

# Kemirgen Hipotalamusunda Glutamatın Atriyal Natriüretik Peptit Nöronları Üzerindeki Etkilerinin İmmünohistokimyasal Yöntemle Araştırılması

● Duygu GÖK YURTSEVEN<sup>1</sup> ● Zehra MİNBAŞ<sup>1</sup> ● Özhan EYİĞÖR\*<sup>1</sup>

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

Received 09-10-2020 Accepted 04-11-2020

## Özet

Atriyal natriüretik peptit (ANP) organizmanın sıvı homeostazında önemli etkileri olan, özellikle de kan basıncı ile sıvı elektrolit dengesinin düzenlenmesinde rol oynayan bir peptittir. Yoğun olarak atrial kalp kası hücrelerince üretilen ANP, merkezi sinir sisteminde (MSS) lokalize bir grup nöron tarafından da eksprese edilir. MSS'de nöronal ağlarda impuls iletiminde çok önemli rolü olan glutamaterjik sistemin ANP nöronlarını kontrol eden etkileri ile ilgili bilgi literatürde yer almamaktadır. Sunulan çalışma kapsamında, hipotalamusun supraoptik çekirdeğinde lokalize ANP nöronları üzerinde glutamat agonistlerinin etkileri ve bu nöronlarda eksprese olan glutamat reseptör alt birimlerinin varlığı, ikili immünoperoksidaz ve immünofluoresans yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Glutamat agonistlerinin etkilerini belirlemek üzere, kainik asit, AMPA ve NMDA, kontrol grupları için salin, antagonist olarak CNQX ve MK801 enjeksiyonu yapılan sıçanları içeren deney grupları oluşturulmuştur. ANP nöronlarındaki glutamaterjik innervasyonun belirlenmesinde veziküler glutamat transporter (VGluT) proteinleri ve nöronal aktivasyonun gösterilmesinde ise c-Fos immünoreaktivitesinin varlığı belirteç olarak kullanılmıştır. Çalışmaların sonucunda; glutamat agonistlerinin ANP nöronlarında nöronal aktivasyonu anlamlı bir şekilde artırdığı, bu artışın antagonistler ile anlamlı bir şekilde baskılabildiği belirlenmiştir. Ayrıca ANP nöronlarının glutamat reseptörlerine ait alt birimlerden GluA1, GluA2, GluK1/2/3 ve GluK5'i eksprese ettikleri ve VGluT içeren glutamaterjik akson sonlanmalarıyla temasta oldukları saptanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışma ile glutamatın ANP nöronlarında aktive edici etkiye sahip olduğu ve glutamat reseptörlerinin bu nöronlarca eksprese edildiği, dolayısıyla da bu nöronların glutamaterjik uyarıları alabilecek mekanizmaya sahip oldukları gösterilmiştir. Bu sonuçlar, ANP nöronlarının merkezi düzenlenmesinde glutamaterjik sistemin önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Atriyal natriüretik peptit, Glutamat, Kainik Asit, c-Fos, VGluT, Sıçan.

## Investigation of Glutamatergic Effects on Atrial Natriuretic Peptide Neurons by Immunohistochemical Method in Rodent Hypothalamus Abstract

Atrial natriuretic peptide (ANP) is a peptide that has important effects on the fluid homeostasis of the organism, particularly involved in the regulation of blood pressure and fluid electrolyte balance. ANP, which is intensely produced in the heart atrium, is also expressed in different peripheral and central organs. There is no knowledge in the literature regarding the control of ANP neurons in the central nervous system by the glutamatergic system. In our study, the effects of glutamate agonists on ANP neurons and the presence of glutamate receptor subunits expressed in these neurons were investigated using dual immunoperoxidase and immunofluorescence methods. In the present study, ANP neurons localized in the supraoptic nucleus (SON) of the hypothalamus were examined. In order to determine the effects of glutamate agonists, experimental groups were formed containing rats which were injected with kainic acid, AMPA and NMDA, saline for control groups and CNQX or MK801 as antagonists. VGluT protein was used as a marker for the determination of glutamatergic innervations in ANPergic neurons, and c-Fos immunoreactivity was used as a marker for neuronal activation. It has been determined that glutamate agonists cause activation in a significant number of ANP neurons which can significantly be suppressed by antagonists. In addition, it was determined that the ANP neurons express GluA1, GluA2, GluK5 and GluK1/2/3, which are subunits of glutamate receptors, and are in contact with glutamatergic axon terminations containing VGluT. As a result, it has been shown that glutamate has an effect on the activation of ANP neurons and that glutamate receptors are expressed by these neurons, thus, these neurons possess the mechanism in order to receive glutamatergic stimulations. In conclusion, these results suggested that the glutamatergic system plays an important role in the central regulation of ANP neurons.

Key Words: Atrial natriuretic peptid, Glutamate, Kainic Acid, c-Fos, VGluT, Rat.

\* Corresponding author: Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü, 16059, Bursa Tel: + 90 0533 517 7809 Fax: + 90 224 295 0019 E-posta: oeyigor@uludag.edu.tr

## Giriş

Natriüretik peptit ailesi, atriyal natriüretik peptit (ANP)<sup>1</sup>, beyin natriüretik peptit (BNP)<sup>2</sup> ve C-tipi natriüretik peptit (CNP)<sup>3</sup> olmak üzere üç peptitten oluşur. ANP, beyindeki su ve elektrolit içeriğini düzenleyen 126 amino asitlik atrial prohormondan kesilen 28 amino asitlik bir peptittir.<sup>4</sup> Natriüretik peptitler periferik fonksiyonlarının yanı sıra, merkezi sinir sisteminde hem nöromodülatör hem de nörotransmitter olarak görev yaparlar.<sup>5</sup> İlk kez kalp atriyumlarında yerleşik atriyal miyositlerce sentezlendiği ve salgılandığı gösterilen ANP'nin<sup>6</sup> ayrıca hipotalamik çekirdekte yerleşik nöronlarca da sentezlendikleri belirlenmiştir.<sup>7-9</sup> Hipotalamusta paraventriküler çekirdekte (PVN)<sup>10</sup>, anteroventral periventriküler çekirdekte (AVPV)<sup>11</sup>, suprakiazmatik çekirdekte (SCN)<sup>12,13</sup>, arkuat çekirdekte (ARC) ve supraoptik çekirdekte (SON)<sup>14,15</sup> ANP içeren nöron gövdeleri immünohistokimyasal yöntemlerle ile gösterilmiştir.

Hipotalamusun birçok endokrin ve peptiterjik sistemi üzerinde etki gösteren glutamat, sinaptik mekanizmalar aracılığıyla hipotalamustaki neredeyse tüm nöronları etkilemektedir. Eksitator aminoasit nörotransmitterlerinin başında gelen glutamatın, nöroendokrin sistemlerin ve hipotalamus-hipofiz-endokrin sistem aksının düzenlenmesinde önemli rolü vardır<sup>16,17</sup>. Glutamat reseptörleri, hem eksitator hem de inhibitör sinaptik iletişime aracılık eden membran proteinleridir<sup>18</sup>. Glutamatın iki farklı reseptör üst ailesinden biri olan iyonotropik glutamat reseptörleri iyon-özümlü reseptör kanalları oluştururlar<sup>19</sup>. İyonotropik glutamat reseptörleri, glutamat agonistlerine olan bağlanma afiniteleri değerlendirilerek 3 alt gruba ayrılmaktadır; AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propionik asit), Kainat (KA, 2-karboksi-3-karboksimetil-4-izopropenilpirolidin) ve NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörleri<sup>20-23</sup>. Glutamat agonistleri, seçici olarak farklı tipteki glutamat reseptörlerine bağlanarak taşıdıkları uyarıyı nöronlara aktarırlar ve nöronal aktivasyonu sağlarlar. Aktive olan nöronların belirlenmesinde kullanılan çeşitli belirteçler mevcuttur. Bir transkripsiyon faktörü olan c-fos geninin (ani-erken gen) ve bu genin protein ürünü olan c-Fos'un geçici olarak ekspresyonu, bu geni taşıyan nöronların aktive olduğunu belirlemede bir parametre olarak kullanılmaktadır<sup>24,25</sup>. c-Fos proteini, uyarı alan bir nöronda çok hızlı olarak (60-90 dakika içerisinde) sentezlenip çekirdeğe translokale olarak nöronda genetik aktivasyonu başlatır. Bu işlevi nedeniyle aktive olan nöronların belirlenmesinde nöronal aktivasyon belirteci olarak kullanılmaktadır<sup>26</sup>.

Bu çalışmada; c-Fos proteini varlığının nöronal aktivasyon belirteci olması özelliğinden yararlanılarak, ikili immüno-

histokimya tekniği ile ANP nöronlarının glutamat agonistlerinin uygulanması sonrasında aktive olup olmadıkları ve olası aktivasyonun glutamat antagonistleri ile bloklanıp bloklanmadığı araştırılmıştır. Ayrıca, bu nöronlardaki glutamat reseptör alt birimlerinin ekspresyonunun incelenmesi için ikili immünofluoresans tekniği kullanılmış, ANP nöronları üzerindeki glutamaterjik sonlanmaların varlığı glutamaterjik belirteç olarak kullanılan veziküler glutamat taşıyıcı proteinleri-2 (VGluT2) ve VGluT3 immünohistokimyası ile değerlendirilmiştir.

## Materyal ve Metot

### Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Çalışma, Üniversitemiz Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 19.04.2005/1 sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak yapıldı. Çalışmada, erişkin (60-90 günlük) Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanların bulunduğu ortam ısısı 20-240C olacak şekilde sabit tutulup, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık (07.00-19.00 arası aydınlık) döngüsü uygulandı ve hayvanlar ad libitum olarak su ve yemle beslendi.

### Dokuların Hazırlanması

Denekler derin eter anestezisi altında 0,13 M fosfat tamponu ile hazırlanan %4 paraformaldehitin kullanıldığı transkardiyak perfüzyon fiksasyonu yöntemi kullanılarak sakrifiye edildi. Bu yöntemde deneklerin göğüs kafesleri açılarak kateter kalp apeksinden aortaya yerleştirildi ve sabitlendi. Damar içi basınca uygun şekilde ayarlanan perfüzyon pompası yardımıyla öncelikle deneklerin dolaşım sistemleri % 0,9 NaCl (150 ml) ile temizlendi, sonrasında denek başına 400 ml fiksatif solüsyonu ile perfüzyon fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Perfüzyon sonrası çıkarılarak aynı fiksatifte +4°C'de gece boyu post-fiksasyon uygulanan beyinlerden vibrotom ile 50  $\mu$ m'lik koronal kesitler alındı. Hipotalamusun rostra-kaudal ekseninin tamamını içerecek şekilde alınan kesitler 5 seri halinde Tris-HCl tampon solüsyonu (pH 7.6) içine toplandı. Tris-HCl solüsyonunda 3x10 dk. yıkanarak fiksatiften arındırılan kesitler kriyoprotektan solüsyon içerisinde -20°C'de saklandı. Daha sonra bu kesitlere aşağıda basamakları ayrıntılı bir şekilde verilen protokoller kullanılarak indirekt immüno-peroksidaz yöntemi ya da ikili immünofluoresan yöntemleri ile işaretlemeler yapıldı.

### Deney Gruplarının Oluşturulması

Farklı glutamat reseptör agonistlerinin ANP nöronlarının aktivasyonuna olan etkisinin araştırılması amacıyla deney grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu.

a) AMPA/kainat reseptör agonisti kainik asitin nöron ak-

tivasyonuna etkisinin araştırılması: Denekler, her grupta 5 dişi olmak üzere 3 grup olacak şekilde sınıflandırıldı (n=5/grup):

Grup I (Kontrol grubu): Deneklere intraperitoneal (i.p.) fizyolojik tuzlu su enjeksiyonu (300 l/denek) yapıldı.

Grup II (Kainik asit grubu): Deneklere i.p. yolla kainik asit (Calbiochem., LA) 2.5 mg/kg dozunda (300 l/denek) verildi.

Grup III (CNQX grubu): Kainik asit enjeksiyonundan 15 dk. önce AMPA-kainat reseptör antagonisti olan CNQX (Ascent Scientific North Somerset, UK) 1 mg/kg dozunda i.p. yolla (300 l/denek) verildi.

b) AMPA reseptör agonisti AMPA'nın nöron aktivasyonuna etkisinin araştırılması: Denekler her grupta 5 dişi olacak şekilde 3 gruba ayrıldı (n=5/grup).

Grup I (Kontrol grubu): Deneklere i.p. fizyolojik tuzlu su enjeksiyonu (750 l/denek) yapıldı.

Grup II (AMPA grubu): Deneklere i.p. yolla AMPA (Ascent Scientific North Somerset, UK) 5 mg/kg dozunda (750 l/denek) verildi.

Grup III (CNQX grubu): AMPA enjeksiyonundan 15 dk. önce AMPA-kainat reseptör antagonisti olan CNQX 2 mg/kg dozunda i.p. yolla (300 l/denek) verildi.

c) NMDA reseptör agonisti NMDA'nın nöron aktivasyonuna etkisinin araştırılması: Her grupta 5 dişi olmak üzere denekler 3 grup olacak şekilde sınıflandırıldı (n=5/grup).

Grup I (Kontrol grubu): Deneklere i.p. fizyolojik tuzlu su enjeksiyonu (2 ml/denek) yapıldı.

Grup II (NMDA grubu): Deneklere i.p. yolla NMDA (Ascent Scientific North Somerset, UK) 100 mg/kg dozunda (2 ml/denek) verildi.

Grup III (MK-801 grubu): NMDA enjeksiyonundan 15 dk. önce NMDA reseptör antagonisti olan MK-801 (Ascent Scientific North Somerset, UK) 1 mg/kg dozunda i.p. yolla (300 l/denek) verildi.

Enjeksiyonlar 10:00-11:00 saatleri arasında yapıldı. Son enjeksiyonlardan 90 dk. sonra tüm denekler derin eter anestezisi altında yukarıda ayrıntıları verilen yöntemle sakrifiye edilerek seri beyin kesitleri hazırlandı ve aşağıda verilen immünohistokimyasal yöntemle işaretlendi.

### İmmünohistokimya

İmmünohistokimyasal işlemlerin tümü cam sintilasyon viyallerindeki yüzen kesitlere uygulandı. Kesitlerin yıkama ve inkübasyon işlemleri orbital sallayıcı yardımı ile uygun ajitasyonla gerçekleştirildi. İmmünohistokimyasal işaretleme prosedürü sırasında, kesitlerin yıkanması aşamalarında ve ABC ile substrat kromojen solüsyonlarının hazırlanmasında Tris-HCl tamponu kullanıldı. Spesifik olmayan bağlanmayı azaltmak amacıyla %10 normal at serumu (Sigma, Cat No: H1138, Sigma-Aldrich, Co., 3050 Spruce Street, St.

Louis, USA.), %0.1 sodyum azid (BDH, Prod. No: 30111, BDH Laboratory Supplies Poole, BH15 1TD, England) ve %0.2 Triton-X 100 (BDH, Prod. No: 43700, BDH Laboratory Supplies Poole, BH15 1TD, England) içeren Tris\_HCl tamponu bloklayıcı tampon olarak seçildi. Ayrıca kullanılan tüm primer ve sekonder antikorlar bloklayıcı tampon ile sulandırıldı.

### i. c-Fos ve ANP Kolokalizasyonunun Belirlenmesi için İkili İndirekt İmmunoperoksidaz İşaretleme Protokolü

Kesitler Tris-HCl tamponda yıkanarak kriyoprotektandan arındırılmalarının ardından sıra ile spesifik olmayan boyanmasının engellenmesi amacıyla %10'luk normal at serumu ile 2 saat, tavşan poliklonal anti-c-Fos (1:20.000, Calbiochem, PC-38, Lot#:D10669) antikoruna ile oda sıcaklığında tüm gece ve biyotinli eşek anti-tavşan IgG (1:300, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA) ile 2 saat inkübe edildi. Takiben yıkanan kesitler avidin-biotin kompleksi (ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) solüsyonunda ile 60 dk. bekletildi. Yıkamanın ardından, kesitlere substrat kromojen solüsyonu (Ni-DAB) 4 dk. süreyle uygulandı. Yıkaması yapılan kesitler, tekrar 2 saat süreyle %10'luk normal at serumuna alındı. Kobay anti-ANP (1:1000, Peninsula, T-5004, Lot#:040847) primer antikoruna ile oda sıcaklığında 24 saatlik inkübasyonun ardından tamponda arındırılan kesitler eşek anti-kobay IgG sekonder antikoruna (1:200) ile 2 saat muamele edildi. Avidin-biotin kompleksi (ABC) solüsyonu ile 1 saatlik inkübasyonun sonrasında yıkanan kesitlere substrat kromojen solüsyonu olan DAB (diaminobenzidine) uygulandı. Lamalara alınan ve kurutulan kesitler ışık mikroskopi inceleme öncesi DPX (BDH) ile kapatıldı.

ii. ANP nöronlarında Glutamaterjik Sinir Sonlanmalarında Veziküler Glutamat Taşıyıcıları VGluT2 ve VGluT3'ün Gösterilmesi İçin İmmunoperoksidaz Boyaması Yukarıda c-Fos ve ANP kolokalizasyon boyamaları için verilen protokol aynen uygulandı. c-Fos antikoruna yerine Tablo 1'de detayı verilen VGluT2 veya VGluT3 antikorları kullanıldı.

iii. ANP Nöronlarında AMPA (GluA1, GluA2) ve Kainat (GluK5 ve GluK1/2/3) Reseptör Alt Birim Protein Ekspresyonlarının İkili İmmünofluoresans Yöntem ile Belirlenmesi

Kesitler, bloklayıcı tampon ile 2 saat bekletildikten sonra, kobay anti-ANP antikoruna ve glutamat reseptör alt birimlerinden birine ait bir antikoruna içeren primer antikor karışımında inkübe edildi. Karışımındaki antikorlar Tablo 1'de verilen dilüsyonlarda hazırlandı ve inkübasyon süresi, karışımındaki en uzun süre inkübasyon gerektiren antikora

göre belirlendi. Yıkamanın ardından, sekonder antikor uygulamasına geçildi. GluK1/2/3 ile işaretlenecek kesitler öncelikle biotinli eşek anti-fare IgG ya da biotinli eşek anti-tavşan IgG (1:200, Jackson Immuno Research Laboratories Inc. West Grove, PA) ile 1.5 saat ve ardından Texas Red-Streptoavidin (1:100, Vector Laboratories) ile 2 saat inkübasyona bırakıldı. Diğer alt birim proinlerinin gösterilmesinde de sekonder antikor karışımı olarak FITC işaretli eşek anti-kobay IgG (1:300, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA) ve Cy3 işaretli eşek anti-tavşan IgG (1:300, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA) ya da FITC işaretli eşek anti-kobay IgG (1:300) ve TexasRed işaretli eşek anti-fare IgG (1:200) karışımı kullanıldı. Yıkama kesitler lamlara alınarak kurutuldu ve Prolong® Antifade Kit (Molecular Probes, Oregon, USA) ile kapatıldı.

### Preparatların İncelenmesi ve İstatistiksel Analiz

İmmünoperoksidaz boyaması yapılan kesitlerin incelemesi Olympus BX-50 fotomikroskopta, ikili immünofluoresans yöntemle işaretlenen kesitlerin incelemesi ise Olympus BX-FLA Reflected Light Fluorescence Attachment adapte Tablo 1. Çalışmada kullanılan antikorların özellikleri

Test Edilen Antikor	Optimum Dilüsyonlar (IF)	Optimum İnkübasyon Süresi	Sıcaklık	Tedarikçi Firma	Katalog Numarası
Kobay anti-ANP 1-28	1.1000, *(1:500)	24 saat	OS	Peninsula	T-5004
Tavşan anti-c-Fos	1:20.000	Tüm gece	OS	Calbiochem	PC-38
Kobay anti-VGlu2	1:5000	Tüm gece	OS	Chemicon	AB5907
Kobay anti-VGlu3	1:5000	Tüm gece	OS	Chemicon	AB5421
Tavşan anti-GluA1	1:250	48 saat	+4 °C	Chemicon	AB1504
Fare anti-GluA2	1:250	24 saat	+4 °C	Chemicon	MAB 397
Tavşan anti-GluK5	1:1000	Tüm gece	+4 °C	Jennes& Eyigör	R52-4
Fare anti-GluK1/2/3	1:1000	48 saat	+4 °C	Chemicon	MAB379

\* Parantez içindeki dilüsyon immünofluoresans (IF) çalışmaları da kullanılmıştır. OS: Oda sıcaklığı

edilmiş Olympus BX50 mikroskopla 40X objektif kullanılarak dijital kamera (Olympus DP71 CCD color camera, 1,5 million pixel) ile bilgisayar ekranına alınan görüntüler üzerinde anında tarama yapılarak gerçekleştirildi.

Çalışmalar kapsamında yapılan tekli ve ikili işaretlemeler sonucu hazırlanan kesitlerin koordinatları Paksinos'un sıçan beyin atlasına<sup>27</sup> göre belirlendi. SON için kullanılacak kesitler bregma -0.48 mm ile -1.44 mm koordinatları arasında seçildi. Bu aralıklarda rostrakaudal düzlemde hipotalamusun 5 farklı seviyesinden alınan kesitlerde sayım işlemleri yapıldı. Kesitlerin birbirine eşit uzaklıkta ve her

denek için aynı koordinatta olmasına dikkat edildi.

İkili immünoperoksidaz işaretlenmiş kesitlerde hem tüm ANP immünopozitif nöronlar hem de c-Fos-pozitif ANP nöronlarının sayıları belirlendi ve her denek için c-Fos işaretli ANP nöronlarının tüm ANP nöronlara oranı hesaplandı. Elde edilen verilerin deney grupları arası varyans analizi ANOVA ile, istatistiki anlamlılık karşılaştırması ise Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı. İstatistiki anlamlılık sınır değeri olarak  $p < 0.05$  alındı.

ANP nöronlarında glutamat reseptör alt birimlerinin ekspresyonunun araştırıldığı ikili immünofluoresan işaretli kesitlerde, ilgili reseptör proteininin ANP ile kolokalize olup olmadığı belirlendi. Konvansiyonel floresan mikroskop kullanımında sinyalin çok hızlı kaybolması nedeniyle kantitatif değerlendirme yapılamadı. Preparatlar ikili boyanan nöronların varlığı ve yoğunluğu açısından değerlendirildi.

### Bulgular

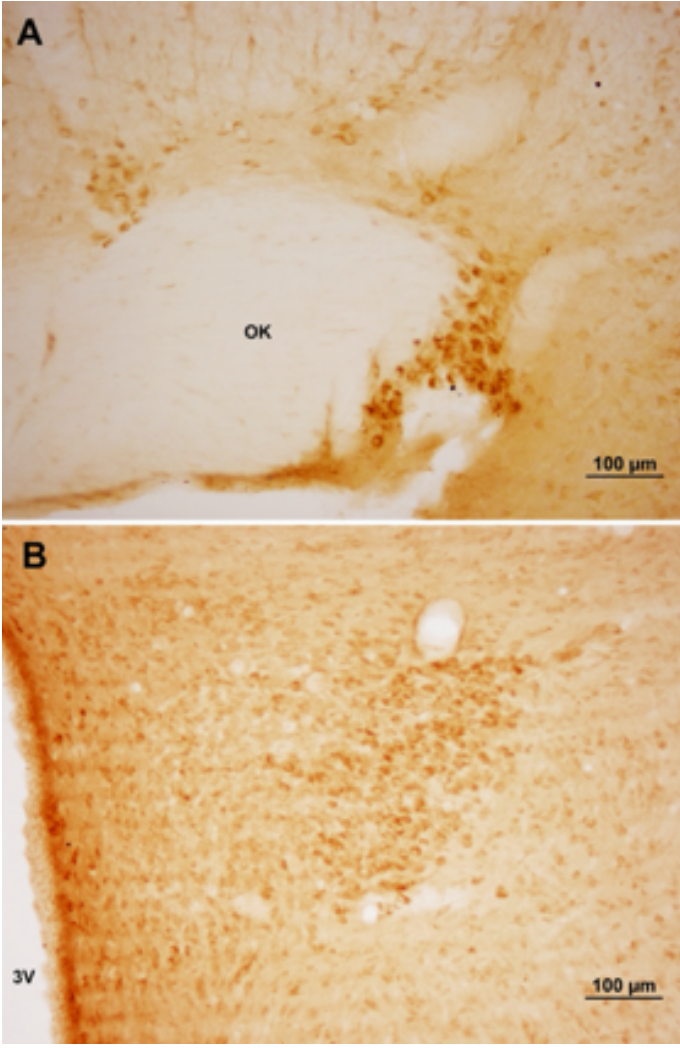
İmmünohistokimyasal İşaretlemelerin Değerlendirilmesi İmmünohistokimya tekniği kullanılarak yapılan ikili immün işaretlemelerde, sitoplazmada eksprese olduğu bilinen ANP proteini DAB kromojeni kullanılarak renklendirildi ve oluşturulan komplekse ait sinyaller ışık mikroskopunda kahverengi olarak belirlendi. Çekirdekte lokalize c-Fos proteini-antikor kompleksi ise nikel amonyum sülfatla zenginleştirilmiş DAB (Ni-DAB) uygulaması ile görünür hale getirildi ve koyu mavi-siyah olarak izlendi. Hem çekirdeğinde (koyu mavi-siyah boyanma) hem de sitoplazmasında (kahverengi boyanma) işaretlenme olan nöronlar ikili işaretlenmiş olarak kabul edildi. İkili immünofluoresan işaretlemeler ile nöronlardaki ANP proteini, yeşil renkte sinyal veren florokromlarla, glutamat reseptör alt birim proteinleri ise kırmızı renkte sinyal veren florokromlarla işaretlendi.

#### ANP Nöronlarının Hipotalamusta Dağılımı

Atrial natriüretik peptid nöronlarına ait immünreaksiyona özellikle supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerde rastlandı. Bu çekirdeklerde çok sayıda nöronun ANP-pozitif olduğu, paraventriküler çekirdekte çoğunlukta olan parvoselüler nöronların ise ANP sentezlediği görüldü (Şekil 1). Ayrıca anteroventral periventriküler çekirdekte (AVPV), suprakiazmatik çekirdekte (SCN) ve arkuat çekirdekte (ARC) az sayıda ANP nöronu saptandı.

#### ANP Nöronlarının Glutamaterjik Aktivasyonu

Çalışmalarımızda ANPerjik sistemin glutamaterjik regülasyonunu belirleyici sonuçlar elde edilmiştir. ANP nöronlarının glutamat agonistlerinin etkisiyle nöronal aktivasyon gösterdikleri belirlenmiştir.



Şekil 1: SON (A) ve PVN'de (B) yerleşik ANP nöronları. OK: optik kiazma, 3V: Üçüncü ventrikül

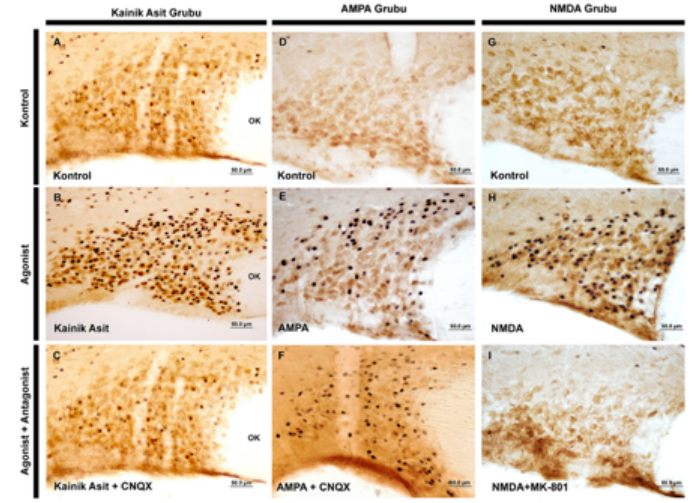
**Kainik asit etkisi:** Kontrol grubunda göz ardı edilebilecek kadar az sayıda c-Fos içeren ANP nöronu görüldü (ortalama %0,04). Kainik asit etkisiyle c-Fos pozitif nöron sayısı %48'e yükselirken, non-NMDA reseptör antagonisti CNQX bu oranı yarı yarıya azaltarak %23'e geriletmiştir. Yapılan istatistiksel incelemeler, hem kainik asitin c-Fos'u eksprese eden ANP nöron sayısını arttırıcı etkisinin, hem de CNQX'in bu artışı baskılayıcı etkisinin anlamlı olduğunu gösterdi ( $p < 0.05$ ), (Şekil 2A-C).

**AMPA etkisi:** ANP nöronlarının bir kısmının glutamat agonisti AMPA'ya duyarlı olduğu, AMPA uygulamasını takiben bu nöronların çekirdekte lokalize c-Fos immüno-reaksiyonunun belirlenmesiyle aktive oldukları görüldü. Ancak antagonist uygulaması bu artış üzerinde bir etki göstermemiştir (Şekil 2D-F).

**NMDA etkisi:** Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, NMDA uygulanan grupta çok sayıda nöronun c-Fos'u eksprese ettiği dolayısıyla bu nöronların aktive oldukları tespit edildi. Deneklere MK-801 antagonistinin verilmesinin ardından, SON'de aktive olan ANP nöron sayısının baskılandığı belirlendi (Şekil 2G-I).

### ANP Nöronları ve VGLuT İçeren Akson Sonlanmaları

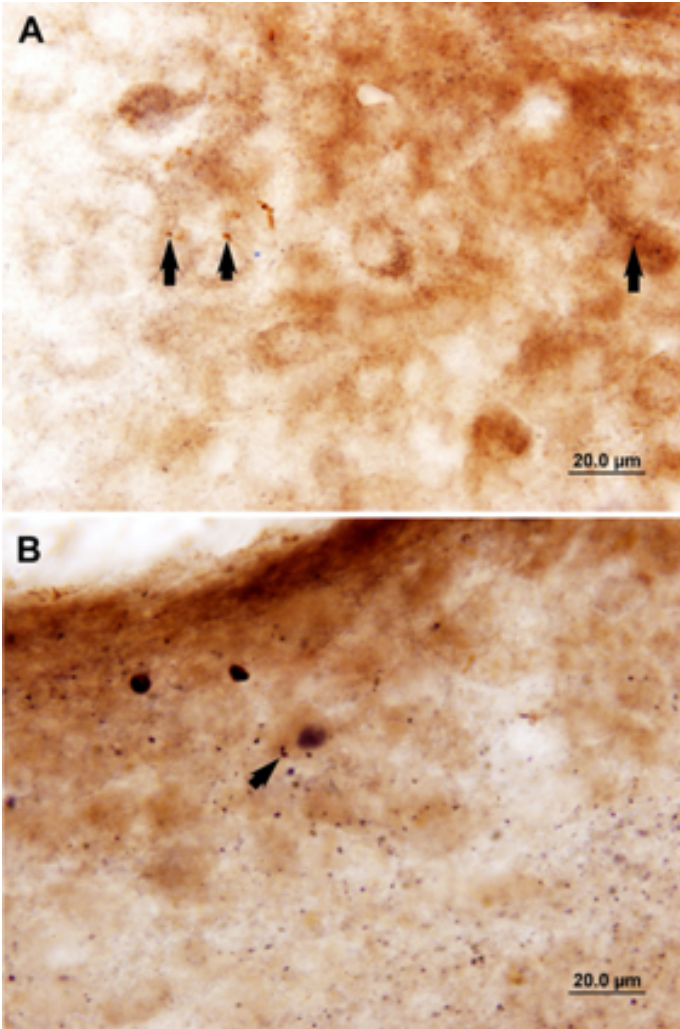
ANP nöronlarının hem VGLuT2 hem de VGLuT3 proteinini içeren akson sonlanmaları ile süperpoze olduğu görüldü. VGLuT2 veya VGLuT3 immünreaktivitesi gösteren akson son düğmecikleri ANP-pozitif nöronlar üzerinde koyu renkli noktalar olarak izlendi (Şekil 3).



Şekil 2: Kainik asit uygulamasının ANP nöronlarındaki c-Fos ekspresyonuna etkisi (A-C). Kontrol grubunda (A) SON'deki ANP nöronlarında c-Fos ekspresyonu görülmezken, kainik asit verilmiş grupta (B) çok sayıda ANP nöronunun aktive olduğu (çekirdekte c-Fos pozitif), CNQX'in etkisiyle de c-Fos-pozitif ANP nöron sayısının azaldığı (C) izlenmektedir. ANP nöronlarında AMPA'nın etkisiyle c-Fos aktivasyonu (D-F). Kontrol grubunda ANP nöronlarında c-Fos ekspresyonu görülmezken (D), AMPA grubunda c-Fos-pozitif nöron sayısının arttığı izlenmektedir (E). CNQX etkisiyle aktive olan nöron sayısında ise azalma görülmemiştir. (F). ANP nöronlarına NMDA'nın etkisi (G-I). Kontrol grubunda (G) c-Fos içeren ANP nöron görülmezken, NMDA'nın etkisiyle aktive nöron sayısının arttığı (H), MK-801 uygulaması sonrası ise bu oranın neredeyse kontrol seviyesine gerilediği görülmektedir (I).

### ANP Nöronlarında Glutamat Reseptör Alt Birimlerinin Ekspresyonu

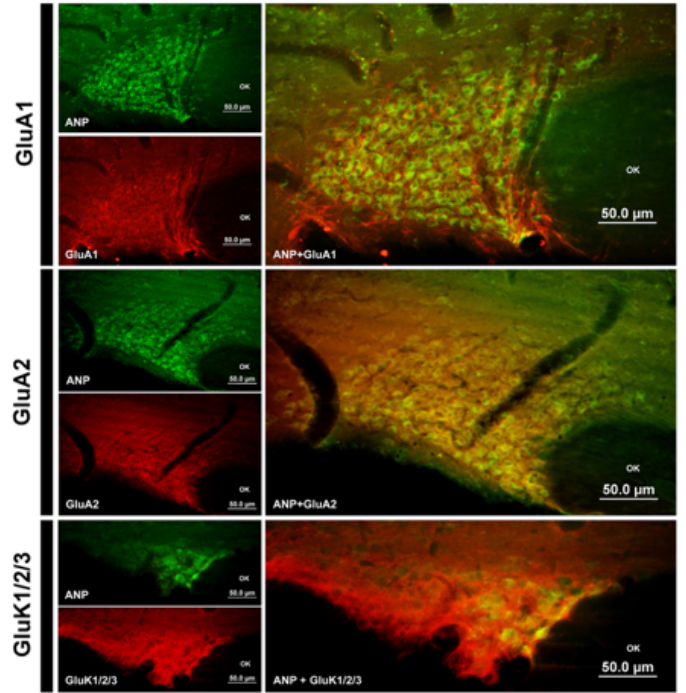
ANP nöronlarında AMPA reseptörlerine ait alt birimlerden GluA1 ve GluA2'ye ait ekspresyon belirlendi. Kainat reseptörlerinden GluK5 alt biriminin çok sayıda ANP-pozitif hücrede sentezlendiği izlendi. GluK1/2/3 antikoruna özellikle SON'de yerleşik ANP nöronlarında immün reaksiyon verdi (Şekil 4).



Şekil 3: Atrial natriüretik peptit nöronlarının VGlut2 (A) ve VGlut3 (B) içeren akson sonlanmalarıyla (siyah oklar) olan ilişkisi.

## Tartışma ve Sonuç

Atrial natriüretik peptit ve reseptörleri beyinde geniş bir şekilde dağılım gösterirler. Ancak anteroventral üçüncü ventrikül bölgesi, bazal medial hipotalamus, beyin sapı ve çevresel organlar bu peptidin eksprese edildiği en belirgin bölgeler olarak tanımlanmıştır<sup>28,29</sup>. ANP immünreaktif nöronlar, hipotalamusun supraoptik, paraventriküler ve periventriküler çekirdeği ile median eminens'in akson ve nöronlarında tespit edilmiştir<sup>30</sup>. Çalışmalarımız kapsamında yapılan immünohistokimyasal boyamalarda ANP nöronlarının beyindeki hipotalamik yerleşimleri belirlenmiştir. ANP sentezleyen nöronların literatürdeki bilgilerle uyumlu olarak<sup>30</sup> en fazla sayıda SON'de ve PVN'nin parvoselüler bölgesinde lokalize oldukları görülmüştür. AVPV ve PVN'de lokalize bir kısım ANP nöronlarına ait aksonlar, median eminens ve nörohipofizde sonlanırlar. Burada portal damarların kan akımını arttıracak şekilde vazodilatasyona neden olurlar. Hipotalamus kaynaklı ANP'nin periferik etkilerini, hipotalamustaki diğer nöronal sistemleri etkileyerek, nörohipofizden salınacak endotelin,  $\alpha$ -melanosit uyarıcı hormon, vazopressin veya oksitosin gibi peptitleri regüle ederek gösterebileceği de düşünülmektedir<sup>31</sup>.



Şekil 4: SON'de yerleşik ANP nöronlarında GluA1, GluA2 ve GluK1/2/3 reseptör protein ekspresyonları. ANP nöronları yeşil renkte, GluA1, GluA2 ve GluK1/2/3 reseptör proteinini eksprese eden nöronlar kırmızı renkte görülmektedir. Sağ panelde üstüste bindirilmiş mikrofotografılarda sarı renkte görülen nöronlar, glutamat reseptörü ile kolokalizasyon gösteren ANP nöronlarıdır. OK: optik kiazma

Merkezi olarak uygulanan osmotik, kolinerjik ve anjiotensinerjik stimülasyonların hem ANP salınımını arttırdığı, hem de supraoptik ve magnoselüler paraventriküler çekirdeklerdeki c-Fos-pozitif nöronların sayısını kayda değer şekilde arttırdığı bildirilmiştir<sup>32</sup>. Glutamatın, ANP nöronlarının bulunduğu bilinen AVPV'ye direkt olarak verildiğinde kan basıncını azalttığı rapor edilmiştir<sup>33</sup>. ANP antagonistinin bu etkiyi ortadan kaldırdığının aynı grup tarafından gösterilmesi<sup>34</sup> ANP nöronlarının glutamaterjik uyarı alabildiğini düşündürmektedir. Çalışmamızda glutamat agonisti kainik asitin enjeksiyonu sonrası, supraoptik çekirdekdeki c-Fos-pozitif ANP nöronlarının oranı kontrolleriyle karşılaştırıldığında bu sayının yaklaşık 50 kat arttığı gözlemlendi. Artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Aynı şekilde, AMPA ve NMDA uygulamalarının da çok sayıda ANP nöronunu etkileyerek aktivasyona neden olduğu belirlendi. c-Fos ekspresyonu nöronlarda genetik aktivasyona yönelik bir etkinin ortaya çıktığını belirten bir gösterge olduğuna göre<sup>35</sup> ANP nöronlarında, senteze ve/veya salgılamaya yönelik bir genetik hareketliliğin, glutamat tarafından tetiklendiğini söylemek mümkündür. Daha önceki çalışmalarda da glutamat agonistlerinin benzer etkilerinin varlığı oksitosin, oreksin, nörostatin ve nesfatin-1 gibi farklı nöroendokrin nöronlarda gösterilmiştir<sup>36-40</sup>. Çalışmamızda glutamat agonistlerinin ANP nöronlarını aktive ettiğinin gösterilmesi, bu nöronların

glutamaterjik uyarıları ya direkt olarak kendi sentezlediği reseptörler aracılığı ile ya da indirekt olarak glutamat sensitif internöronlar aracılığı ile algıladığını düşündürmektedir. Çalışmalarda agonist etkilerinin anlamlı bir şekilde uygun antagonistlerce baskılandığı belirlendi. Kainik asit ve AMPA antagonisti olarak işlev gören CNQX'in özellikle kainat reseptörü antagonizmasında etkili olduğu belirlendi. NMDA reseptör antagonisti MK-801'in etkisiyle de aktive olan nöron sayısının kontrol seviyesine gerilediği tespit edildi. Antagonistlerin anlamlı bir şekilde aktive olan ANP nöronu sayılarını azaltmaları, glutamatın ANP nöronlarındaki düzenleyici etkisinin özgün olduğunu düşündürmektedir. SON'nin, hem kendi içindeki glutamaterjik nöronlardan hem de PVN, suprakiazmatik çekirdek (SCN), ventromedial çekirdek (VMH), dorsomedial çekirdek (DMH), preoptik alan ve mamillar çekirdekte yerleşik glutamat nöronlarından innervasyon aldığı bildirilmiştir<sup>41</sup>. Bizim yayınlanmamış verilerimizde bu alanlardan SON, PVN ve SCN'de yerleşik nöronların aktive olduklarının belirlenmesi, ANP nöronlarının, agonistlere aktivasyon yanıtının oluşmasında bu alanlardaki glutamaterjik nöronlardan uyarı alıyor olabileceğini düşündürdü.

Glutamaterjik nörotransmisyonunda yer alan glutamatın etki mekanizması ile reseptörlerinin alt birim kompozisyonları hakkında pek çok çalışma vardır<sup>23,42</sup>. İn situ hibridizasyon tekniği kullanılarak elde edilen veriler, NMDA reseptör ailesinden GluN1'in, AMPA reseptör ailesinden GluA1'in ve kainat reseptör ailesinden GluK5 alt birim mRNA'larının hipotalamusta en çok ve en yaygın bulunan alt birimler olduğunu gösterirken; NMDA reseptör ailesinden GluN2C ve GluN2D, AMPA reseptör ailesinden GluA3, GluA4 ve kainat reseptör ailesinden GluK1, GluK2 ve GluK3 mRNA'larının daha az hücrede ve daha zayıf bir hibridizasyon sinyaliyle bulunduğunu göstermiştir<sup>43</sup>. Northern blot analiziyle yapılan bir başka çalışmada da GluA1 ve GluA2 transkriptlerinin GluA3-4 ve GluK1-3 transkriptlerinden daha yüksek yoğunlukta bulunduğu bildirilmiştir<sup>44</sup>. İn situ hibridizasyon tekniğinin kullanıldığı bir diğer çalışmada ise SON'deki kainat reseptör alt birimlerinin varlığı mRNA düzeyinde araştırılmış, GluK5'in çok yüksek GluK1'in ise düşük yoğunlukta eksprese edildiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, AMPA reseptör alt birimlerinden GluA2'nin orta yoğunlukta, GluA1 ve GluA3'ün düşük yoğunlukta eksprese edildiği bildirilmiştir<sup>43</sup>. Ancak literatürde ANP nöronlarının glutamaterjik uyarıları alması için gerekli olan glutamat reseptörlerini eksprese ettiklerine dair bir bilgi yoktur. Çalışma sonuçlarımız, non-NMDA glutamat reseptör proteinlerinin (AMPA reseptör alt birimlerinden GluA1 ve GluA2, kainat reseptör alt birimlerinden GluK5 ve GluK1/2/3) supraoptik çekirdekte lokalize ANP nöronlarınca sentezlendiğini göstermiştir.

Glutamat reseptörleri aynı alt birimlerle homomerik, farklı alt birimlerle heteromerik reseptör kompleksleri oluşturarak fonksiyonel hale gelirler<sup>45-47</sup>. Çalışmamız sonucunda fonksiyonel reseptör kanalı oluşturabilecek reseptör alt birimlerinin SON'de yerleşik ANPerjik nöronlarca sentezlendiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar ANP nöronlarında tek başına kanal oluşturamayan GluK5 ile homomerik GluK1, GluK2 veya GluK3 birimlerinin bir araya gelerek fonksiyonel heteromerik kainat-seçici reseptörleri oluşturabileceğini ya da düşük afiniteli homomerik fonksiyonel alt birimlerin (GluK1, GluK2 ve GluK3) kainat reseptör kompleksi oluşturabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde ANP nöronlarında eksprese edildiğini gösterdiğimiz GluA1 veya GluA2 alt birimleri kendi başlarına ya da birlikte bulunarak fonksiyonel AMPA-seçici glutamat reseptörü oluşturabilirler. Dolayısıyla reseptörlerin ANP nöronlarında eksprese edildiklerinin belirlenmesi, bu nöronların glutamat tarafından direkt olarak regüle edilebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmalarda floresan sinyalin hızlı kaybolması nedeniyle kantitatif bir değerlendirmenin yapılamaması önemli bir eksikliktir. Ancak bulgular, kantitatif olmasa da ANP nöronlarında glutamat reseptörlerinin sentezlenebildiğini göstermesi açısından önemlidir.

Nörotransmitter glutamatın nöron gövdesinden akson sonlanmalarına aksonal taşınımında aracı olan veziküller glutamat taşıyıcı proteinler, sadece glutamaterjik nöronlarda bulunması açısından sinir bilimleri çalışmalarında glutamat nöronlarının spesifik işaretleyicisi olarak kullanılmaktadır<sup>48-50</sup>. VGluT1, VGluT2 ve VGluT3 olmak üzere üç izoformu olan bu proteinlerin<sup>51</sup> immünohistokimyasal olarak işaretlenmesi sonucu glutamaterjik akson sonlanmaları butonlar şeklinde görülür<sup>52,53</sup>. VGluT immünohistokimyası yoğun olarak diğer nöronlara temas eden immünopozitif düğmeciklerin işaretlenmesi ve dolayısıyla bu nöronların glutamaterjik innervasyon aldıklarının belirlenmesine yönelik kullanılmaktadır. Nöroendokrin sistemlerin düzenlenmesinde glutamaterjik innervasyonların belirlenmesinde de sıklıkla VGluT immünohistokimyası kullanılmaktadır<sup>54</sup>. c-Fos'u eksprese eden ANPerjik nöronların VGluT içeren sonlanmalarla sinaptik temastaki olmaları, glutamaterjik sistemin direkt olarak ANP nöronlarını etkileyebileceğini göstermesi açısından önem taşımaktadır. Sonuç olarak; ANP nöronlarının glutamat agonistlerine aktivasyon yanıtı vermeleri, üst merkezlerden ya da hipotalamus içerisinden gelen eksitator glutamaterjik uyarıları direkt veya internöronlar aracılığı ile, indirekt olarak algılayabilecek mekanizmaya sahip olduklarına işaret etmektedir. Bu nöronların fonksiyonel glutamat reseptörü oluşturabilecek AMPA ve kainat altbirimlerini sentezlediklerinin saptanması ve üzerlerinde VGluT proteini içeren akson sonlanmalarının belirlenmesi, glutamatın ANP nöronları

üzerindeki düzenleyici etkisini direkt olarak da gösterebileceğini düşündürmektedir. Sonuçlar bütün olarak değerlendirildiğinde, organizmanın sıvı homeostazında glutamaterjik sistemin ANP nöronları üzerinden önemli bir rolü olabileceği söylenebilir. İleri çalışmalarda, aktive olan ANP nöronlarında hangi reseptörlerin eksprese edildiğinin üçlü işaretleme teknikleriyle gösterilmesi glutamatın reseptör-spesifik etkilerinin belirlenmesi açısından önemli olacaktır.

**Teşekkür:** Bu makalede yer alan laboratuvarımıza ait sonuçlar, TÜBİTAK tarafından desteklenen 104S286 nolu proje kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilmiştir.

## Kaynaklar

1. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, et al. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 1981;28(1):89-94.
2. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, et al. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988;332:78-81.
3. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, et al. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990;168(2):863-70.
4. Flynn, TG, de Bold ML, de Bold AJ. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983;117(3):859-65.
5. Hodes A, Lichtstein D. Natriuretic hormones in brain function. *Front. Endocrinol.* 2014;5:1-13.
6. Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, et al. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ. Res.* 1988;62(2):191-195.
7. Tanaka I, Misono KS, Inagami T. Atrial natriuretic factor in rat hypothalamus, atria and plasma: determination by specific radioimmunoassay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984;124(2):663-668.
8. Saavedra JM. Regulation of atrial natriuretic peptide receptors in the rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 1987;7(2):151-173.
9. Chriguera RS, Rocha MJA, Antunes-Rodrigues J, et al. Hypothalamic atrial natriuretic peptide and secretion of oxytocin. *Brain Res.* 2001;889(1-2):239-242.
10. Palkovits M, Eskay RL, Antoni FA. Atrial natriuretic peptide in the median eminence is of paraventricular nucleus origin. *Neuroendocrinology* 1987;46(6):542-544.
11. Johnson AK. The periventricular anteroventral third ventricle (AV3V): its relationship with the subfornical organ and neural systems involved in maintaining body fluid homeostasis. *Brain Res. Bull.* 1985;15(6):595-601.
12. Kawata M, Ueda S, Nakao K, et al. Immunohistochemical demonstration of alpha-atrial natriuretic containing neurons in the rat brain. *Histochemistry* 1985;83(1):1-3.
13. Saper CB, Hurley KM, Moga MM, et al. Brain natriuretic peptides: Differential localization of a new family of neuropeptides. *Neurosci. Lett.* 1989;96(1):29-34.
14. Farina LE, Lipari D, Dieli F, et al. Atrial natriuretic peptide secretion during development of the rat supraoptic nucleus. *Eur. J. Histochem.* 2005;49(4):379-384.
15. Lipari EF, Lipari A, Dieli F, et al. ANP presence in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of developing rat. *Ital. J. Anat. Embryol.* 2007;112(1):19-25.
16. Brann DW, Mahesh VB. Excitatory amino acids: function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation. *Front. Neuroendocrinol.* 1994;15(1):3-49.
17. Brann DW, Zamorano PL, Chorich LP, et al. 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(6):666-672.
18. Gereau RW, Swanson GT, eds. *The Glutamate Receptors*. 1st ed. Totowa NJ: Humana Press; 2008.
19. Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 1994;17:31-108.
20. Bettler B, Mülle C. Neurotransmitter receptors II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 1995;34(2):123-139.
21. Mori H, Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 1995;34(10):1219-1237.
22. Kew JN, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* 2005;179(1):4-29.
23. Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacol Biochem Behav* 2012;100(4):656-64.
24. Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-Fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science.* 1988;240(4857):1328-1331.
25. Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* 1993;14(3):173-213.
26. Eriksson M, Ceccatelli S, Uvnäs-Moberg K, et al. Expression of Fos-related antigens, oxytocin, dynorphin and galanin in the paraventricular and supraoptic nuclei of lactating rats. *Neuroendocrinology* 1996;63:356-367.



27. Paxinos G, Watson C, eds. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam; 2009.
28. Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. Atrial natriuretic peptide in the brain and pituitary gland. *Physiol. Rev.* 1997;77(2):465-515.
29. McCann SM, Antunes-Rodrigues J, Jankowski M, et al. Oxytocin, vasopressin and atrial natriuretic peptide control body fluid homeostasis by action on their receptors in brain, cardiovascular system and kidney. *Prog. Brain Res.* 2002;139:309-328.
30. Chriguer RS, Rocha MJ, Antunes-Rodrigues J, et al. Hypothalamic atrial natriuretic peptide and secretion of oxytocin. *Brain Res.* 2001;889(1-2):239-242.
31. Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. Atrial natriuretic peptide in brain and pituitary gland. *Physiol. Rev.* 1997;77(2):465-515.
32. Lauand F, Ruginsk SG, Rodrigues HLP, et al. Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. *Neuroscience* 2007;147(1):247-57.
33. Ku YH, Zhang T. Brain atriopeptin mediates AV3V depressor response. *Peptides* 1994;15(6):1053-1056.
34. Ku YH, Li YH. Inhibitory effect of atriopeptinergic neurons in AV3V region on AngiotensinII pressor system in rat brain. *Peptides* 2004;25(4):615-620.
35. Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol* 1993;14(3):173-213.
36. Minbay FZ, Eyigor O, Cavusoglu I. Kainic acid activates oxytocinergic neurons through non-NMDA glutamate receptors. *Int. J. Neurosci.* 2006;116(5):587-600.
37. Eyigor O, Minbay Z, Cavusoglu I. Activation of orexin neurons through non-NMDA glutamate receptors evidenced by c-Fos immunohistochemistry. *Endocrine* 2010;37(1):167-72.
38. Eyigor O, Minbay Z, Kafa IM. Glutamate and Orexin Neurons. *Vitam. Horm: Sleep Hormones* 2012;89:209-222.
39. Serter Kocoglu S, Gok Yurtseven D, Minbay FZ, et al. Glutamatergic activation of neuronostatin neurons in the periventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Sci.* 2020;10(4):217.
40. Gok Yurtseven D, Serter Kocoglu S, Minbay Z, et al. Immunohistochemical evidence for glutamatergic regulation of nesfatin-1 neurons in the rat hypothalamus. *Brain Sci.* 2020;10(9):630.
41. Csaki A, Kocsis K, Kiss J, et al. Localization of putative glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the supraoptic nucleus area of the rat hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 16(1):55-68.
42. Malarkey EB, Parpura V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem. Int.* 2008;52(1-2):142-154.
43. Eyigor O, Centers A, Jennes L. Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 2001;434(1):101-124.
44. van den Pol AN, Hermans-Borgmeyer I, Hofer M, et al. Ionotropic glutamate receptor gene expression in hypothalamus: localization of AMPA kainate and NMDA receptor RNA with in situ hybridization. *J. Comp. Neurol.* 1994;343(3):428-44.
45. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, et al. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 1992;256(5060):1217-1221.
46. Howe JR. Homomeric and heteromeric ion channels formed from the kainatetype subunits GluR6 and KA2 have very small, but different, unitary conductances. *J. Neurophysiol.* 1996;76(1):510-519.
47. 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(6):793-806.
48. Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, et al. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 2000;407(6801):189-94.
49. Moriyama Y, Yamamoto A. Glutamatergic chemical transmission: Look! Here, There, and anywhere. *J. Biochem.* 2004;135(2):155-63.
50. Takamori S. VGLUTs: 'Exciting' Times for Glutamatergic Research?. *Neurosci Res* 2006; 55(4):343-351.
51. Liguz-Leczna M, Skangiel-Kramska J. Vesicular Glutamate Transporters (VGLUTs): the Three Musketeers of Glutamatergic System. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)* 2007;67(3):207-18.
52. Kaneko T, Fujiyama F. Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci. Res.* 2002;42(4):243-250.
53. Kaneko T, Fujiyama F, Hioki H. Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 2002;444(1):39-62.
54. Hisano S, Nogami H. Transporters in the neurohypophysial neuroendocrine system, with special reference to vesicular glutamate transporters (BNPI and DNPI): a Review. *Microsc. Res. Tech.* 2002;56(2):122-131.