

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

# Hipotalamusta İyonotropik Glutamat Reseptör Ekspresyonu: İmmunohistokimyasal Lokalizasyon Çalışması

Duygu GÖK YURTSEVEN<sup>1</sup>, Gonca TOPAL<sup>2</sup>, F. Zehra MİNBAŞY<sup>1</sup>, Özhan EYİGÖR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

<sup>2</sup> Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp-Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

## ÖZET

Merkezi sinir sisteminde (MSS) nöron fonksiyonlarının düzenlenmesinde çok çeşitli nörotransmitter madde rol oynar. Glutamat, hipotalamusta en önemli eksitator amino asit nörotransmitterlerden biri olarak yer alır ve nöronlar üzerindeki düzenleyici işlevini iyonotropik ve metabotropik olarak iki alt ailede sınıflandırılan reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirir. Glutamatın bazı nöroendokrin nöronlar üzerinde etkili olduğu yapılan elektrofizyolojik ve farmakolojik çalışmalarla belirlenmiştir. Çalışmamız kapsamında, glutamaterjik innervasyonun histomorfolojik olarak desteklediği çalışmaların bulunmaması sebebiyle hipotalamik glutamat reseptör alt birimlerine odaklanılmıştır. İyonotropik glutamat reseptör alt birimlerinden AMPA (GluA1, GluA2, GluA3, GluA4), Kainik asit (GluK5, GluK1, GluK2, GluK3) ve NMDA'nın (GluN1, GluN2A) hipotalamustaki dağılımları immünohistokimya yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Dişi sıçanların beyin dokularından vibratom aracılığıyla alınan kesitler, hipotalamik nöronlardaki glutamat reseptör alt birimlerinin varlığı ve yoğunluğu açısından değerlendirilmiştir. Çalışmada, AMPA reseptörlerinden GluA1 ve GluA2'nin yaygın olarak hipotalamusta lokalize olduğu, GluA3 ve GluA4 immünoreaksiyonunun ise çok sınırlı olduğu; kainat reseptör alt birimlerinden GluK5'in çok yaygın olduğu ve GluK1/2/3 içeren nöronların daha az sayıda olduğu, NMDA reseptör alt birimlerinden GluN1'in ise hipotalamusta yoğun olarak bulunduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışma ile hipotalamik birçok nöronun iyon spesifik iGluR kanallarını farklı miktar ve yoğunlukta eksprese edebildiği, bunun da hedef nöronların glutamat tarafından farklı şekilde düzenlenmesine izin verebileceği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Glutamat. Kainik Asit. AMPA. NMDA. Hipotalamus.

## Iontropic Glutamate Receptor Expression in the Hypothalamus: An Immunohistochemical Localization Study

### ABSTRACT

A wide variety of neurotransmitters play a role in the regulation of neuron functions in the central nervous system (CNS). Glutamate is the major excitatory amino acid neurotransmitter in the hypothalamus. Glutamate performs its regulatory function on neurons by binding to its receptors, which are classified in two subfamilies as ionotropic and metabotropic. It has been determined by electrophysiological and pharmacological studies that glutamate is effective on some neuroendocrine neurons. Due to the lack of studies supporting glutamatergic innervation histomorphologically, our study focused on hypothalamic glutamate receptor subunits. The distributions of AMPA (GluA1, GluA2, GluA3, GluA4), kainic acid (GluK5, GluK1, GluK2, GluK3) and NMDA (GluN1, GluN2A) in the hypothalamus, which are ionotropic glutamate receptor subunits, were investigated using the immunohistochemistry method. Sections taken by vibratome from brain tissues of female rats were evaluated for the presence and density of glutamate receptor subunits in hypothalamic neurons. It was determined that the AMPA receptors subunits GluA1 and GluA2 are highly expressed in the hypothalamus while the synthesis of GluA3 and GluA4 is too limited. Very high number of GluK5-immunoreactive neurons was detected, where the expression of GluK1/2/3 was moderate. GluN1A, one of the NMDA receptor subunits, was found to be densely localized in the hypothalamus. In conclusion, with this study, many hypothalamic neurons can express ion-specific iGluR channels in different amounts and intensities, which would allow a differential regulation of the target neurons by glutamate.

**Key Words:** Glutamate. Kainic Acid. AMPA. NMDA. Hypothalamus.

**Geliş Tarihi:** 20. Temmuz. 2021

**Kabul Tarihi:** 19. Ağustos. 2021

Dr. Özhan EYİGÖR  
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,  
Bursa.  
Tel.: 0224 295 40 65  
E-posta: oeyigor@uludag.edu.tr

### Yazarların ORCID ID Bilgisi:

Duygu GÖK YURTSEVEN: 0000-0003-4969-3584  
Gonca TOPAL: 0000-0003-0426-2684  
Zehra MİNBAŞY: 0000-0001-5757-8450  
Özhan EYİGÖR: 0000-0003-3463-7483

Glutamat memeli merkezi sinir sisteminde (MSS) yerleşik nöronların regülasyonunda rol alan başlıca eksitator amino asit nörotransmitterdir<sup>1</sup>. Bilinç, öğrenme ve hafıza gibi normal beyin fonksiyonların yanı sıra MSS'nin gelişiminde, sinaps iletimi ve eliminasyonu, hücre göçü, farklılanması ve ölümünde de major rol oynadığı bildirilmiştir<sup>2</sup>. Glutamat konsantrasyonunun en fazla olduğu yer sinir terminallerinin içidir<sup>3</sup>. Glutamat, presinaptik terminallerdeki veziküllerden voltaj bağımlı Ca<sup>2+</sup> kapılarının bulunduğu mekanizma ile salınır<sup>4</sup>. Glutamat sinaptik aralığa salınır salınmaz, pre- ya da post-sinaptik membrandaki reseptörlerine bağlanır ve onları aktive eder<sup>5</sup>. Glutamat aracılı nörotransmisyon, iyonotropik (iyon kanalı reseptörleri) ve metabotropik reseptörler (G-protein-bağlı reseptörler) üzerinden gerçekleşir<sup>1,6,7</sup>.

İyonotropik glutamat reseptörleri, hızlı eksitator postsinaptik potansiyel oluşturarak nöronal depolarizasyon yaparken metabotropik reseptörler, nörotransmisyonunda modülatör olarak işlev görmektedir<sup>8</sup>. İyonotropik glutamat reseptörleri, farklı glutamat agonistlerine verdikleri yanıtlar karşılaştırılarak 3 alt gruba ayrılmaktadır; Kainat (KA, 2-karboksi-3-karboksimetil-4-izopropenilpirolidin), AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5- metil-4-isoksazol propionik asit)/ quisqualate ve NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörleri<sup>9-11</sup>. Bu reseptörlerin en ilgi çekici özelliklerinden biri, memeli beyindeki ekspresyon profilleri ile alt birim kompozisyonuna dayanan kanal özelliklerinin çeşitliliğidir. AMPA reseptörleri GluA1-4, kainat reseptörleri GluK1-5 ve NMDA reseptörleri GluN1, GluN2A-D, GluN3A-B alt birimlerinden oluşur<sup>9,11</sup>. Bu alt birimler homomerik (tek bir alt birim) ya da heteromerik (birden fazla farklı alt birim kombinasyonu) olarak iyon kanalları oluştururlar ki bunlar fonksiyonel reseptör kanallarıdır<sup>12-14</sup>. Farklı reseptör grubuna ait iyon kanallarının glutamatın farklı fizyolojik etkilerinde aracı olduklarını belirleyen çalışmalar vardır<sup>15,16</sup>. Bu nedenle glutamaterjik innervasyon alan nöron gruplarında eksprese olan farklı reseptör alt birimlerinin belirlenmesi önem kazanmaktadır.

Hipotalamus farklı organların fizyolojik yanıtlarını koordine ederek homeostazın sağlanmasından sorumlu beyin bölgesidir. Bunu gerçekleştirirken dış çevreden gelen, diğer beyin bölgelerinden alınan ve viseral afferentlerle ulaşan sinyalleri entegre eder ve böylece uygun bir nöroendokrin yanıtın ortaya çıkmasını sağlar. Bunun sonucunda hipotalamus organizmanın besin ve sıvı alımı dengesi, enerji kullanımı, vücut ağırlığı, kan basıncı, susama, vücut ısısı ve uyku döngüsü gibi birçok günlük fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar<sup>17</sup>. Hipotalamik fonksiyonların gerçekleşmesinde nörosekretuar ya da nöroendokrin hücreler (nöronlar) rol alırlar. Bu nöronlara ait hücre gövdeleri hipotalamus içerisinde çok sayıda gruplar oluştururlar. Glutamatın hipotalamik nöroendokrin nöronlar üzerindeki düzenleyici etkisi bilinmektedir<sup>18</sup>.

Literatürde hipotalamik nöronların glutamat reseptörlerini eksprese ettiklerine dair raporların olmasına rağmen, bu çalışmalar glutamat reseptörlerinin tüm alt ailelerini ya da alt ailelerin her alt birimini kapsamamaktadır. Hipotalamik nöronların glutamaterjik etkileşiminde yer alma olasılığı olan reseptör alt birimlerinin tümünü kapsayan ve ayrıca hipotalamik çekirdekler özelinde lokalizasyonlarını bir bütün olarak tanımlayan bir çalışma literatürde yoktur. Bu çalışmada; hipotalamik nöronlardaki glutamat reseptör ailelerinin tüm alt birimlerinin protein düzeyindeki ekspresyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak iyonotropik reseptörlerden kainat (GluK5, GluK1, GluK2, GluK3), AMPA (GluA1, GluA2, GluA3, GluA4) ve NMDA (GluN1, GluN2A) alt birimlerinin hipotalamustaki lokalizasyonları ile hipotalamik çekirdeklerdeki yoğunlukları immünohistokimyasal yöntem kullanılarak araştırılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### *Deney Hayvanlarının Hazırlanması*

Çalışmada, 200-250 gr ağırlığında erişkin (2-3 aylık) Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar 25 °C oda ısısında, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık (07.00-19.00 arası aydınlık) dönemler şeklinde ayarlanmış ortamda tutulup, ad libitum olarak beslendi. Çalışmada kullanılan deney hayvanları, Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi'nin 19.04.2005/1 sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak kullanıldı.

### *Dokuların Hazırlanması*

Herhangi bir enjeksiyon yapılmayan 10 dişi denek, derin eter anestezisi altında 0.13 M fosfat tamponu<sup>a</sup> ile hazırlanan %4 paraformaldehitin<sup>b</sup> kullanıldığı transkardiyak perfüzyon fiksasyonu yöntemi kullanılarak sakrifiye edildi. Bu yöntemde deneklerin göğüs kafesleri açılarak kateter kalp apeksinden aortaya yerleştirildi ve sabitlendi. Deneklerin kan basıncına uygun şekilde ayarlanan perfüzyon pompasına bağlı bu kateter yardımıyla öncelikle deneklerin dolaşım sistemleri %0.9 serum fizyolojik (NaCl, 150 ml) kullanılarak temizlendi, sonrasında denek başına taze hazırlanmış 400 ml fiksatif ile perfüzyon fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Perfüzyon sonrası çıkarılarak aynı fiksatifte +4°C'de gece boyu post-fiksasyon uygulanan beyinlerden vibrotom ile 30-50  $\mu$ m'lik koronal kesitler alındı. Hipotalamusun rostra-kaudal ekseninin tamamını içerecek şekilde alınan kesitler 5 seri halinde Tris-HCl tampon solüsyonu<sup>c</sup> (pH 7.6) içine toplandı. Tris-HCl solüsyonunda 3x10 dk. yıkanarak fiksatiften arındırılan kesitler kriyoprotektan madde<sup>d</sup> içinde -20°C'de saklandı.

## Hipotalamusda Glutamat Reseptör Ekspresyonu

### İmmünohistokimyasal İşlemler

İmmünohistokimyasal işlemlerin tümü cam sintilasyon vıyallerindeki yüzen kesitlere uygulandı. İmmünohistokimya uygulaması öncesinde kesitler – 20°C'den oda sıcaklığına çıkartılarak solüsyon sıcaklığının ortam ısısına yükselmesi beklendi. Takiben, kriyoprotektan maddeden arındırılmak üzere kesitler tampon ile yıkandı. Çalışmanın tüm aşamalarında tampon madde olarak Tris-HCl solüsyonu kullanıldı. Tamponda yıkama ve inkübasyon işlemleri, orbital sallayıcı yardımı ile uygun ajitasyonla gerçekleştirildi. Kriyoprotektan arındırılan kesitlere spesifik olmayan bağlanmayı azaltmak için bloklayıcı tampon uygulandı. Çalışmada kullanılacak tüm sekonder antikorların eşekte üretilmiş olması nedeniyle bloklayıcı ajan olarak normal at serumu seçildi. Bloklayıcı tampon, Tris-HCl tamponunda, %10 normal at serumu (Sigma, Cat No: H1138, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), bakteri oluşumunu engelleyen %0.1 sodyum azid (BDH, Prod. No: 30111, BDH Laboratory Supplies, Poole, İngiltere) ve yüzey gerilimini azaltıp antikorların hücre içine girişini kolaylaştıran %0.2 Triton-X 100 (BDH, Prod. No: 43700, BDH Laboratory Supplies, Poole, İngiltere) içerecek şekilde hazırlandı. Bloklama işlemini primer antikor inkübasyonu takip etti. Kullanılan tüm primer ve sekonder antikorlar bloklayıcı tampon ile sulandırıldı. Primer antikor inkübasyonunu takiben yıkanan kesitler uygun sekonder antikorlar içeren solüsyona alındı ve uygun sürelerde inkübe edildi. İşaretleme için kromojen solüsyonu kullanılacak kesitler üreticisinin verdiği bilgilere göre Tris-HCl tamponda avidin-biotin solüsyonunda (ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) inkübe edildi. Oluşan kompleksi görünür hale getirmek amacıyla kesitlere son işlem olarak kromojen madde uygulaması yapıldı. Avidin-biotin kompleksi peroksidad enzimi ile işaretli olduğu için kromojen madde olarak diaminobenzidine (DAB, Sigma, D5637, St. Louis, MO) seçildi. Kromojen solüsyonu, 100 ml Tris-HCl tamponda, 50 mg DAB ve 5 µl hidrojen peroksit eklenerek hazırlandı. Kesitler bu son aşamadan sonra yıkanarak lamlara alındı. Kuruyan kesitler ışık mikroskopi inceleme öncesi DPX ile kapatıldı. Bu çalışmalar sırasında test edilen

antikorlar için belirlenen optimum dilüsyonlar Tablo I'de özetlenmiştir.

**Tablo I.** Çalışmada kullanılan antikorların özellikleri

| Test Edilen Antikor     | Optimum Dilüsyonlar | Optimum Inkübasyon Süresi | Sıcaklık | Tedarikçi Firma | Katalog Numarası           |
|-------------------------|---------------------|---------------------------|----------|-----------------|----------------------------|
| Tavşan anti-GluA1       | 1:1000              | 48 saat                   | +4 °C    | Chemicon        | AB1504                     |
| Fare anti-GluA2         | 1:1000              | 24 saat                   | +4 °C    | Chemicon        | MAB397                     |
| Fare anti-GluA3         | 1:1000              | 72 saat                   | +4 °C    | Chemicon        | MAB5416                    |
| Tavşan anti-GluA4       | 1:500               | 72 saat                   | +4 °C    | Chemicon        | AB1508                     |
| Tavşan anti-GluK5       | 1:2000              | Tüm gece                  | +4 °C    | Jennes & Eyigor | antikor referans no: R52-4 |
| Fare anti-GluK1/2/3     | 1:2000              | 48 saat                   | +4 °C    | Chemicon        | MAB379                     |
| Mouse anti-GluN1 (IgG)  | 1:500               | 48 saat                   | OS       | Pharmin-gen     | 556,308                    |
| Mouse anti-GluN2A (IgG) | 1:2000              | 48 saat                   | OS       | Millipore       | MAB5216                    |

OS: oda sıcaklığı

*Hipotalamusta AMPA (GluA1, GluA2, GluA3, GluA4), Kainat (GluK5 ve GluK1/2/3) ve NMDA (GluN1, GluN2A) Reseptör Dağılımlarının Belirlenebilmesi İçin İmmünohistokimya Boyama Protokolü*

Kriyoprotektan çıkarılan kesitler Tris-HCl tamponda 3x10 dk. yıkanarak zemin boyanmasının maskeleyenmesi amacıyla %10'luk normal at serumu ile 2 saat süreyle inkübe edildi. Primer antikor uygulamasında kesitler tablo I'de verilen dilüsyon ve sürelerde inkübe edildi. Tris-HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkamanın ardından kesitler, kullanılan primer antikorunu tanıyan ve biyotin konjuge sekonder antikorlar (1:100-1:200; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA) ile 2 saat inkübe edildi. Sekonder antikordan Tris-HCl tamponunda yıkama ile arındırılan kesitler avidin-biotin kompleksi (ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) solüsyonu ile 1 saat süreyle inkübe edildi. Yıkamanın ardından, kesitlere substrat kromojen solüsyonu (DAB) uygulandı. Tris-HCl tamponu ile yıkanan kesitler lamlara alınıp kurutuldu. Kuruyan kesitler ışık mikroskopi inceleme öncesi DPX ile kapatıldı.

- <sup>a</sup> **Sorenson'un Fosfat Tamponunun Hazırlanışı.** Solüsyon A [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>12H<sub>2</sub>O (0.13 M), (Merck, CAS no:10039-32-4, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)] 46.54 g/lit, Solüsyon B [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.13 M), (ChemCruz, CAS no:7778-77-0, sc-203211, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX.)] 17.68 g/lit. Her iki solüsyon buzdolabında saklanır. Solüsyon A üzerine solüsyon B eklenerek pH 7.4'e ayarlanır.
- <sup>b</sup> **%4 Paraformaldehit Hazırlanışı.** 100 ml distile suda 40 gr paraformaldehit (Merck, Cat. No: 104005, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) magnetik karıştırıcı ve ısıtıcı üzerinde 58°C'ye kadar ısıtılarak çözülür. Sıcaklık kesilir. 1 N NaOH (Merck, CAS1310-73-2, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ilave edilir ve solüsyon berraklaşınca kadar karıştırılır. Filtre kağıdından süzülür. Fosfat tamponu ile 1 lt'ye tamamlanır. pH ölçümü yapılarak konsantr hidroklorik asit ya da 1 N NaOH ile son pH 7.4'e ayarlanır.
- <sup>c</sup> **Tris Tamponu (0.05 M) Hazırlanışı.** Trizma base (Merck, Cat. No: 108387, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) 6 g, distile su 1000 ml. Konsantr hidroklorik asit ile pH 7.6'ya ayarlanır.
- <sup>d</sup> **Kriyoprotektan Hazırlanışı.** 0.05 M Tris tamponu (500 ml), sükröz (BDH, Prod. No: 302997, BDH Laboratory Supplies, Poole, İngiltere) (300 g), etilen glikol (Sigma-Aldrich, Lot# STBH2872, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO) (300 ml) ve polivinilprolidon (Amresco, Cat. No: 1512B22, Solon, OH) (10 g). Maddeler verilen sıraya göre eklenir. Distile su ile 1 litreye tamamlanır.

## Preparatların İncelenmesi

İmmünoperoksidaz boyaması yapılan kesitlerin incelenmesi, Olympus BX-50 fotomikroskopta 40X objektif kullanılarak dijital kamera (Olympus DP71 CCD color camera, 1,5 million pixel, Tokyo, Japonya) ile bilgisayar ekranına alınan görüntüler üzerinde anında tarama yapılarak gerçekleştirildi. Çalışmalar kapsamında yapılan tekli işaretlemeler sonucu hazırlanan kesitlerin koordinatları sıçan beyin atlasına<sup>19</sup> göre belirlendi. Supraoptik çekirdek (SON) için bregma – 0.48 mm ile –1.44 mm, paraventriküler çekirdek (PVN) için bregma –1.32 mm ile –1.92 mm, lateral hipotalamus (LH) için ise bregma –2.04 mm ile –3.60 mm koordinatları arasındaki kesitler seçildi. Bu aralıklarda rostrakaudal düzlemde hipotalamusun 5 farklı seviyesinden alınan kesitlerde inceleme yapıldı. Kesitlerin birbirine eşit uzaklıkta (lateral hipotalamusta 350 µm'lik aralıkla) ve her denek için aynı koordinatta olmasına dikkat edildi. Kesitler, hipotalamik nöronlardaki iyonotropik glutamat reseptör alt birimlerinin varlığı ve yoğunluğu açısından semikantitatif olarak değerlendirildi (Tablo II). Belirli bir hipotalamik çekirdekteki nöronların çoğu ilgili alt birimi eksprese ediyorsa “+++”, orta düzeydeki ekspresyon için “++”, hafif düzeyde ekspresyon varsa “+” ve immünopozitifliğin olmadığı bölgeler için “–” olacak şekilde immünoperoksidaz reaksiyonların yoğunlukları sınıflandırıldı.

## Bulgular

Bu çalışmada, glutamat reseptör alt birimlerinin hipotalamustaki yerleşim özellikleri ile hipotalamik çekirdeklerdeki yoğunlukları immünohistokimyasal yaklaşımla araştırıldı.

## AMPA Reseptörleri

Yapılan immünoperoksidaz boyamalarında hipotalamusta GluA1, GluA2, GluA3 ve GluA4 alt birimlerine ait immünoreaksiyonun mikroskopik olarak değerlendirilmesiyle bu alt birimlerin dağılım paterni belirlendi. Buna göre GluA1 ve GluA2'nin hipotalamusta daha yoğun olarak yer aldığı, GluA3 ve GluA4'ün çok daha az sayıda nöronda eksprese olduğu ve seçici bir dağılım gösterdikleri tespit edildi.

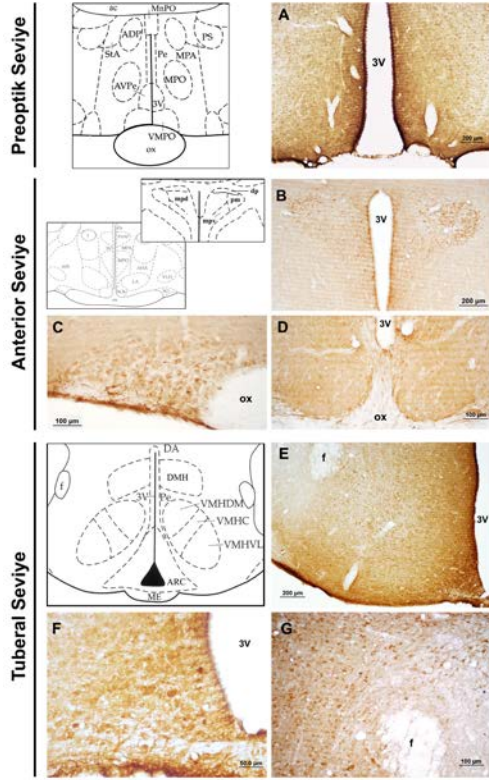
**GluA1:** GluA1 immünoaktif hücrelere preoptik bölgede anteroventral periventriküler nukleus (AVPe) ve medial preoptik nukleusda (MPO) rastlandı. İşaretli nöronlar AVPe'de orta yoğunlukta izlenirken MPO'da çok sayıda nöron görüldü. Median preoptik nukleusda (MnPO) az ile orta yoğunlukta işaretli nöron vardı (Şekil 1A). Anterior hipotalamik bölge incelendiğinde, PVN'de özellikle magnosellüler nöronların bulunduğu kısımlarda yoğun GluA1 işaretlenmesi gözlemlendi (Şekil 1B). SON'de çok sayıda nöronun GluA1-pozitif olduğu belirlendi (Şekil 1C). Suprakiazmatik çekirdekte (SCN) yoğun aksonal boyanma izlenirken az sayıda nöron gövdesinin immünoaktif olduğu tespit edildi (Şekil 1D). Ventromedial çekirdekte (VMH) yaygın işaretli hücre gözlenirken, çekirdeğin özellikle dorso-medial ve santral bölümlerinde ventrolateral kısmına göre daha yoğun sayıda immünoaktif hücre belirlendi (Şekil 1E). Arkuat çekirdekte (ARC) az sayıda, ancak sitoplazmik antijen-antikor reaksiyonunun yoğun olduğu bölgede GluA1-pozitif nörona rastlandı (Şekil 1F). Lateral hipotalamus incelendiğinde perifornikal alanda yoğunlaşmış GluA1-pozitif nöronlar görüldü (Şekil 1G).

**Tablo II.** Glutamat reseptör alt birimlerinin hipotalamik çekirdeklerdeki dağılımları ve immün reaksiyon düzeyleri

| Hipotalamik Bölgeler                         | AMPA Reseptör Alt Birimi |       |       |       | Kainat Reseptör Alt Birimi |           | NMDA Reseptör Alt Birimi |        |
|--|--------------------------|-------|-------|-------|----------------------------|-----------|--------------------------|--------|
|  | GluA1                    | GluA2 | GluA3 | GluA4 | GluK5                      | GluK1/2/3 | GluN1                    | GluN2A |
| <b>Preoptik Seviye</b>                       |                          |       |       |       |                            |           |                          |        |
| Median preoptik nukleus (MnPO)               | ++                       | -     | -     | -     | +++                        | +         | +++                      | -      |
| Anteroventral Periventriküler Nukleus (AVPe) | ++                       | ++    | +     | -     | +++                        | +++       | +++                      | -      |
| Medial Preoptik Nukleus (MPO)                | +++                      | ++    | +     | -     | ++                         | +         | +++                      | -      |
| Lateral Preoptik Alan                        | -                        | -     | -     | -     | -                          | -         | -                        | -      |
| <b>Anterior Seviye</b>                       |                          |       |       |       |                            |           |                          |        |
| Anterior Periventriküler Nukleus (APeV)      | -                        | +     | -     | -     | -                          | +         | +++                      | -      |
| Suprakiazmatik Nukleus (SCN)                 | +                        | ++    | +     | -     | +                          | +         | +++                      | -      |
| Paraventriküler Nukleus (PVN)                | +++                      | ++    | -     | -     | +++                        | ++        | +++                      | -      |
| Supraoptik Nukleus (SON)                     | +++                      | ++    | +     | +     | +++                        | +++       | +++                      | -      |
| Lateral Hipotalamik Alan (LH)                | -                        | -     | -     | -     | -                          | -         | -                        | -      |
| <b>Tuberal Seviye</b>                        |                          |       |       |       |                            |           |                          |        |
| Arkuat Nukleus (ARC)                         | ++                       | +     | +     | +     | +++                        | +++       | +                        | -      |
| Ventromedial Nukleus (VMH)                   | +++                      | +     | +     | -     | +++                        | +++       | +                        | -      |
| Dorsomedial Nukleus (DMH)                    | -                        | +     | -     | -     | ++                         | -         | +                        | -      |
| Lateral Hipotalamik Alan (LH)                | +++                      | -     | -     | -     | +++                        | -         | +++                      | -      |

Yoğun düzeydeki ekspresyon için “+++”, orta düzeydeki ekspresyon için “++” ve hafif düzeydeki ekspresyon için “+”, immünopozitifliğin olmadığı bölgeler için “-” ifadeleri kullanılmıştır.

## Hipotalamusda Glutamat Reseptör Ekspresyonu



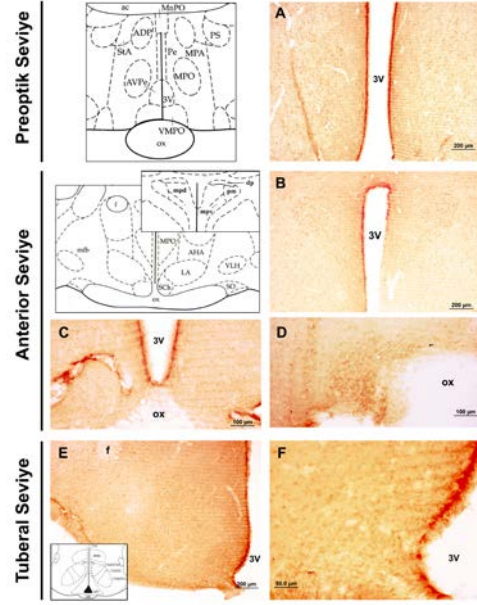
Şekil 1.

Hipotalamusun farklı seviyelerindeki GluA1 immünreaktivitesi. (A) Preoptik bölgedeki AVPe, MPO, MnPO'da lokalize GluA1-pozitif nöronlar görülmektedir. Anterior hipotalamusta PVN'de özellikle magnosellüler nöronların bulunduğu kısımlarda (B), SON'de (C) ve SCN'ta (D) yoğun GluA1 işaretlenmesi izlenmektedir. Mediobazal hipotalamusta VMH'da (E), arkuat çekirdekte (F) ve lateral hipotalamusun perifornikal alanında (G) yoğunlaşmış GluA1-immünreaktivitesi belirlenmiştir. 3V: Üçüncü ventrikül, f: forniks, ME: median eminens.

**GluA2:** Hipotalamusun preoptik bölgesinde AVPe'de orta düzeyde bir GluA2 ekspresyonu izlendi. MPO'da GluA2-pozitif nöron sayısının daha fazla olduğu ancak nöronlardaki immün reaksiyonun orta düzeyde kaldığı belirlendi. Az sayıda işaretli nörona periventricüler alanda rastlandı (Şekil 2A). Anterior hipotalamus seviyesi incelendiğinde, PVN'de (Şekil 2B) biraz daha fazla olmakla birlikte SCN (Şekil 2C) ve SON'de (Şekil 2D) orta düzeyde nöron yoğunluğu görüldü. Mediobazal hipotalamusta dorsomedial (Şekil 2E) ve arkuat (Şekil 2F) çekirdeklerde az sayıda nörona rastlandı. Ventromedial çekirdekte ise dağınık yerleşimli nöronlar görüldü (Şekil 2E-F).

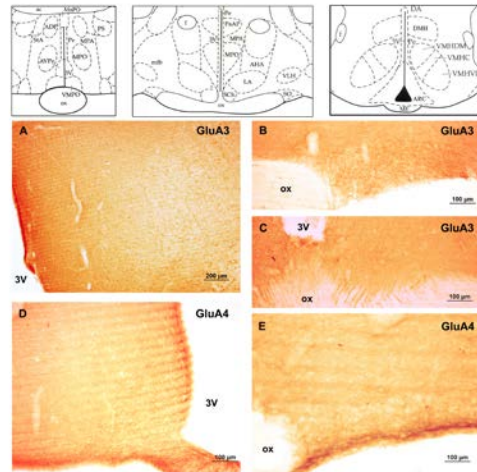
**GluA3:** Çok az sayıda ve dağınık yerleşimli GluA3-pozitif nörona AVPe, MPO, SON, SCN, ARC, VMH ve dorsomedial hipotalamusta (DMH) rastlandı (Şekil 3A-C). Lateral hipotalamus da dahil olmak üzere diğer alanlarda işaretli nöron görülmedi.

**GluA4:** GluA4 içeren nöronlara çok az sayıda arkuat (Şekil 3D) ve supraoptik (Şekil 3E) çekirdeklerde rastlandı.



Şekil 2.

Hipotalamusun farklı seviyelerindeki GluA2 immünreaktivitesi. Preoptik hipotalamik alanda yer alan AVPe, periventricüler çekirdek (Pe) ve MPO'da (A) lokalize GluA2-pozitif nöronlar görülmektedir. Anterior seviyedeki PVN (B), SCN (C) ve SON'de (D) GluA2 ekspresyonu izlenmektedir. Tuberal seviyede dorsomedial ve ventromedial çekirdek (E) ile arkuat çekirdekte (F) GluA2 alt birimini ekspresyen eden hücreler görülmektedir. 3V: Üçüncü ventrikül, f: forniks, ox: optik kiazma.



Şekil 3.

Hipotalamusun farklı seviyelerindeki GluA3 ve GluA4 immünreaktivitesi. GluA3 ekspresyonunun sınırlı olduğu, çok az sayıda nöronun AVPe (A), SON'de (B) ve SCN'de (C) yerleştiği izlenmektedir. GluA4 ekspresyonuna ise ARC (D) ile SON'deki (E) birkaç nörona rastlanmıştır. 3V: Üçüncü ventrikül, ox: optik kiazma.

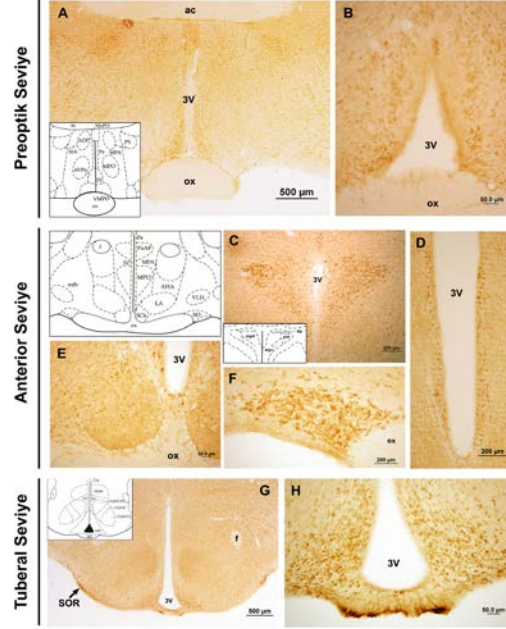
## Kainat Reseptörleri

Hipotalamusta kainat reseptörlerinden GluK5'in çok sayıda nöronda eksprese olduğu ve yoğun bir dağılım özelliği gösterdiği belirlendi. Düşük afiniteli kainat reseptör alt birimleri olan GluK1, GluK2 ve GluK3'ün belirlenmesi için her üç alt birimi de tanıyacak bir ortak sekanstan elde edilen GluK1/2/3 antikoru ile yapılan boyamalarda, bu antikorun da hipotalamusta yerleşik nöronlarda immün reaksiyon verdiği ve dağılımının yaygın olduğu belirlendi.

**GluK5:** GluK5 reseptör alt birimine ait immün reaksiyon gösteren nöronlara tüm hipotalamik çekirdeklerde ve alanlarda rastlandı. Preoptik bölgede, en yoğun GluK5-pozitif nöron grupları MnPO'da (Şekil 4A) ve AVPe'de (Şekil 4B) yerleşikti. MPO'da (Şekil 4A) orta yoğunlukta ve alana dağılmış şekilde lokalize, ancak güçlü immün reaksiyon veren nöronlar tespit edildi. Anterior hipotalamusta, PVN'de hem parvosellüler hem de magnosellüler kısımlarında çok sayıda immünopozitif nöron izlendi. Magnosellüler nöronların GluK5 ekspresyonunun parvosellüler nöronlara göre daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 4C). Bu seviyede, üçüncü ventrikül çevresindeki periventriküler alanda GluK5 içeren nöronlar görüldü (Şekil 4D). SCN'de çok az sayıda GluK5-pozitif nörona rastlandı (Şekil 4E). Çekirdeğin hemen çevresinde medial alanda dağınık yerleşimli GluK5'i eksprese eden nöronlar görüldü. SON'de çok sayıda GluK5 içeren ve sitoplazmik GluK5 miktarı fazla olan nöron gözlemlendi. Bu nöronların magnosellüler nöronlar olduğu belirlendi (Şekil 4F). Mediobazal bölgede en yoğun GluK5-pozitif nöron içeren çekirdeğin ARC'de olduğu belirlendi. Median eminensin dış zonundaki aksonal yapılarda yoğun GluK5 boyaması görüldü (Şekil 4H). VMH'nin anteromedial kısmında işaretli nöron sayısı fazla iken posterolateral kısmında daha az sayıda GluK5 eksprese eden nöron saptandı. Supraoptik retrokiazmatik çekirdekteki (SOR) nöronlarda da yoğun GluK5 reaksiyonu görülmektedir (Şekil 4G). Lateral hipotalamik alanda dağınık olarak yayılmış nöronların yanı sıra özellikle perifornikal bölgede GluK5 nöronlarının yoğunlaştığı ve belirgin bir sayıya eriştiği görüldü. Dorsomedial hipotalamik çekirdekte orta düzeyde bir ekspresyon ve işaretli nöron sayısı belirlendi (Şekil 4G).

**GluK1/2/3:** Hipotalamusta GluK5-pozitif nöronlar kadar çok olmamakla birlikte, kainat reseptör alt birimlerinden GluK1, 2, 3'ü tanıyan antikor ile işaretli çok sayıda nöron tespit edildi. Preoptik alanda, nöronların AVPe'de yoğunlaştığı daha az miktarda hücrenin ise MnPO ve MPO'da lokalize olduğu belirlendi (Şekil 5A, B). PVN'de posterior magnosellüler, medial parvosellüler ve dorsal parvosellüler bölümlerde belirgin, medial parvosellüler alanda ise daha az sayıda nöronun GluK1/2/3-pozitif olduğu görüldü (Şekil 5C). SON'de magnosellüler nöronların çoğunda yoğun sitoplazmik tutulum izlendi (Şekil 5E). SCN'nin ante-

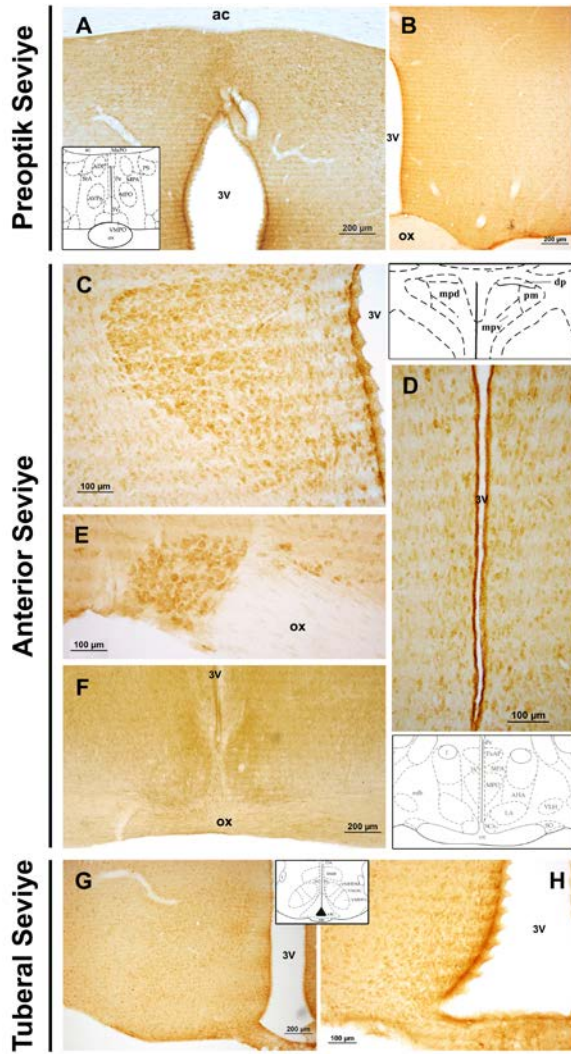
rior kısmında çok az sayıda nöron görülürken, posteromedial yerleşimli belirgin immünoreaktif akson varlığı tespit edildi (Şekil 5F). Anterior periventriküler çekirdekte (APeV) dağınık yerleşimli immünopozitif nöronlar belirlendi (Şekil 5D). Mediobazal hipotalamusta ise VMH (Şekil 5G) ve arkuat çekirdekte (Şekil 5H) çok sayıda GluK1/2/3'ü eksprese eden nöron gözlemlendi.



Şekil 4.

Hipotalamusun farklı seviyelerindeki GluK5 immünreaktivitesinin dağılımı. En yoğun GluK5-pozitif nöron içeren preoptik bölge çekirdekleri olarak MnPO (A) ve AVPe (B) görülmektedir. Üçüncü ventrikülün lateralinde yer alan MPO'da (A) orta yoğunlukta ve alana dağılmış nöronlar izlenmektedir. Anterior hipotalamus bölgesindeki PVN'de magnosellüler nöronlar daha belirgin olmak üzere parvosellüler nöronların büyük bir kısmında GluK5 immün reaksiyonu izlenmektedir (C). Üçüncü ventrikül çevresindeki periventriküler alanda GluK5-pozitif nöronlar izlenmektedir (D). SCN'de çok az sayıda GluK5-pozitif nörona rastlanırken, çekirdeğin medialine komşu çok sayıda GluK5 nöronu görülmektedir (E). SON'in çok sayıda GluK5-pozitif nöron içerdiği, bu nöronlarda yoğun reaksiyon olduğu görülmektedir. Nöron büyüklükleri itibarıyla işaretli nöronların magnosellüler nöronlar olduğu anlaşılmaktadır (F). Mediobazal hipotalamusta yerleşik arkuat çekirdekte yoğun boyanmış çok sayıda nöron görülmektedir (H). Median eminensin dış zonunda yoğun boyalı aksonal yapılar dikkati çekmektedir (H). VMH'nin anteromedial kısmında işaretli nöronların daha fazla sayıda olduğu görülürken, posterolateral kısmında daha az sayıda GluK5'i eksprese eden nöron izlenmektedir. SOR'deki nöronlarda da yoğun GluK5 reaksiyonu görülmektedir (G). 3V: Üçüncü ventrikül, f: fornix, ox: optik kiazma, ac: anterior komissür.

## Hipotalamusta Glutamat Reseptör Ekspresyonu



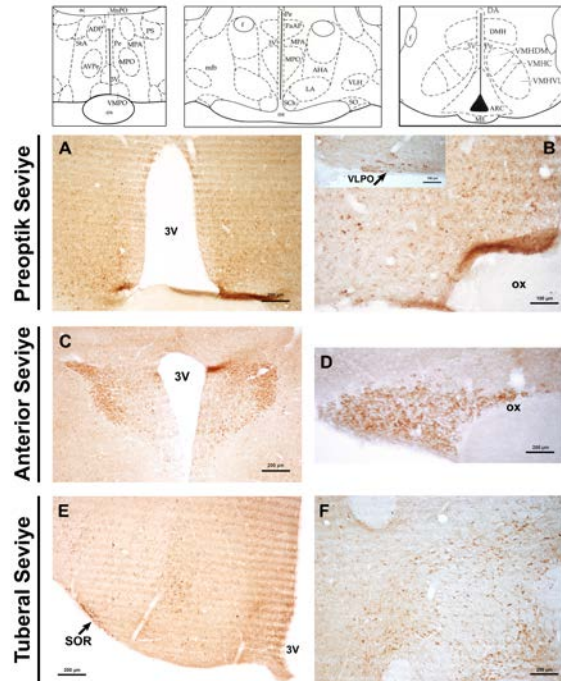
Şekil 5.

Hipotalamusun farklı seviyelerindeki GluK1/2/3 immünreaktivitesi. GluR1, 2, 3'ü tanıyan antikor ile işaretli nöronların preoptik alanda AVPe'de (A, B) yoğunlaştığı, daha az miktarda hücrenin ise MnPO (A) ve MPO'da (A, B) lokalize olduğu izlenmektedir. Anterior hipotalamik çekirdeklerden PVN'in posterior magnosellüler, medial parvosellüler ve dorsal parvosellüler bölümlerde belirgin (C), SON'deki magnosellüler nöronların çoğunda yoğun (E), SCN'nin anterior kısmında çok az sayıda (F) ve periventriküler çekirdekte (D) dağınık yerleşimli GluK1/2/3-immünopozitif nöronlar görülmektedir. Mediobazal hipotalamusta VMH (G) ve ARC'de (H) GluK1/2/3'ü eksprese eden nöronların dağılımı izlenmektedir. 3V: Üçüncü ventrikül, ox: optik kiazma, ac: anterior komissür.

### NMDA reseptörleri

NMDA reseptörlerinden GluN1'in çok sayıda hipotalamik alanda ve nöronda eksprese olduğu, yoğun bir dağılım özelliği gösterdiği belirlendi.

**GluN1:** Preoptik seviyede, medial septal nukleus (MS), lamina terminalis'in vascular organı (VOLT) ile AVPe'de, medial preoptik alandaki ventromedial preoptik çekirdek (VMPO) ile ventrolateral preoptik çekirdekte (VLPO) ve forniks çevresindeki nöronlarda yoğun bir GluN1 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 6A-B). Anterior seviyede perifornikal nukleusta (PeF), PVN'in (Şekil 6C) özellikle posterior magnosellüler kısmında belirgin olmak üzere, SON'de (Şekil 6D) ve retrokiazmatik supraoptik çekirdekte (SOR) (Şekil 6E) çok sayıda GluN1-pozitif nöronun lokalize olduğu görüldü. Tuberal seviyedeki alanda lokalize ARC'de, VMH'de ve DMH'de daha az sayıda GluN1'i eksprese eden nöron tespit edildi (Şekil 6E). Tuberal seviyedeki lateral hipotalamus incelendiğinde perifornikal alanda yoğunlaşmış GluN1-pozitif nöronlar görüldü (Şekil 6F).



Şekil 6.

Hipotalamusun farklı seviyelerindeki GluN1 immünreaktivitesi. Preoptik seviyede, AVPe'de (A), VMPO'da (A) ve VLPO'daki (B) nöronlarda yoğun GluN1 ekspresyonu gözlenmektedir. Anterior seviyede, PVN'in (C) özellikle posterior magnosellüler kısmında belirgin olmak üzere, SON'de (D) ve SOR'da (E) çok sayıda GluN1-pozitif nöronun lokalize olduğu görülmektedir. Tuberal seviyedeki çekirdeklerden ARC'de, VMH'de ve DMH'de az sayıda, lateral hipotalamik alanda (F) çok sayıda GluN1'i eksprese eden hücreler tespit edilmiştir. 3V: Üçüncü ventrikül, ox: optik kiazma.

**GluN2A:** GluN2A reseptör alt ünitesi ile ilgili incelenen kesitler, elimizdeki antikorun spesifik ve yeterli boyama yapmaması nedeniyle değerlendirilememiştir.

## Tartışma ve Sonuç

Çalışmalarımız kapsamında yapılan immünohistokimyasal boyamalarda, iyonotropik glutamat reseptör alt birimlerinden AMPA reseptör ailesine ait alt üniteler olan GluA1, GluA2, GluA3, GluA4, kainat reseptör ailesine ait alt üniteler GluK5 ve GluK1/2/3 ve NMDA reseptör ailesine ait GluN1 alt birimini eksprese eden nöronların hipotalamustaki dağılım ve hipotalamik çekirdeklerdeki yerleşim düzenleri belirlenmiştir.

İyonotropik glutamat reseptörlerinin hipotalamusta dağılım motifini mRNA düzeyinde gösteren in situ hibridizasyon çalışmaları literatürde mevcuttur<sup>20,21</sup>. In situ hibridizasyon tekniğinin kullanıldığı ve AMPA reseptör ailesinden GluA1-4'ün araştırıldığı bir çalışmada, GluA1 ve GluA2'nin hipotalamus boyunca güçlü bir ekspresyon gösterdiği, GluA3 ve GluA4 alt birimlerinin ise daha düşük yoğunlukta eksprese edildiği bildirilmiştir<sup>22</sup>. Aynı tekniğin kullanıldığı başka bir çalışmada ise, kainat reseptör ailesinden GluK5, AMPA reseptör ailesinden GluA1 ve GluA2, NMDA reseptör ailesinden GluN1, GluN2A ve GluN2B mRNA'larının çok yüksek yoğunlukta, diğer alt birimlerin (GluK1-3, GluA3-4, GluN2C-2D) ise daha zayıf bir hibridizasyon sinyali ile saptandığı gösterilmiştir<sup>23</sup>. Farklı çalışmalarda ise GluA1 ve GluA2 immünoaktivitesi ve mRNA sinyalleri hipotalamusta medial preoptik nükleus, ARC, SCN, SON ve PVN'de gösterilirken, GluA3 ve GluA4'ün hipotalamik çekirdeklerde daha az eksprese edildiği bildirilmiştir<sup>20,24,25</sup>. Hipotalamusun preoptik seviyesinden tuberal seviyesine kadar olan tüm bölgeleri göz önüne alındığında; nöron sayısının fazla olduğu, sitoplazmik tutulumun yoğun gözlemlendiği GluA1 ve GluA2 ekspresyonuna rastlanırken, GluA3 ve GluA4 alt birimleri için dağınık yerleşimli, daha az sayıda immünopozitif hücreye rastlanmıştır.

Sıçan hipotalamusu, korteks gibi beyin bölgeleriyle karşılaştırıldığı zaman orta derecede NMDA reseptör bağlama alanları gösterilmiş<sup>26</sup> olmakla birlikte non-NMDA reseptörleri ile karşılaştırıldığında bu oranın düşük olduğu bildirilmektedir<sup>27</sup>. Hipotalamusta yaygın GluN1 mRNA varlığı in situ hibridizasyon çalışmaları ile belirlenirken<sup>14,23,28</sup> çalışmamızda bu alt birimin nöronlardaki yoğun şekildeki lokalizasyonu immünohistokimyasal teknik kullanılarak gösterilmiştir.

Glutamatın hipotalamustaki dağılımı ile ilgili ultrastruktürel çalışmalar, suprakiazmatik, ventromedial, arkuat ile parvosellüler ve magnosellüler paraventriküler nükleuslarda presinaptik butonlarda glutamat immunopozitifliği gösterdiğini bildirmiştir<sup>18,25</sup>. İmmünoaktif glutamat aksonlarının tüm mediobazal hipotalamus bölgelerindeki hücre gövdeleri ve dentritik uzantılar ile temas ettiği<sup>18</sup> ve supraoptik nükleusta yerleşik magnosellüler nöroendokrin hücrelerdeki

sinaptik girdilerin üçte birinden fazlasının glutamat-pozitif olduğu bilinmektedir<sup>29</sup>.

Hipotalamusun belirli alanlarına spesifik<sup>30-32</sup> ya da tek bir alt birimin hipotalamusta belirlenmesine yönelik<sup>33-35</sup> immünohistokimyasal çalışmalar literatürde var olmasına rağmen, genel dağılımı belirleyen çalışma sayısı oldukça azdır. Bu tekniğin kullanılarak yapıldığı bir başka çalışmada, sıçan red nükleusundaki glutamat reseptör alt birimlerin ekspresyonu araştırılmış olup, işaretlenen nöronların immünoaktivite ve sayılarının ilgili reseptörün alt birim proteinlerine bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, red nükleusun magnosellüler kısmındaki nöronların GluA2, GluA4, GluK2/3, GluK5, GluN1 ve GluN2A reseptör proteinleri için immünopozitif boyanma, parvosellüler kısmındaki nöronlar için düşük-orta yoğunlukta bir boyanma gösterdikleri bildirilmiştir<sup>36</sup>. SON'de lokalize magnosellüler nörosekretuar nöronların (MNC) eksitabilitesinin glutamat tarafından düzenlendiği bilinmektedir. NMDA reseptörleri, MNC'lerin sinaptik plastisitesine aracılık eden, bu nöronların hormon salınımlarını en üst düzeye çıkararak elektriksel aktivite için gerekli iyonotropik glutamat reseptör alt birimlerindedir. SON'daki GluN1 ve GluN2 alt birimlerinin ekspresyon profillerinin mRNA ve protein seviyelerinde araştırıldığı bir çalışmada; GluN1, GluN2B ve GluN2D alt birimlerinin güçlü, GluN2A alt biriminin ise daha zayıf bir ekspresyon paterni sergilediği gösterilmiştir<sup>37</sup>.

Merkezi sinir sisteminde, GluN2A alt birimine ait ekspresyon bölgeseldir ve geçici olarak çeşitlilik gösterir. Bu alt birimin doğuma kadar eksprese edilmediği, en yüksek ekspresyon seviyesinin hipokampus ve korteksde izlendiği bildirilmiştir<sup>38,39</sup>. Supraoptik çekirdekteki NMDAR alt ünitelerinin ekspresyon profillerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, mRNA düzeyinde GluN1 ve GluN2 alt birimlerinin tümünün güçlü bir şekilde eksprese edildiği, protein düzeyinde ise sadece GluN1, GluN2B ve GluN2D'nin güçlü immünoaktivite gösterdiği bildirilmiştir<sup>37</sup>. Çalışmamız kapsamında yapmış olduğumuz immünohistokimyasal boyamalarda, GluN1 alt ünitesinin pek çok hipotalamik çekirdekte lokalize olduğu gösterilmiştir. GluN2A alt birimine ait protein ekspresyonuna ise, beyin kesitlerinde rastlanmamıştır. Bu alt birime ait olan özgül antikorun çok yüksek konsantrasyonda bile sinyal vermemesi, dilüsyon denemesi dışında uygulanan antijen retrieval protokolünün de sorunu çözücü bir katkısının olmaması sebebiyle çalışma kapsamında GluN2A proteinine ait ekspresyon elde edilememiştir.

Sıçan ve maymundaki yapılan çalışmalar, hipotalamusta kainat reseptörlerinin NMDA reseptörlerine benzer dağılım paterni olduğunu göstermiştir<sup>27</sup>. Preoptik seviyede ve mediobazal hipotalamusta ise özellikle arkuat nükleus ile median eminente kainat reseptörlerinin yoğun olduğu gözlemlenmiştir<sup>23,27</sup>. İmmünohistokimyasal çalışmalar GluK1 reseptör



## Hipotalamusta Glutamat Reseptör Ekspresyonu

proteininin, AVPE, SCN, PVN, SON, ve ARC'de<sup>40</sup>, GluK2 ve GluK5 reseptör proteininin hipotalamusta yaygın dağılımına karşın ekspresyonun özellikle AVPE, PVN'nin posterior magnosellüler ve medial parvosellüler bölümünde, SCN ve ARC'de<sup>41</sup> yoğun olduğunu gösterdi. Yapmış olduğumuz çalışmada, GluK5 reseptör alt birimine ait immün reaksiyon gösteren nöronlara tüm hipotalamik çekirdeklerde ve alanlarda rastlanırken, GluK1/2/3'ü tanıyan antikörlerle işaretli nöronlara sadece AVPE, PVN, SON, ARC ve VMH'de rastlanmıştır.

Çalışma sonuçlarımız, non-NMDA ve NMDA glutamat reseptör alt birim proteinlerinin pek çok hipotalamik çekirdekte lokalize nöronlarca sentezlendiğini göstermiştir. Ayrıca immün boyamalarda benzerliklerin, bu bölgelerdeki hücrelerin glutamaterjik girdiyeye benzer şekilde yanıt verebileceğini göstermektedir.

Son yıllarda hem iyonotropik hem de metabotropik glutamat reseptör alt tiplerinin moleküler olarak görüntülenebilmesinde kullanışlı olabilecek ligandlar üzerinde çalışılmaktadır<sup>42</sup>. Beyin fonksiyonunda glutamaterjik sinyalizasyonun merkeziliği ve çeşitliliği göz önüne alındığında, glutamat reseptörlerinin moleküler olarak görüntülenebilmesi için selektivitesi ve sensitivitesi daha az yöntemlere sahip olduğumuz aşıkardır. Çalışmalarda çoklu işaretleme tekniği kullanılmadığı için her bir nöronda hangi alt birimlerin ko-eksprese olduğunu söylemek bu yaklaşımla mümkün değildir.

Çalışmalarımızda kullanılan immünohistokimya tekniği antikörlerin özgünlüğü seviyesinde sonuç vermektedir. Bu özellik immünohistokimya tekniğine belirli bir düzeyde limitasyon getirmektedir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçların literatürde yer alan ve glutamat reseptör alt birimlerinin mRNA seviyesinde ekspresyonunu gösteren çalışmalarla karşılaştırılarak bir bütün olarak değerlendirilmesi uygun olacaktır. Çalışmamızda laboratuvar ve deney hayvanları yetiştirme merkezimizin şartları doğrultusunda sadece dişi denekler kullanılmıştır. Hipotalamusta yer alan farklı nöronlarda protein ekspresyonunun cinsiyete bağlı olarak değişiklik gösterebileceği bilinmektedir. Bu kapsamda çalışmamızda erkek deneklerin kullanılmaması çalışmanın limitasyonudur.

Sonuç olarak, bu çalışmada sunulan bulgular hipotalamusta fonksiyonel glutamat reseptörü oluşturabilecek tüm alt birimlerin sentezlendiğini göstermesi açısından önemlidir. Hipotalamusta lokalize olan hedef nöronlardaki glutamaterjik fonksiyonun daha iyi aydınlatılabilmesi için, iGluR'lerin alt birimlerinin lokalizasyonlarının gösterilmesi glutamaterjik innervasyonun gösterilebilmesi açısından bir belirteç olarak kullanılabilir. Bu çalışmadan çıkan sonuçlar belirli hipotalamik alanda yerleşik nöronların glutamaterjik olarak hedeflenmesinde yol gösterici olacaktır. Aynı zamanda hipotalamusta yer alan nöroendokrin sistem-

lere terapötik yaklaşımlarda araştırmacılara bilgi sağlayacaktır.

### Etik Kurul Onay Bilgisi:

**Onaylayan Kurul:** Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi

**Onay Tarihi:** 19.04.2005

**Karar No:** 2005/1

### Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve Tasarım: Ö.E., F.Z.M.; Veri toplama ve işleme F.Z.M., D.G.Y., G.T.; Analiz ve verilerin yorumlanması Ö.E., F.Z.M., D.G.Y., G.T.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması F.Z.M., D.G.Y.

### Destek ve Teşekkür Beyanı:

Bu makalede yer alan sonuçlar, TÜBİTAK tarafından desteklenen 104S286 nolu proje kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilmiştir.

### Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

## Kaynaklar

1. Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacol Biochem Behav* 2012;100:656-64.
2. Nakanishi S. Molecular Diversity of Glutamate Receptors and Implications for Brain Functions. *Science* 1992;258:597-603.
3. Danbolt NC. Glutamate Uptake. *Prog Neurobiol* 2001;65:1-105.
4. Meldrum BS. Glutamate As a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *J Nutr* 2000;130:1007S-15S.
5. Van Den Pol AN, Wuarin JP, Dudek FE. Glutamate Neurotransmission in the Neuroendocrine Hypothalamus. Brann DW, Mahesh VB (eds). *Excitatory Amino Acids: Their Role in Neuroendocrine Function*. 1st edition. Boca Raton: CRC Press; 1996. 1-54.
6. Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:31-108.
7. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998;54:581-618.
8. Koles L, Wirkner K, Illes P. Modulation of Iontropic Glutamate Receptor Channels. *Neurochem Res* 2001;26:925-32.
9. Bettler B, Mulle C. Neurotransmitter receptors II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 1995;34:123-139.
10. Kew JN, Kemp JA. Iontropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* 2005;179:4-29.
11. Mori H, Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 1995;34:1219-37.
12. Alt A, Weiss B, Ogden AM et al. Pharmacological characterization of glutamatergic agonists and antagonists at recombinant human homomeric and heteromeric kainate receptors in vitro. *Neuropharmacology* 2004;46:793-806.
13. Howe JR. Homomeric and heteromeric ion channels formed from the kainate type subunits GluR6 and KA2 have very small, but different, unitary conductances. *J Neurophysiol* 1996;76: 510-19.
14. Monyer H, Sprengel R, Herb A, et al. Heteromeric NMDA Receptors: Molecular and Functional Distinction of Subtypes. *Science* 1992;256:1217-21.

15. Lerma J, Paternain AV, Naranjo J R, Mellstrom B. Functional kainate-selective glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:11688-92.
16. Paternain AV, Herrera MT, Nieto MA, Lerma J. GluR5 and GluR6 kainate receptor subunits coexist in hippocampal neurons and coassemble to form functional receptors. *J Neurosci* 2000;20:196-205.
17. Molina PE, (eds). *Endocrine Physiology*. 4th edition. New York: Mc Graw-Hill; 2004.
18. Van Den Pol AN, Wuarin JP, Dudek FE. Glutamate, the Dominant Excitatory Transmitter in Neuroendocrine Regulation. *Science* 1990;250:1276-8.
19. Paxinos G, Watson C, (eds). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th edition. Elsevier Academic Press: Amsterdam; 2009.
20. Herman JP, Eyigor O, Ziegler DR, Jennes L. Expression of Ionotropic Glutamate Receptor Subunit mRNAs in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of the Rat. *J Comp Neurol* 2000;422:352-62.
21. Van Den Pol AN, Hermans-Borgmeyer I, Hofer M, Ghosh P, Heinemann S. Ionotropic Glutamate-Receptor Gene Expression in Hypothalamus: Localization of AMPA, Kainate, and NMDA Receptor RNA with in Situ Hybridization. *J Comp Neurol* 1994;343:428-44.
22. Sato K, Kiyama H, Tohyama M. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunits (GluR1-4) in the rat brain. *Neuroscience* 1993;52:515-39.
23. Eyigor O, Centers A, Jennes L. Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 2001;431:101-24.
24. Brann DW, Mahesh VB. Excitatory Amino Acids: Function and Significance in Reproduction and Neuroendocrine Regulation. *Front Neuroendocrinol* 1994;15:3-49.
25. Van Den Pol AN. Glutamate and Aspartate Immunoreactivity in Hypothalamic Presynaptic Axons. *J Neurosci* 1991;11:2087-101.
26. Brann DW, Zamorano PL, Chorich LP, Mahesh VB. Steroid Hormone Effects on NMDA Receptor Binding and NMDA Receptor mRNA Levels in the Hypothalamus and Cerebral Cortex of the Adult Rat. *Neuroendocrinology* 1993;58:666-72.
27. Cotman CW, Monaghan DT, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Anatomical Organization of Excitatory Amino Acid Receptors and Their Pathways. *Trends Neurosci* 1987;10:273-80.
28. Kus L, Handa RJ, Sanderson JJ, Kerr JE, Beitz AJ. Distribution of NMDAR1 Receptor Subunit mRNA and [125I]MK-801 Binding in the Hypothalamus of Intact, Castrate and Castrate-DHTP Treated Male Rats. *Mol Brain Res* 1995;28:55-60.
29. Goldsmith PC, Thind KK, Perera AD, Plant TM. Glutamate-Immunoreactive Neurons and Their Gonadotropin-Releasing Hormone-Neuronal Interactions in the Monkey Hypothalamus. *Endocrinology* 1994;134:858-68.
30. Gu G, Varoqueaux F, Simerly RB. Hormonal Regulation of Glutamate Receptor Gene Expression in the Anteroventral Periventricular Nucleus of the Hypothalamus. *J Neurosci* 1999;19:3213-22.
31. Kawakami S. Glial and Neuronal Localization of Ionotropic Glutamate Receptor Subunit-Immunoreactivities in the Median Eminence of Female Rats: GluR2/3 and GluR6/7 Colocalize With Vimentin, Not With Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). *Brain Res* 2000;858:198-204.
32. Michel S, Itri J, Colwell CS. Excitatory Mechanisms in the Suprachiasmatic Nucleus: the Role of AMPA/KA Glutamate Receptors. *J Neurophysiol* 2002;88:817-28.
33. Petralia RS, Wenthold RJ. Light and Electron Immunocytochemical Localization of AMPA-Selective Glutamate Receptors in the Rat Brain. *J Comp Neurol* 1992;318:329-54.
34. 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.
35. Warembourg M, Leroy D. AMPA Glutamate Receptor Subunits in the Guinea Pig Hypothalamus: Distribution and Colocalization with Progesterone Receptor. *J Comp Neurol* 2002;453:305-21.
36. Minbay FZ, Serter S, Gok Yurtseven D, Eyigor O. Immunohistochemical localization of ionotropic glutamate receptors in the rat red nucleus. *Bosnian J Basic Med* 2017;17:29-37.
37. Doherty FC, Sladek CD. NMDA receptor subunit expression in the supraoptic nucleus of adult rats: dominance of NR2B and NR2D. *Brain Res* 2011;1388:89-99.
38. Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. N-methyl-D-aspartate receptor proteins NR2A and NR2B are differentially distributed in the developing rat central nervous system as revealed by subunit-specific antibodies. *J Neurochem* 1996;66:692-700.
39. Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, Benke D. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem* 1997;68:469-78.
40. Eyigor O, Minbay Z, Cavusoglu I, Jennes L. Localization of Kainate Receptor Subunit GluR5-Immunoreactive Cells in the Rat Hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;136: 38-44.
41. Minbay FZ, Eyigor O, Oksitosin Nöronlarında Kainat Reseptör Alt Birimlerinin Sentezi: İmmünohistokimyasal Çalışma. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2020;46:357-363.
42. Kim JH, Marton J, Ametamey SM, Cumming P. A Review of Molecular Imaging of Glutamate Receptors. *Molecules* 2020;25:47-9.