62). Sunulan çalışmada SNC'da varlığı gösterilen kainat reseptör alt birimlerinin tek başlarına ve/veya birlikte fonksiyonel iyon kanalları oluşturarak striatumdaki DAerjik aktivitede değişim oluşturmaları olasıdır.

Nigrostriatal DAerjik sistemin nörodejenerasyonunun neden olduğu Parkinson hastalığı için bazı risk faktörleri olduğu bilinmektedir (57–59). Bu

risk faktörlerinden biri cinsiyettir ve hastalığın erkeklerde görülme sıklığının daha fazla olduğu bilinmektedir (51). Hastalığın prevalansındaki cinsiyet farklılığının nedeni tam olarak bilinmemesine karşın gonadal steroidlerin (örneğin östrojen) nigrostriatal dopaminerjik sistemin nörodejenerasyonunu etkileyebileceği ve nigrostriatal sistemin korunmasında etkili olabileceği ileri sürülmektedir (51,54). Ancak; östrojenin nörodejeneratif hastalıklardaki etkisini araştırmak amacıyla yapılan çalışmaların sonuçları farklılık göstermektedir (50–52). Literatür verilerinden yola çıkarak, sunulan çalışmada cinsiyetler arasında kantitatif olarak reseptör düzeyinde farklılık olup olmadığı araştırıldı. Araştırılan dört kainat reseptör alt birim proteini (GluR5, GluR6, GluR7 ve KA2) için elde edilen değerler, gerek sayılan toplam DAerjik nöron sayıları gerekse reseptör proteini immunoreaktif DAerjik nöron sayıları arasında cinsiyetler açısından farklılık olmadığını gösterdi. Bu da kainat reseptör alt birim proteinlerinin nöroprotektif etkisinin olmayacağını düşündürmüştür.

Sunulan çalışma, SNC'nın DA nöronlarının büyük bir kısmının kainat reseptör altbirim proteinlerini eksprese ettiğini immunohistokimyasal olarak göstermiştir. Elde edilen bulgular;

- NMDA ve AMPA reseptörlerinin yanı sıra kainat reseptörlerinin de dopaminerjik nöronların glutamaterjik modülasyon ve regülasyonuna aracılık ettiğini,
- Eksitator aminoasitlerin neden olduğu nöronal toksisite göz önüne alındığında, kainat reseptör alt birim proteinlerinin SNC'daki varlığı, Parkinson hastalığındaki selektif DAerjik nöron ölümünün temelinde, hücrel glutamat reseptörlerinin rol oynayabileceğini,
- Bazı mental hastalıklar (şizofreni gibi) nigrostriatal ve mezolimbik DAerjik sistemin hiperfonksiyonu ile ilişkilidir. GLUerjik yollarla bağlantılar göz önüne alınca GLUerjik sistemin bu hastalıkların etyolojisinde rol oynaması olasıdır. SNC'da kainat reseptör alt birim proteinlerinden birinin ekspresyonunun artması şizofreni ile ilişkili olabileceğini,

- Nigrostriatal Daerjik sistemin nörodejenerasyonunda var olan cinsiyetler arasındaki prevalans farkında kainat reseptör alt birim proteinlerinin kalitatif olarak etkili olmadığını düşündürmüştür.

Sonuç olarak; immunohistokimyasal yöntemlerle SNC'da ekspresyonları belirlenen kainat reseptör alt birimlerinin, bazal ganglionda meydana gelen pek çok fizyolojik olaya katılabileceği ve böylece çeşitli patolojik süreçlerde etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Rayport S. Glutamate is a cotransmitter in ventral midbrain dopamine neurons. *Parkinsonism Relat Disord* 2001;7:261–64.
2. Sulzer D, Joyce MP, Lin L *et al*. Dopamine neurons make glutamatergic synapses *in vitro*. *J Neurosci* 1998;18:4588–602.
3. Lobo MK, Itri JN, Cepeda C, Chavira CA, Levine MS. Ionotropic glutamate receptor expression and dopaminergic modulation in the developing subthalamic nucleus of the rat: an immunohistochemical and electrophysiological analysis. *Dev Neurosci* 2003;25:384–93.
4. Kew JN, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;179:4–29.
5. Wollmuth LP, Sobolevsky AI. Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci* 2004;27:321–28.
6. Plaitakis A, Shashidharan P. Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol* 2000;247 Suppl 2:II25–II35.
7. Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 2000;130:1007S–15S.
8. Wu J, Partridge LD. Dissociated dopaminergic neurons from substantia nigra zona compacta in young rats lack functional NMDA receptors. *Pflugers Arch* 1998;435:699–704.
9. Chen LW, Wei LC, Lang B, Ju G, Chan YS. Differential expression of AMPA receptor subunits in dopamine neurons of the rat brain: a double immunocytochemical study. *Neuroscience* 2001;106:149–60.
10. Wullner U, Standaert DG, Testa CM, Penney JB, Young AB. Differential expression of kainate receptors in the basal ganglia of the developing and adult rat brain. *Brain Res* 1997;768:215–23.
11. Huettner JE. Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 2003;70:387–407.
12. Bischoff S, Barhanin J, Bettler B, Mulle C, Heinemann S. Spatial distribution of kainate receptor subunit mRNA in the mouse basal ganglia and ventral mesencephalon. *J Comp Neurol* 1997;379:541–62.
13. Kubo M, Ito E. Structural dynamics of an ionotropic glutamate receptor. *Proteins* 2004;56:411–19.
14. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998;54:581–618.
15. Koles L, Wirkner K, Illes P. Modulation of ionotropic glutamate receptor channels. *Neurochem Res* 2001;26:925–32.
16. Tse YC, Yung KK. Cellular expression of ionotropic glutamate receptor subunits in subpopulations of neurons in the rat substantia nigra pars reticulata. *Brain Res* 2000;854:57–69.

17. Lerma J, Paternain AV, Rodriguez–Moreno A, Lopez–Garcia JC. Molecular physiology of kainate receptors. *Physiol Rev* 2001;81:971–98.
18. Johansen TN, Greenwood JR, Frydenvang K, Madsen U, Krogsgaard–Larsen P. Stereostructure–activity studies on agonists at the AMPA and kainate subtypes of ionotropic glutamate receptors. *Chirality* 2003;15:167–79.
19. Difazio MC, Hollingsworth Z, Young AB, Penney JB, Jr. Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains. *Neurology* 1992;42:402–06.
20. Bigge CF. Ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Chem Biol* 1999;3:441–47.
21. Lomeli H, Wisden W, Kohler M *et al.* High–affinity kainate and domoate receptors in rat brain. *FEBS* 1992;307:139–43.
22. Bettler B, Boulter J, Hermans–Borgmeyer I *et al.* Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron* 1990;5:583–95.
23. Chittajallu R, Braithwaite SP, Clarke VR, Henley JM. Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:26–35.
24. Bleakman D, Gates MR, Ogden AM, Mackowiak M. Kainate receptor agonists, antagonists and allosteric modulators. *Curr Pharm Des* 2002;8:873–85.
25. Frerking M, Nicoll RA. Synaptic kainate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10:342–51.
26. Conti P, De Amici M, De Micheli C. Selective agonists and antagonists for kainate receptors. *Mini Rev Med Chem* 2002;2:177–84.
27. Pinheiro P, Mulle C. Kainate receptors. *Cell Tissue Res* 2006;326:457–82.
28. Kamiya H. Kainate receptor–dependent presynaptic modulation and plasticity. *Neurosci Res* 2002;42:1–6.
29. Huettner JE. Kainate receptors: knocking out plasticity. *Trends Neurosci* 2001;24:365–66.
30. Isaac JT, Mellor J, Hurtado D, Roche KW. Kainate receptor trafficking: physiological roles and molecular mechanisms. *Pharmacol Ther* 2004;104:163–72.
31. Rodriguez–Moreno A, Sihra TS. Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *J Neurochem* 2007;103:2121–35.
32. Kullmann DM. Presynaptic kainate receptors in the hippocampus: slowly emerging from obscurity. *Neuron* 2001;32:561–64.
33. Nakamura M, Jang IS, Ishibashi H, Watanabe S, Akaike N. Possible roles of kainate receptors on GABAergic nerve terminals projecting to rat substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neurophysiol* 2003;90:1662–70.
34. Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 2000;24:125–32.

35. Chinta SJ, Andersen JK. Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:942–46.
36. Bjorklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 2007;30:194–202.
37. Vivo M, Camon L, de Vera N, Martinez E. Lesion of substantia nigra pars compacta by the GluR5 agonist ATPA. *Brain Res* 2002;955:104–14.
38. Fallon JH, Loughlin SE. Substantia Nigra, In: Paxinos G, (ed). *The Rat Nervous System*, 2 nd ed. San Diego, CA: Academic Press; 1995. p. 215–37.
39. Chatha BT, Bernard V, Streit P, Bolam JP. Synaptic localization of ionotropic glutamate receptors in the rat substantia nigra. *Neuroscience* 2000;101:1037–51.
40. Albers DS, Weiss SW, Iadarola MJ, Standaert DG. Immunohistochemical localization of N-methyl-D-aspartate and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor subunits in the substantia nigra pars compacta of the rat. *Neuroscience* 1999;89:209–20.
41. Hubert GW, Paquet M, Smith Y. Differential subcellular localization of mGluR1a and mGluR5 in the rat and monkey Substantia nigra. *J Neurosci* 2001;21:1838–47.
42. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5 th ed. San Diego, CA: Academic Press; 2004.
43. Misgeld U. Innervation of the substantia nigra. *Cell Tissue Res* 2004;318:107–14.
44. Tarazi FI, Campbell A, Yeghiayan SK, Baldessarini RJ. Localization of ionotropic glutamate receptors in caudate-putamen and nucleus accumbens septi of rat brain: comparison of NMDA, AMPA, and kainate receptors. *Synapse* 1998;30:227–35.
45. Meltzer LT, Christoffersen CL, Serpa KA. Modulation of dopamine neuronal activity by glutamate receptor subtypes. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21:511–18.
46. Tarazi FI, Baldessarini RJ. Regional localization of dopamine and ionotropic glutamate receptor subtypes in striatolimbic brain regions. *J Neurosci Res* 1999;55:401–10.
47. Paquet M, Tremblay M, Soghomonian JJ, Smith Y. AMPA and NMDA glutamate receptor subunits in midbrain dopaminergic neurons in the squirrel monkey: An immunohistochemical and *in situ* hybridization study. *J Neurosci* 1997;17:1377–96.
48. Yung KK. Localization of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in distinct neuronal elements of the rat substantia nigra. *Neurochem Int* 1998;33:313–26.
49. Wedzony K, Czepiel K, Fijał K. Immunohistochemical evidence for localization of NMDAR1 receptor subunit on dopaminergic neurons of the rat substantia nigra, pars compacta. *Pol J Pharmacol* 2001;53:675–79.

50. Murray HE, Pillai AV, McArthur SR *et al.* Dose- and sex-dependent effects of the neurotoxin 6-hydroxydopamine on the nigrostriatal dopaminergic pathway of adult rats: differential actions of estrogen in males and females. *Neuroscience* 2003;116:213–22.
51. Liu B, Dluzen DE. Oestrogen and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration: animal models and clinical reports of Parkinson's disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:555–65.
52. Ferraz AC, Xavier LL, Hernandez S *et al.* Failure of estrogen to protect the substantia nigra pars compacta of female rats from lesion induced by 6-hydroxydopamine. *Brain Res* 2003;986:200–05.
53. McArthur S, McHale E, Gillies GE. The size and distribution of midbrain dopaminergic populations are permanently altered by perinatal glucocorticoid exposure in a sex- region- and time-specific manner. *Neuropsychopharmacology* 2007;32:1462–76.
54. Ravizza T, Galanopoulou AS, Veliskova J, Moshe SL. Sex differences in androgen and estrogen receptor expression in rat substantia nigra during development: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 2002;115:685–96.
55. Cantuti-Castelvetri I, Keller-McGandy C, Bouzou B *et al.* Effects of gender on nigral gene expression and parkinson disease. *Neurobiol Dis* 2007;26:606–14.
56. Tamas A, Lubics A, Szalontay L, Lengvari I, Reglodi D. Age and gender differences in behavioral and morphological outcome after 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Behav Brain Res* 2005;158:221–29.
57. Uitti RJ, Baba Y, Wszolek ZK, Putzke DJ. Defining the Parkinson's disease phenotype: initial symptoms and baseline characteristics in a clinical cohort. *Parkinsonism Relat Disord* 2005;11:139–45.
58. Ascherio A, Chen H, Schwarzschild MA *et al.* Caffeine, postmenopausal estrogen, and risk of Parkinson's disease. *Neurology* 2003;60:790–95.
59. Kelada SN, Costa-Mallen P, Costa LG *et al.* Gender difference in the interaction of smoking and monoamine oxidase B intron 13 genotype in Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 2002;23:515–19.
60. Kaasinen V, Nurmi E, Bruck A *et al.* Increased frontal [(18)F]fluorodopa uptake in early Parkinson's disease: sex differences in the prefrontal cortex. *Brain* 2001;124:1125–30.
61. Marino MJ, Valenti O, Conn PJ. Glutamate receptors and Parkinson's disease: opportunities for intervention. *Drugs Aging* 2003;20:377–97.
62. Mueller HT, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH. Expression of the ionotropic glutamate receptor subunits and NMDA receptor-associated intracellular proteins in the substantia nigra in schizophrenia. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;121:60–69.
63. Lilliu V, Perrone-Capano C, Pernas-Alonso R *et al.* Ontogeny of kainate receptor gene expression in the developing rat midbrain and striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;104:1–10.

64. Iribe Y, Moore K, Pang KC, Tepper JM. Subthalamic stimulation-induced synaptic responses in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in vitro. *J Neurophysiol* 1999;82:925–33.
65. Kitai ST, Shepard PD, Callaway JC, Scroggs R. Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:690–97.
66. Carr DB, Sesack SR. Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J Neurosci* 2000;20:3864–73.
67. Zhang H, Kiyatkin EA, Stein EA. Behavioral and pharmacological modulation of ventral tegmental dendritic dopamine release. *Brain Res* 1994;656:59–70.
68. Charara A, Smith Y, Parent A. Glutamatergic inputs from the pedunculopontine nucleus to midbrain dopaminergic neurons in primates: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde labeling combined with postembedding glutamate and GABA immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 1996;364:254–66.
69. Wu HQ, Schwarcz R, Shepard PD. Excitatory amino acid-induced excitation of dopamine-containing neurons in the rat substantia nigra: modulation by kynurenic acid. *Synapse* 1994;16:219–30.
70. Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991;114:2283–301.
71. Di Forti M, Lappin JM, Murray RM. Risk factors for schizophrenia—all roads lead to dopamine. *Eur Neuropsychopharmacol* 2007;17 Suppl 2:S101–S107.
72. Fernandez-Espejo E. Pathogenesis of Parkinson's disease: prospects of neuroprotective and restorative therapies. *Mol Neurobiol* 2004;29:15–30.
73. Blandini F, Porter RH, Greenamyre JT. Glutamate and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 1996;12:73–94.
74. Chen LW, Wang YQ, Bian GL, Wei LC, Yung KL. Neurokinin-3 peptide instead of neurokinin-1 synergistically exacerbates kainic acid-inducing degeneration of neurons in the substantia nigra of mice. *J Neurochem* 2008;105:203–16.
75. Ball EF, Shaw PJ, Ince PG, Johnson M. The distribution of excitatory amino acid receptors in the normal human midbrain and basal ganglia with implications for Parkinson's disease: a quantitative autoradiographic study using [3H]MK-801, [3H]glycine, [3H]CNQX and [3H]kainate. *Brain Res* 1994;658:209–18.
76. Armentero MT, Fancellu R, Nappi G, Bramanti P, Blandini F. Prolonged blockade of NMDA or mGluR5 glutamate receptors reduces nigrostriatal degeneration while inducing selective metabolic changes in the basal ganglia circuitry in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2005.
77. Morari M, Marti M, Sbrenna S *et al.* Reciprocal dopamine-glutamate modulation of release in the basal ganglia. *Neurochem Int* 1998;33:383–97.

78. Wisden W, Seeburg PH. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci* 1993;13:3582–98.
79. Bureau I, Bischoff S, Heinemann SF, Mulle C. Kainate receptor-mediated responses in the CA1 field of wild-type and GluR6-deficient mice. *J Neurosci* 1999;19:653–63.
80. Mulle C, Sailer A, Pérez-Otaño I *et al.* Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* 1998;392:601–05.
81. Nvue R, Gorianov V, Best N, Sundstrom LE, Pringle AK. Time window and pharmacological characterisation of kainate-mediated preconditioning in organotypic rat hippocampal slice cultures. *Neurosci Lett* 2004;367:365–68.
82. Eyigor O, Centers AP, Jennes L. Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 2001;434:101–24.
83. Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ. Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J Comp Neurol* 1994;349:85–110.

EKLER

EK-1: Kısaltmalar

3N: okulomotor nukleus,

3V: 3rd ventrikül,

AMPA: α -amino-3-hidroksi-5metil-4-izoazolpropionik asit

Aq: Akuaduktus serebri,

CA1: Hippokampusun CA1 bölgesi

chp: Koroid pleksus,

Cy3: Cyanine Dye3

D3V: dorsal 3rd ventrikül,

DA: Dopamin

FITC: fluorescein isothiocyanate

fr: fasikulus retrofleksus,

GABA: gamma-aminobutyric acid

GLU: glutamat

GluR: glutamat reseptör

GP: globus pallidus

IPF: interpedinküler fossa,

IPF: interpedunkular fossa,

KA: 2-karboksi-3-karboksimetil-4-izopropenilpirolidin (kainat)

ml: medial lemniskus

mp: mammillar pedinkül

MT: medial terminal nukleus (aksesuvar optik yolağın)

NMDA: *N*-metil-*D*-aspartat

PaR: pararubral nukleus

PBP: parabrakial pigmentli nukleus (VTA'nın)

PIF: parainterfasikular nukleus (VTA'nın)

PN: paranigral nukleus (VTA'nın),

PR: prerubral alan,

RMC: red nukleus, magnosellüler bölüm
RPC: red nukleus, parvisellüler bölüm
scp: superior serebellar pedinkül
SN: substantia nigra
SNC: substantia nigra, pars kompata
SNCD: substansiya nigra pars kompakta, dorsal bölüm
SNCM: substansiya nigra pars kompakta medial bölüm
SNCV: substansiya nigra, pars kompakta ventral bölüm
SNL: substansiya nigra, lateral bölüm
SNR: substansiya nigra pars retikülata
MSS: merkezi sinir sistemi
STN: subthalamic nucleus
TH: tirozin hidroksilaz
tth: trigeminotalamik yolak,
VTA: ventral tegmental alan
VTAR: ventral tegmental alan rostral bölüm,
vtgd: ventral tegmental çaprazlaşma.

EK-2: Çalışmada kullanılan solüsyonların hazırlanışı

Tris tamponu (0,05M)

Trizma base (Merck, Cat. No: 108387) 6 g
Distile su 1000 ml
Konsantre hidroklorik asit ile pH 7.6' ya ayarlanır.

Bloklayıcı serum

Normal at serumu (Sigma, Cat. No: H1138) 100 ml
Sodyum azid (BDH, Prod. No: 30111) 1 g
Triton X-100 (BDH, Prod. No: 43700) 2 ml
Tris tamponu ile 1 lt' ye tamamlanır.

ABC Solüsyonu

Tris tamponu 5 ml
A solüsyonu 100 µl
B solüsyonu 100 µl

DAB Solüsyonu

Tris tamponu 100 ml
DAB (Sigma, D5637) 50 mg
Hidrojen peroksit (% 35) 5 µl
DAB oda sıcaklığındaki Tris tamponu ile hazırlanır.
Hidrojen peroksit kullanmadan hemen önce eklenir.

%4 Paraformaldehit Fiksatif

1. 150 ml distile su içinde 40 g paraformaldehit (Merk, Cat. No: 104005) magnetik karıştırıcı ve ısıtıcı üzerinde 58°C' ye kadar ısıtılarak çözülür.
2. Sıcaklık kesilir. 10 ml 1 N sodyum hidroksit ilave edilir. Karıştırılarak berraklaşması sağlanır.
3. Filtre kağıdı ile süzülür.
4. Fosfat tamponu ile 1 lt' ye tamamlanır.

5. 1 N NaOH ya da konsantre HCl ile pH 7.4' e ayarlanır.

Sorenson'un Fosfat Tamponu

Solüsyon A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.13 M), (Merk) 46.54 g/lt

Solüsyon B: KH_2PO_4 (0.13 M), (Merk) 17.68 g/lt

Her iki solüsyon buzdolabında saklanır. Solüsyon A üzerine solüsyon B eklenerek pH 7.4' e ayarlanır.

Kriyoprotektan

0.05 M Tris tamponu 500 ml

Sükroz (BDH, Prod. No: 302997) 300 g

Etilen glikol (BDH, PROD. No: 282966) 300 ml

Polivinilprolidon (Amresco, Cat. No: 1512B22) 10 g

Distile su ile 1 lt' ye tamamlanır. Maddeler verilen sıraya göre eklenir.

TEŞEKKÜR

Tezimi hazırlarken tüm bilgi ve deneyimi ile yardımcı olan hocam Doç.Dr. Fatma Zehra Minbay'a, tüm uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve desteklerini esirgemeyen Prof.Dr. Şahin A. Sırmalı, Prof.Dr. Zeynep Kahveci, Prof.Dr. Semiha Noyan, Prof.Dr. İlkin Çavuşoğlu, Doç.Dr. Özhan Eyigör ve Yrd.Doç.Dr. Berrin Avcı'ya, Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden Veteriner Hekim Faruk Küçükyıldız ve diğer görevli personele, deneklerin hazırlanması ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Dr. Münevver Kızılay ve Teknisyen Dilek Öztürk'e, her zaman sabırla yanımda olan eşime ve aileme teşekkür ederim.

Dr. Fulya TOSUN

ÖZGEÇMİŞ

09.11.1971 tarihinde Bursa' da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Bandırma' da tamamladıktan sonra 1988 yılında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesine girdim. 1995 yılında mezun olduktan sonra özel bir firmada işyeri hekimliği ve Develi 1 no'lu Sağlık Ocağı'nda pratisyen hekimlik yaptım. Ağustos 2003'de Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji AD'da uzmanlık eğitimime başladım. Uzmanlık eğitimim süresince katılmış olduğum kurs, bilimsel toplantı ve bilimsel yayınlar aşağıda belirtilmiştir.

Evliyim, iki çocuğum var. İngilizce biliyorum.

Bildiriler

1. Eyigör O, Orcan G, Tosun F. Evidence for the involment of non–NMDA glutamate receptors in the regulation of subfornical organ neurons. 4th Asian–Pacific International Congress of Anatomists, 7–10 September 2005, Kuşadası.
2. Tosun F, Minbay Z. Orta Beyindeki Dopaminerjik Nöronlarda Kainat Reseptör Alt Birimlerinin Ekspresyonu. VII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 18–21 Mayıs 2004, Malatya.
3. Eyigör Ö, Minbay FZ, Tosun F. Sıvı metobalizmasında etkili nöroendokrin sistemlerde glutamaterjik inervasyon: İmmünohistokimyasal çalışma (Poster bildirisi). IX. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi Adana.
4. Tosun F, Minbay FZ, Çavuşoğlu İ. Substansia Nigra Dopaminerjik Nöronlarında Kainat Reseptörlerinin Ekspresyonu: İkili İmmunohistokimyasal Çalışma. (Poster Bildirisi) IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi Adana.

Projeler

1. Substantia nigradaki dopaminerjik nöronlara glutamaterjik sistemin etkileri. TÜBİTAK 106S029 (SBAG–3307) no'lu proje. Yardımcı Araştırmacı.

2. Hipotalamik Nöroendokrin Nöronların Düzenlenmesinde Glutamaterjik Sistemin Rolü. TÜBİTAK 104S286 (SBAG-K-74) no'lu proje. Yardımcı Araştırmacı.

Bilimsel Toplantı ve Kurslar

1. Bilimsel Araştırma Kursu-1, 6 Mart 2004, BURSA.
2. Deney Hayvanı Bakımı ve Sertifikasyon Kursu, 26-27 Mart 2004, BURSA.
3. VI. Stereolojik Metodlar ve Uygulamaları Kursu, 11-14 Ekim 2004, ISPARTA.
4. Temel Hücre Kültürü Tekniklerinin Tanımlanması ve Pratik Uygulaması Kursu, 28-30 Ocak 2005, ANKARA.
5. İleri Moleküler Hücre Biyolojisi Teknikleri Uygulamalı Eğitim Kursu, 9-13 Mayıs 2005, GEBZE.
6. Travmalı Hastaya Yaklaşım Kursu, 10-11 Kasım 2005, BURSA.
7. Temel ve İleri Yaşam Desteği Kursu, 15-16 Kaim 2005, BURSA.
8. VII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 18-21 Mayıs 2004, MERSİN.
9. VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 Haziran 2006, MALATYA.