

# Nucleus pedunculopontinus tegmenti'de nörokimyasal özelliklerin gelişimsel olarak incelenmesi

Developmental investigation of neurochemical features in tegmental pedunculopontine nucleus

Özlem KIRAZLI, Ümit Süleyman ŞEHİRLİ

## ÖZET

**Amaç:** Kaudal tegmentumda yerleşimli, sınırları belirsiz bir beyin sapı nükleusu olan nucleus pedunculopontinus (PPN), lokomotor hareketlerin oluşumunda ve kontrolünde rol oynar. Bunun yanı sıra, PPN, uyku/uyanıklık, davranış, öğrenme ve dikkat ile de ilişkilendirilmiştir. PPN içinde kolinerjik glutamaterjik, dopaminerjik, nöradrenerjik ve GABAerjik nöronlar tanımlanmıştır. PPN son dönemlerde Parkinson hastalığının aksial semptomlarının tedavisi için potansiyel bir hedef haline gelmiştir. Protein sentezi ve salınımı sırasında gerek duyulan önemli bir molekül olan kalsiyum bağlayıcı protein ailesi üyesi kalbindin, nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Amacımız, bu çalışma ile GABAerjik ve glutamaterjik nöronlarla yakından ilişkili olan kalbindinin PPN'de gelişimsel olarak sentezlenme farklılıklarını incelemektir.

**Gereç ve Yöntem:** PPN sınırları, içerdiği kolinerjik nöronlara göre tanımlanmıştır. Kalbindin, glutamaterjik ve GABAerjik nöronlardan sentezlenir. Wistar sıçanlar doğumlarının 7.gün, 14. gün ve 21. günlerinde alınarak % 4'lük paraformaldehit ile transkardiyak perfüze edilip, beyinleri çıkarılmıştır. 40 µm'luk kesitler mikrotom kullanılarak alınmış ve kesitlere immunohistokimyasal anti kolinasetil transferaz boyama ile kalbindin boyama uygulanmıştır. Çalışmamızda, her bir hayvan grubu için 4'er tane olmak üzere 12 sıçan kullanılmıştır. 7 gün, 14 gün ve 21 günlük sıçanların PPN nükleusuna ait kalbindin pozitif nöronlarının sayı, lokasyon ve nükleus çapları araştırılmıştır.

**Bulgular:** Ortalama nöron sayıları 7 günlük hayvan için 30±3, 14 günlük hayvan için 11±1 ve 21 günlük hayvan için 150±50 olarak sayılmıştır. Nöron sayıları açısından 7. ve 14. günler ile 14 ile 21. günler arasında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (p=0,0075 ve p=0,0343). Nöron çapları 7. günde 13±1,4 µm ;14.günde 11±1,6 µm ve 21. günde 13,5±1,1 µm olarak ölçülmüştür.

**Sonuç:** Bu çalışma, PPN'deki gelişimsel farklılıkların ortaya çıktığı kritik dönemin yukarıda belirtilen zaman aralığında olduğunu göstermiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarını destekleyip, katkı sağlamaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Nucleus pedunculopontinus tegmenti, Kalbindin, GABAerjik, Kolinerjik

## ABSTRACT

**Objective:** Pedunculopontine nucleus (PPN) is a brainstem nucleus with an obscure border and located in the caudal tegmentum. In recent years, the numbers of studies related to PPN have been increasing due to its role in sleep/waking, in behavior, learning, and attention as well as its role in generation and control of locomotion. Besides cholinergic neurons, there are GABAergic, glutamatergic, dopaminergic and noradrenergic neurons in the PPN. Recently, the PPN has been a target for treatment of axial symptoms in Parkinson disease (PD). Calbindin, a member of the calcium binding protein family, which is an important molecule during protein synthesis has been related to neurodegenerative diseases. In our study, we investigated the developmental differences of calbindin expression which is related to GABAergic and glutamatergic neurons.

**Materials and Methods:** The borders of the PPN were determined on the basis of the distribution of cholinergic neurons. Calbindin is expressed by GABAergic and glutamatergic neurons. Wistar rats aged 7, 14 and 21 days were perfused through the heart with a 4% paraformaldehyde solution. Brains were removed and 40 µm plane of sections were cut via microtome. Free-floating slices were stained with anti choline acetyltransferase and calbindin. In our study, we used 4 rats for each group, totally 12 rats were utilized. The number, location and diameters of calbindin positive neurons in PPN were evaluated in 7, 14 and 21 day-old rats.

**Results:** The mean numbers of neurons were 30 ±3 at 7 days, 11 ±1 at 14 days and 150±50 at 21 days rats. There were statistically significant differences between 7 and 14 days and 14 and 21 day-old rats (p=0.0075 ve p=0.0343 respectively). The diameters of the neurons were 13 ±1.4 µm at 7 days, 11±1.6 µm at 14 days; 13.5±1.1µm at 21days.

**Conclusion:** This study indicates that critical developmental changes in PPN occur between these intervals. These findings support and contribute to the findings of previous studies.

**Keywords:** Tegmental pedunculopontine nucleus, Calbindin, GABAergic, Cholinergic

## Giriş

Tegmentumun kaudal kısmında yerleşmiş olan nucleus pedunculopontinus (PPN), kolinerjik ve nonkolinerjik nöronlardan oluşmaktadır [1]. Locomotor hareketlerin oluşumunda ve kontrolünde rol oynadığı bilinen PPN

Özlem Kirazlı (✉), Ümit Süleyman Şehirli  
Anatomi Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Marmara Üniversitesi, Başbüyük,  
Maltepe, İstanbul, Türkiye  
e-mail:ozlemsarioz@msn.com

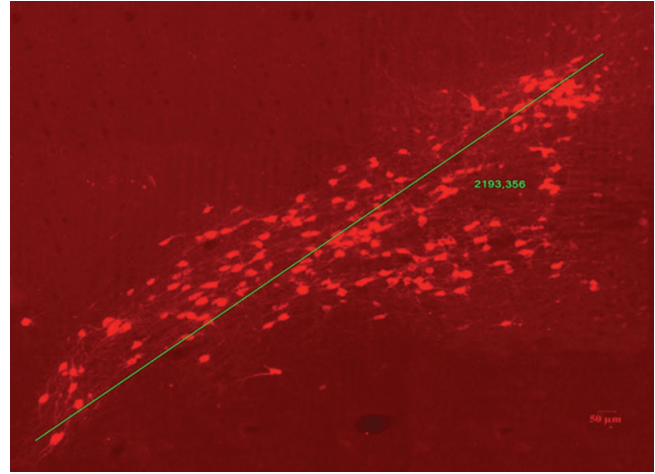
basal çekirdeklerin yanı sıra farklı beyin bölgeleri ile de yoğun bağlantılar içermektedir [2]. Son yıllardaki çalışmalar, PPN'e olan ilginin arttığını göstermektedir. Bu ilgi, PPN'in bazı motor hareketlerin oluşmasıyla ilişkili olabileceğinin öne sürülmesi ile başlamıştır [3]. Parkinson hastalığında görülen akinezi tedavisinde, derin beyin stimülasyonu uygulanan bir çekirdek olması da klinik önemini arttırmıştır [4].

PPN kama şeklinde bir nükleus olup, substantia nigra pars reticulata (SNr)'dan pedunculus cerebelli superior'a doğru dorsokaudal olarak uzanır ve rostral ucu, nucleus ruber'in hemen altında, substantia nigranın dorsalinde bulunup, kaudale doğru locus coeruleus seviyesine devam eder [5].

PPN'den gelen basal ganglia'nın çeşitli kısımlarını inerve eden glutamaterjik ve GABAerjik afferentleri olduğu gösterilmiştir. PPN, SNr ve globus pallidus'un iç kısmına (Gpi), substantia pars compacta (SNc) ile bağlantıları mevcuttur [6,7]. Bu nöronlar glutamat ve asetilkolin içerir [8]. Nucleus subthalamicus (STN) ve sıçanda insandaki Gpi'ye denk gelen entopedunkular çekirdeklerdeki kolinerjik sonlanmaların PPN'den kaynaklandığı ve glutamat içerdiği düşünülmektedir [9]. Mena-Segovia ve ark. [10] PPN'den area tegmentalis ventralis (VTA)'e glutamaterjik ve GABAerjik projeksiyonların varlığını göstermişlerdir. Bunun yanı sıra STN'de ve VTA'daki dopaminerjik nöronların PPN'den gelen kolinerjik terminallerden uyarı (input) aldığı gösterilmiştir [11,12].

PPN'a basal ganglia'dan (SNr, Gpi) gelen liflerin PPN'ye GABAerjik ileti sağladıkları düşünülmektedir. Nigral GABAerjik afferentler glutamaterjik olduğu sanılan nonkolinerjik ve daha az miktarda kolinerjik nöronlarla bağlantıları içerir. SNr ve Gpi ile iki yönlü bağlantılarını gösteren çalışmalar mevcuttur. STN'ye glutamaterjik bağlantıları gösterilmiştir. Basal ganglia'nın çıkış (output) çekirdeklerinin PPN nöronlarını doğrudan veya indirekt yoldan etkilediği düşünülmektedir PPN'nin korteks-basal ganglia-talamokortikal döngüdeki rolünün hala araştırılması gerektiği düşünülmektedir [2].

Kalsiyum bağlayıcı proteinlerin pek çok türünün sinir sistemi içinde var olduğu bilinmektedir [13-15]. Kalsiyum nörotransmitterlerin sentezi, membran geçirgenliği enzim aktiviteleri, aksonal taşınım, nöronal uyarım gibi fizyolojik olayların gerçekleşmesinde hayati öneme sahip bir moderatördür. Kalsiyum bağlayıcı proteinler ailesi içinde parvalbumin, kalretinin, kalbindin gibi proteinlerin de bulunduğu 240 adet proteinden oluşur. Kalbindin (D-28K and D-9K) ağırlığında ve vitamin D'ye bağlı olarak sentezlenen bir proteindir [16].



Şekil 1. Kolinasetil transferaz boyama yapılan PPN görüntüsü

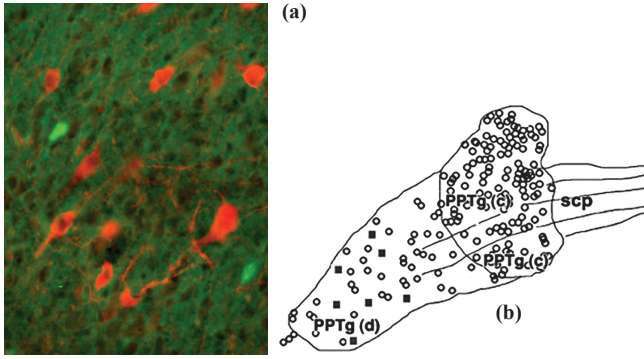
Kalbindin D-28k, öncelikle uzun aksonlu nöronlar ile talamik projeksiyon nöronları, strionigral nöronlar, basal nöronlar, Meynert nöronları, beyincik Purkinje hücreleri, geniş omurilik, retinal, kohlear ve vestibular ganglion hücreleri ile ilişkilidir. Bununla birlikte kısa aksonlu hücreler ile omurilik internöronları ve serebral korteks internöronlarında da bulunur. Kalbindin D-28k içeren hücrelerin çoğu nörodegeneratif hastalıklara daha yatkın olduğu belirtilmektedir [17].

Kalsiyum bağlayıcı proteinlerin, maymun [18] ve sıçanda [19] PPN nöronları tarafından sentez edildiği gösterilmiştir. Bir başka çalışma, kalretinin ve kalbindinin sıçan PPN'indeki kolinerjik nöronların sayısına benzer nöronlarca sentez edildiklerini [20] ortaya koymuştur. Martinez-Gonzales ve arkadaşları, kolinerjik nöronlarca nadiren sentez edilseler de yaygın olarak GABAerjik ve glutamaterjik nöronlarca sentezlenmeleri, GABAerjik ve glutamaterjik nöronların alt gruplarının olabileceğini göstermişlerdir [21].

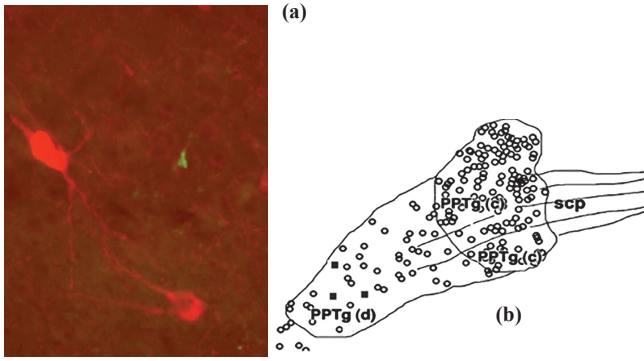
Bu çalışma ile amacımız, GABAerjik ve glutamaterjik nöronlarla yakından ilişkili olan kalbindinin, salınım farklılıklarını PPN'de gelişimsel olarak incelemektir.

## Gereç ve Yöntem

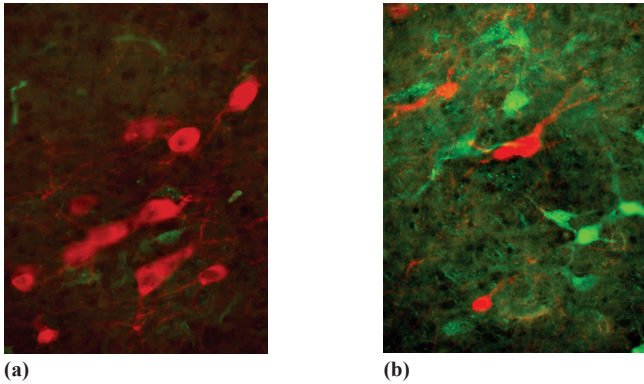
Marmara Üniversitesi, Deneysel Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkez'inden temin edilen Wistar sıçanlar, her grupta n=4 olacak şekilde doğumlarının 7.gün, 14.gün ve 21.günlerinde çalışmaya dahil edilmişlerdir. %4'lük paraformaldehit ile transkardiyak perfüze edilip, beyinleri çıkarılmıştır. Bir gecelik postfiksasyon sonrasında %30'luk sükröz solüsyonu içerisinde saklanmışlardır. 40µm'lik kesitler mikrotom kullanılarak alınmış ve kesitlere immunohistokimyasal boyamalar uygulanmıştır.



Şekil 2: 7 günlük sıçan PPN 'inde boyanmış kolinerjik ve CB + nöronlar (a)  
CB + Nöronların nükleus içerisindeki rostral yönelimli dağılımları (b)



Şekil 3: 14 günlük sıçan PPN 'inde boyanmış kolinerjik ve CB + nöronlar (a)  
CB + Nöronların nükleus içerisindeki rostral yönelimli dağılımları (b)



Şekil 4: 21 günlük sıçan PPN 'inde boyanmış kolinerjik ve CB + nöronlar (a-b)  
CB + Nöronların nükleus içerisindeki homojen dağılımları (c)

Çalışmamızda, her bir hayvan grubu için 4'er tane olmak üzere 12 sıçan kullanılmıştır.

Mikrotom vasıtasıyla alınan 40µm'lik kesitler salin fosfat (phosphate buffered saline (PBS)) tamponu içerisinde 3x10 dakika yıkanmıştır. 1/500 oranında seyreltilmiş antikolinasetiltransferaz antikoru (Milipore AB144P) ile eşek serumu içeren PBS solüsyonunda oda ısısında 1 gece bekletilmiştir.

Ertesi gün 3x10 dakika PBS ile yıkanmıştır. 1/400'lik Donkey anti-goat IgG Cy3 (Milipore AP180C) sekonder antikoru ile oda ısısında 2 saat bekletilmiştir. Olympus BX51 model floresan mikroskop ile kolinerjik boyanan hücreler uygun filtre (UMWG2) ile bakılarak PPN'in sınırları belirlenmiştir (Şekil 1).

Ertesi gün, kesitler yine 3x10 dakika PBS ile yıkanmıştır. Kolinerjik boyama yapılan kesitlere kalbindin monoklonal antikoru ile ikincil boyama yapılmıştır. 1/500 oranında kalbindin D-28K (Santa-Cruz Biotechnology CB955) birincil antikoru ile eşek serumu içeren PBS solüsyonunda oda ısısında 1 gece bekletilmiştir. Ertesi gün, 3x10 dakika PBS ile yıkanmıştır. 10 mg/ml Alexa Fluor 488 Donkey anti Mouse IgG (invitrogen A21202) sekonder antikoru ile oda ısısında 2 saat bekletilip, 3x10 dakika PBS ile yıkanmıştır. Kesitler, jelâtinli lamlar üzerinde fırça yardımı ile alınıp, kurumaya bırakılmıştır. Flouromount DPX ile lamlar kapatılmıştır.

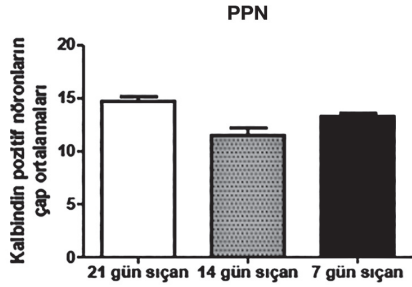
Olympus BX51 model floresan mikroskop ile kolinerjik boyanan hücreler uygun filtre (UMWG2) ile bakılarak PPN'in sınırları belirlenmiştir. Belirlenen bu sınırlar içindeki bölgede uygun filtre (UMWIBA3) kullanılarak kalbindin pozitif boyama gösteren hücreler tespit edilip, X40'luk objektifte fotoğraflanarak; nöron tipleri, nükleus içindeki boyanma alanları ve nöron çapları kaydedilmiştir. 7 günlük sıçanlarda ortalama 8 kesit, 14 günlük sıçanlarda 15 kesit, 21 günlük sıçanlarda ise 21 kesit sayılmıştır. PPN kamaya benzer bir nükleus olduğundan her kesitte sayılan alan eşit değildi. Ortalama 7 günlük bir sıçanda 0,467 mm<sup>3</sup>, 14 günlük bir sıçanda 0,672 mm<sup>3</sup> ve 21 günlük bir sıçanda 0,848 mm<sup>3</sup> nükleus hacmi sayıldı. Çalışmamız için Etik Kurul'un onayı alınmıştır. Veriler unpaired t - test analiz programı kullanılarak karşılaştırılmıştır.

## Bulgular

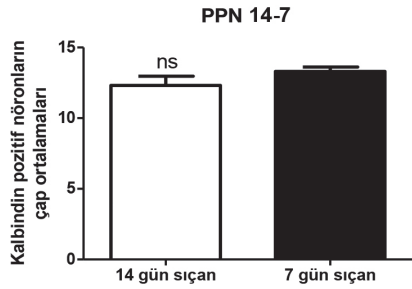
### 7 günlük Sıçanda İmmunohistokimyasal Boyanmalar

Kalbindin sentezleyen hücrelerin gelişimsel süreçteki değişimlerini incelediğimiz çalışmamızda gruplar arasındaki nöron çap ortalamalarına bakıldığında 7 -21. ve 14 - 21. günlerdeki sıçanların nöron çap ortalamaları arasında unpaired t-testine göre anlamlı bir farklılık gözlenmiştir (sırasıyla p=0,01 ve p=0,0001) (Şekil 5-8).

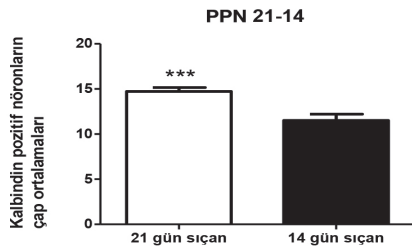




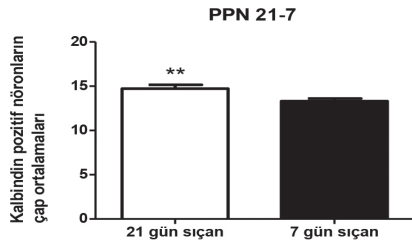
Şekil 5. 7, 14 ve 21 günlük sıçanların nöron çaplarının karşılaştırılması



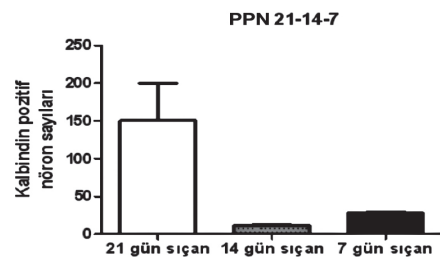
Şekil 6. 7 ve 14 günlük sıçanların nöron çap ortalamaları arasında unpaired t-testine göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p=0,1262)



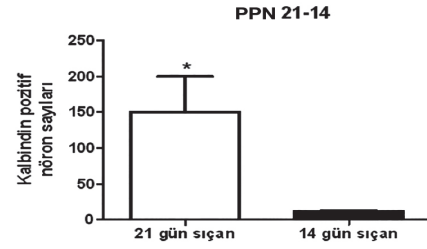
Şekil 7. 14 ve 21. günlerdeki sıçanların nöron çap ortalamaları arasında unpaired t-testine göre anlamlı bir farklılık gözlenmiştir (p=0,0001).



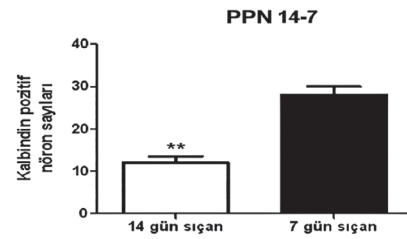
Şekil 8. 7 ve 21 günlük sıçanların nöron çap ortalamaları arasında unpaired t-testine göre anlamlı bir farklılık gözlenmiştir (p=0,01).



Şekil 9. 7, 14, ve 21 günlük sıçanların PPN bölgesinde bulunan kalbindin pozitif nöron sayıları karşılaştırılması



Şekil 10. 14 ve 21 günlük sıçanların PPN bölgesinde bulunan kalbindin pozitif nöron sayıları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmiştir (p=0,0343).



Şekil 11. 7 ve 14 günlük sıçanların PPN bölgesinde bulunan kalbindin pozitif nöron sayıları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmiştir (p=0,0075).

7 ve 14 günlük sıçan PPN'inde boyanmış kolinerjik ve rostral yönelimli CB + nöronlar Şekil 2 ve Şekil 3'de gösterilmiştir. 21 günlük sıçan PPN'inde boyanmış kolinerjik ve homojen dağılımlı CB + nöronlar ise Şekil 4'de gösterilmiştir.

Beyin kesitlerinde yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda 7 - 14 ve 14 - 21 günlük sıçanların PPN bölgesinde bulunan kalbindin pozitif nöron sayıları karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmiştir (sırasıyla p=0,0075 ve p=0,0343). (Şekil 9-11) 7. - 14. günler arasında nükleus hacmi %43 artarken nöron sayısında %53 oranında düşüş gözlenmiştir. 14.- 21. günler arasında ise hacim artışı %79 iken, nöron sayısındaki artışın %90 oranında olduğu bulunmuştur.

## Tartışma

Kolinerjik ve nonkolinerjik nöron gruplarına sahip olan PPN'de kalbindin miktarının gelişimsel olarak arttığı ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Nöron sayısındaki değişimlerin, gelişimsel olarak farklı özelliklerin ortaya çıktığı günlerle paralellik göstermesi anlamlıdır.

Kevin ve arkadaşları postnatal 12 ve 21.günler arasında PPN nöronlarını alpha -2 adrenerjik inhibisyonu ile alt gruplara ayırıp, hızlı göz hareketi (rapid eye movement (REM)) uykusunun düşüş gösterdiği günlerdeki nöron tiplerini tanımlamaya çalışmışlardır [25]. Christen Simon ve arkadaşları ise REM uykusunun düşüş gösterdiği 9-17. günlerdeki glutamat receptör alt tiplerini ortaya

çıkarmışlardır [26]. Glutamaterjik ve GABAerjik kökenli olduğu bilenen kalbindin pozitif nöronların gelişimsel olarak 7, 14 ve 21. günler arasındaki değişimin incelenmesi REM uykusundaki düşüşün açıklanmasında anlamlı ipuçları verebilecektir.

PPN üzerinde yaptığı elektrofizyolojik REM uykusu çalışmalarında, Jouvet-Mounier sıçanlarda 10 ile 30. postnatal günler arasında REM uykusunda düşüş meydana geldiğini, bu düşüşün büyük kısmı 12 ile 21. günler arasında gerçekleştiğini bulmuştur [27]. Garcia Rill ise major değişikliğin 10 ile 15. günler arasında olduğunu savunmuştur [28]. Çalışmamızda, kalbindin boyanan hücre sayısında artış 14-21. günlük sıçanlarda görülmüştür. Bu bulgu da gelişimsel süreçte REM uykusunda düşüşün görüldüğü günlerdir. Bu nedenle, PPN'de işaretlenen kalbindin ile REM uykusu arasında bir ilişki olabileceği düşünülebilir.

REM uykusunu ve uyanıklığı düzenleyen retiküler aktive edici sistemin kolinerjik parçası olan PPN'in uyarılması REM uykusunu artırırken [29], PPN lezyonları da REM uykusunu düşürmüştür [30]. REM uykusundaki düşüşü gelişimsel farklılıklar ile açıklamaya çalışan Garcia-Rill ve arkadaşlarının çalışmasında PPN nöronları gelişimsel dönem boyunca GABA agonisti muskimol ( $GABA_A$  reseptörüne spesifik) ve yine GABA agonisti baklofen ( $GABA_B$  reseptörüne spesifik) ile module edilmiştir. Sonuçta, REM uykusunda meydana gelen gelişimsel düşüş boyunca  $GABA_A$  reseptörünün aktivasyonu ile eksitasyondan inhibisyona doğru kayan bir tablo ortaya çıkmaktadır.  $GABA_B$  reseptörü ise daha az göze çarpan bir inhibitördür [25]. Gelişimin erken dönemlerinde 12. ve 16. günler arasında  $GABA_A$  reseptörünün aktivasyonu PPN nöronlarının depolarizasyonuna ve REM uykusundaki gelişimsel düşüş süresi olan 17-21. günlerde hiperpolarizasyona sebep olmaktadır.

PPN, diğer mesopontin nükleuslardan glutamaterjik lifler almaktadır. Glutamaterjik liflerin, uyarılma durumlarının oluşumuyla yakın ilişkili olduğuna inanılmaktadır. Christen Simon ve arkadaşlarının yeni yayınladıkları çalışmada postnatal 9 ile 17. günler arasındaki glutamat reseptörlerinin alt tiplerindeki gelişimsel değişikliklerin PPN nöronlarının cevaplarına katkısı olup olmadığı araştırılmıştır. PPN hücre tiplerinin glutamaterjik eksitabilitesindeki değişiklikler REM uykusundaki gelişimsel düşüşün temelini oluşturur [26].

Ninomiya ve arkadaşlarının 2005 yılında kolinerjik nöronların gelişimini inceledikleri çalışmada 14 ve 21. günler arasında nükleusların çaplarının arttığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda 14. günde nöron çapı yaklaşık 12  $\mu$ m iken 21. güne geldiğinde 15  $\mu$ m olarak

ölçülmüştür. Genel olarak 14 ve 21. günler arasında nöron çaplarında artış meydana geldiğini söyleyebiliriz.

Uyanıklık ve REM uykusu ile ilişkili olduğu gösterilmiş olan PPN nöronları, uyanıklık sırasında tonik, REM uykusu sırasında tonik ve burst, yavaş dalgalı uykuda ise azalan aktivite gösterirler [31]. Kobayashi ve arkadaşları postnatal 12- 21. günlük sıçanlarda PPN nöronlarında meydana gelen nörokimyasal değişiklikleri incelemişlerdir. Bu çalışma, hücresel düzeyde uyku/ uyanıklık siklusu ve uyarılma ile ilgili gelişimsel bilgiler sunmuştur. Bu bilgiler doğrultusunda, PPN'e gelen glutamaterjik ve serotonerjik liflerdeki gelişimsel düzensizliğin REM uykusundaki düşüşe yol açtığı hipotezini ortaya koymuşlardır [32]. Temel olarak, yenidoğanda REM uykusu temel uykunun %50 seviyesindeyken (yaklaşık 8 saat ), yetişkinde temel uykunun % 15'ini oluşturmaktadır (yaklaşık 1 saat). REM uykusundaki bu ana düşüş, doğum ile ergenlik dönemi arasında olur. Sıçanda ise gelişimsel düşüş 10. ile 30. günler arasında olmaktadır. Sıçanda bu dönemdeki REM uykusu toplam uykunun %70'i oranından %15'e düşmektedir. Bilim adamlarına göre gelişimsel dönemdeki bu düzensizlik araştırılıp uyku inhibitör sürecine ilişkin tedavi uygulanabilirse REM uykusu bozukluğuna bağlı, anksiyete, sizofreni, bipolar ve unipolar depresyon gibi hastalıklar üzerinde olumlu sonuçlar elde edilebilir [33].

Kobayashi ve arkadaşları düşüşün olduğu dönemi, 12.- 21. günler arasındaki sıçanlara glutamat enjekte ederek açıklamaya çalışmışlardır. Glutamat, N-metil-D-aspartik asit (NMDA) ve kainik asit, glutamat reseptörlerini aktif hale geçirir. NMDA uyanıklığın sağlanmasında etkin rol oynarken, kainik asit ise REM uykusuna geçişi sağlar. Uyanıklığın sağlanmasında etkin olan NMDA başlangıçta yüksek uyarılara cevap verirken zamanla daha düşük uyarılara cevap verir, uyku durumuna geçişte etkin olan kainik asit ise başlangıçta daha düşük uyarılara cevap verirken, zamanla daha yüksek seviyede uyarılara cevap vermektedir. Böylece, NMDA daha etkin olmaya başlayacağından uyanıklık durumu gerçekleşir. Bu kritik düşüşün 15 ve 16. günler arasında başladığı gözükmemektedir [32]. İnsanda, REM uykusu bozukluğuna bağlı, anksiyete, sizofreni, bipolar ve unipolar depresyon gibi hastalıkların ortaya çıktığı dönemin 15- 25 yaşlar arasında olduğu ve ergenlik dönemine rastladığı göz önüne alınırsa ve bu dönemde insanda da REM uykusunun azaldığı dönem olması anlamlıdır.

Beyinin, hipokampus [34], korteks [35] ve bazal ganglia [36] gibi farklı bölgelerindeki nöronlar, kalsiyum bağlayıcı proteinler sentezlemektedirler. Bu sayede aynı nörotransmitteri kullanmalarına rağmen farklı fonksiyonel özelliklere sahip olmaktadır ve kalsiyum bağlayıcı

proteinler ile nöronlar çeşitli alt gruplara ayrılabilirlerdir. Kalsiyum bağlayıcı proteinlerin varlığı maymun [18,23] ve sıçan PPN'inde [19] gösterilmiştir. Aslında sıçan PPN'indeki kolinerjik nöronların sayısı ile kalbindin ve kalretinin eksprese eden nöronların sayısı hemen hemen aynıdır [20].

Kalsiyum bağlayıcı proteinler yaygın olarak GABAerjik ve glutamaterjik nöronlarda sentezlenmeleri yanında nadir olarak kolinerjik nöronlarda sentezlenebilirler. GABAerjik ve glutamaterjik nöronların fonksiyonel alt tiplerini ortaya koyarlar [21]. Bizim çalışmamızda, asetilkolin ve kalbindin koekspresyonu gözlenmedi.

Seto-Ohshima, 2003 yılında Huntington hastalığından (HD) ölen kişilerin beyinlerinde yaptığı çalışmada neostriatum bölgesindeki kalbindin içeren nöronların önemli derece azaldığını bulmuş ve kalsiyum mekanizmasının HD üzerinde etkili olabileceğini savunmuştur [22]. Côté ve Parent, 2003 yılında yaptıkları çalışmada, maymunlarda PPN ve nucleus basalis'teki kolinerjik nöronların ikili immunhistokimyasal boyama yaparak kalbindin varlığını incelemişler, sonuçta PPN'deki kolinerjik nöronların kalbindinden yoksun olduğunu, nucleus basalis'teki kolinerjik nöronların ise kalbindin içerdiğini ortaya koymuşlardır [23]. Bu sonuçlar doğrultusunda ise Alzheimer hastalığı patogenezinde rolü olmayan PPN'e rağmen nucleus basalis'in hastalığın üzerinde etkisi olmasından yola çıkarak kalbindin varlığının sadece Alzheimer hastalığı değil diğer nörodejeneratif rahatsızlıklarda da etkin olabileceğini öne sürmüşlerdir. Diğer bir kalsiyum bağlayıcı protein olan kalretinin varlığının ise Parkinson hastalığı üzerinde koruyucu etkisi olduğuna dair çalışmalar yapılmıştır [24].

Çalışmamız sırasında karşılaşılan sorunlardan birisi GABA nöronlarının geleneksel immunhistokimyasal yöntemlerle boyanmasındaki zorluklardır. Belirttiğimiz kalbindin boyanan hücre sayısı GABAerjik ve glutamaterjik nöronların toplamıdır. GABAerjik ve glutamaterjik nöronların ayrı olarak sayımlarının yapılabilmesi için in situ hibridizasyon yöntemi kullanılmalıdır. Bhagvandin'in 2013 yılında yayınladığı çalışmasında, PPN ve LDT nükleusları içerisinde kalbindin pozitif nöron sayısının düşük olduğu, fakat kalbindin pozitif terminal sayısının yüksek yoğunlukta olduğu gösterilmiştir. Bu durum çalışmamızda kalbindin pozitif nöronların az miktarda sayılmış olması açısından açıklayıcı olmuştur [37].

Literatürde, postnatal gelişim sürecinde, zamana bağlı oluşan bazı fonksiyonel değişimlerin çalışmamızdaki morfolojik değişimlerle paralellik gösterdiği söylenebilir. Bu çalışmamız sonucunda, PPN'de ilk kez kalbindin miktarının gelişimsel olarak değişimi ortaya konmuştur. Bu

çalışmanın devamı niteliğinde olacak şekilde postnatal 14 ile 21.günler arasındaki sürenin daha detaylı çalışılması, güne bağlı değişimi daha net ortaya koyabilecektir.

### Teşekkür

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından SAG-C-YLP-03110-0248 proje numarası ile desteklenmiştir.

### Kaynaklar

1. Garcia-Rill E. The pedunculopontine nucleus. *Prog Neurobiol* 1991; 36:363–89. doi:10.1016/0301-0082(91)90016-T
2. Mena-Segovia J, Ross HM, Magill PJ, Bolam JP. The pedunculopontine nucleus: towards a functional integration with the basal ganglia. In: Bolam JP, Ingham JA, Magill PJ, editors. *The Basal Ganglia VIII. Advances in Behavioral Biology. Volume 56.* New York: Springer Science and Business Media, 2005:533-44.
3. Pahapill PA, Lozano AM. The pedunculopontine nucleus and Parkinson's disease. *Brain* 2000; 123:1767–83. doi: 10.1093/brain/123.9.1767
4. Pereira EA, Muthusamy KA, De Pennington N, Joint CA, Aziz TZ. Deep brain stimulation of the pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease. Preliminary experience at Oxford. *Br J Neurosurg* 2008; 22 Suppl 1:S41-4. doi:10.1080/02688690802448335.
5. Mena-Segovia J, Micklem BR, Nair-Roberts RG, Ungless MA, Bolam JP. GABAergic neuron distribution in the pedunculopontine nucleus defines functional subterritories. *J Comp Neuro* 2009; 515:397-408. doi: 10.1002/cne.22065.
6. Semba K, Reiner PB, Fibiger HC. Single cholinergic mesopontine tegmental neurons project to both the pontine reticular formation and the thalamus in the rat. *Neuroscience* 1990; 38:643– 54. doi:10.1016/0306-4522(90)90058-C
7. Semba K, Reiner PB, McGeer EG, Fibiger HC. Brainstem afferents to the magnocellular basal forebrain studied by axonal transport immunohistochemistry, and electrophysiology in the rat. *J Comp Neurol* 1988; 267:433– 53.
8. Lavoie B, Parent A. Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: distribution of cholinergic and monoaminergic neurons in the mesopontine tegmentum with evidence for the presence of glutamate in cholinergic neurons. *J Comp Neurol* 1994; 344:190–209.
9. Clarke NP, Bevan MD, Cozzari C, Hartman BK, Bolam JP. Glutamate-enriched cholinergic synaptic terminals in the entopeduncular nucleus and subthalamic nucleus of the rat. *Neuroscience* 1997;2:371-85. doi:10.1016/S03064522(97)00247-9
10. Mena-Segovia J, Bolam JP, Magill PJ. Pedunculopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family. *Trends Neurosci* 2004;10:585-8. doi:10.1016/j.tins.2004.07.009
11. Bolam JP, Francis CM, Henderson Z. Cholinergic input to dopaminergic neurons in the substantia nigra: a double immunocytochemical study. *Neuroscience* 1991;41:483-94.

12. Garzon M, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ, Pickel VM. Cholinergic axon terminals in the ventral tegmental area target a subpopulation of neurons expressing low levels of the dopamine transporter. *J Comp Neurol* 1999;410:197-210.
13. Celio MR, Heizmann CW. Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. *Nature* 1981;293:300-2.
14. Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 1992 ;15:303-8.
15. Härtig W, Brückner G, Brauer K, Seeger G, Bigl V. Triple immunofluorescence labelling of parvalbumin, calbindin-D28k and calretinin in rat and monkey brain. *J Neurosci Meth* 1996 ;67:89-95.
16. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409:860–921.
17. Celio MR. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 1990 ;35:375-475.
18. Fortin M, Parent A. Calretinin-immunoreactive neurons in primate pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei. *Neuroscience* 1999 ;88:535-47.
19. Dun NJ, Dun SL, Hwang LL, Förstermann U. Infrequent co-existence of nitric oxide synthase and parvalbumin, calbindin and calretinin immunoreactivity in rat pontine neurons. *Neurosci Lett* 1995 26;191:165-8.
20. Martinez-Gonzalez C, Micklem B R, Bolam JP, Mena-Segovia J. Neurons containing calcium-binding proteins are topographically organized in the pedunculopontine nucleus. Program No. 845.17. 2009 Neuroscience Meeting Planner. Chicago, IL: Society for Neuroscience, 2009.
21. Martinez-Gonzalez C, Bolam JP, Mena-Segovia J. Topographical organization of the pedunculopontine nucleus. *Front Neuroanat* 2011;5:22.
22. Seto-Ohshima A, Emson PC, Lawson E, Mountjoy CQ, Carrasco LH. Loss of matrix calcium-binding protein-containing neurons in Huntington's disease. *Lancet* 1988; 1:1252-5.
23. Côté PY, Parent A. Calbindin D-28k and choline acetyltransferase are expressed by different neuronal populations in pedunculopontine nucleus but not in nucleus basalis in squirrel monkeys. *Brain Res* 1992 16;593:245-52.
24. Tsuboi K, Kimber TA, Shults CW. Calretinin-containing axons and neurons are resistant to an intrastriatal 6-hydroxydopamine lesion. *Brain Res* 2000 ; 866:55-64.
25. Bay KD, Mamiya K, Good CH, Skinner RD, Garcia-Rill E. Alpha-2 adrenergic regulation of pedunculopontine nucleus neurons during development. *Neuroscience* 2006; 141: 769–79.
26. Simon C, Hayar A, Garcia-Rill E. Responses of developing pedunculopontine neurons to glutamate receptor agonists. *J Neurophysiol* 2011;105:1918-31. doi: 10.1152/jn.00953.2010.
27. Jouvet-Mounier D, Astic L, Lacote D. Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat, and guinea pig during the first postnatal month. *Dev Psychobiol* 1970; 2: 216–39.
28. Garcia-Rill E, Charlesworth A, Heister D, Ye M, Hayar A. The developmental decrease in REM sleep: the role of transmitters and electrical coupling. *Sleep* 2008;31:673-90.
29. Thakkar M, Portas C, McCarley RW. Chronic low-amplitude electrical stimulation of the laterodorsal tegmental nucleus of freely moving cats increases REM sleep. *Brain Res* 1989; 723:223–27. doi:10.1016/0006-8993(96)00256-9
30. Webster HH, Jones BE. Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Res* 1988; 458:285–302. doi:10.1016/0006-8993(88)90471-4
31. Steriade M, Datta S, Pare D, Oakson G, Curro Dossi R. Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* 1990; 10: 2541–59.
32. Kobayashi T, Good C, Mamiya K, Skinner RD, Garcia-Rill E. Development of REM sleep drive and clinical implications. *J Appl Physiol* 2004; 96: 735–46. doi: 10.1152/jappphysiol.00908.2003
33. Kobayashi T, Good C, Biedermann J, Barnes C, Skinner RD, Garcia-Rill E. Developmental changes in pedunculopontine nucleus (PPN) neurons. *J Neurophysiol* 2004 ; 91:1470-81. doi: 10.1152/jn.01024.2003
34. Acsády L, Halasy K, Freund TF. Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus—III. Their inputs from the median raphe and medial septal nuclei. *Neuroscience* 1993;52:829-41. doi:10.1016/0306-4522(93)90532-K
35. Staiger JF, Masanek C, Schleicher A, Ziswiler W. Calbindin containing interneurons are a target for VIP-immunoreactive synapses in rat primary somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 2004;468:179-89. doi: 10.1002/cne.10953
36. Parent M, Lévesque M, Parent A. Two types of projection neurons in the internal pallidum of primates: single-axon tracing and three-dimensional reconstruction. *J Comp Neurol* 2001;439:162-75. doi: 10.1002/cne.1340
37. Bhagwandin A, Gravett N, Bennett NC, Manger PR. Distribution of parvalbumin calbindin and calretinin containing neurons and terminal networks in relation to sleep associated nuclei in the brain of the giant Zambian mole-rat (*Fukomys mechowii*). *J Chem Neuroanat* 2013;52:69-79. doi: 10.1016/j.jchemneu.2013.06.002.