

Sıçan Beyninde Opiyad Reseptörlerinin Otohistoradyografik Yöntemle Gösterilmesi*

Süreyya CEYLAN
Afet Solmaz ÖZORAN
Savaş CEYLAN
Bikem SÜZEN
Suat ERKUL
Yavuz ÖZORAN
Gülay YEĞİNOĞLU
Gürcan ÜREMEK

AUTORADIOGRAPHIC LOCALIZATION OF
OPIATE RECEPTORS IN RAT BRAIN

K.T.Ü. Tıp Fak. Histoloji-Embriyoloji, Anatomi B.D. ve Patoloji A.B.D.,
Trabzon Numune Hast. Beyin Cerrahi B.D. ve Trabzon Doğum Hast. Patoloji A.B.D.

Geliş Tarihi: 26 Haziran 1989
Kabul Tarihi: 12 Ekim 1989

ÖZET

Bu çalışmada, çeşitli beyin bölgelerindeki endojen opiyad reseptörlerinin otohistoradyografik olarak dağılımı gösterildi. Locus sereleus, korpus striatum ve interpedinküler nükleus çok yoğun, thalamik sahalar orta derecede, serebellum, derin serebral korteks ve hipokampus az yoğunlukta grain dansitesi gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Opiyad reseptörleri, otohistoradyografi, Beyin.

T Kİ Tıp Bil Araş Dergisi, C.8, S.4, 1990, 314-318

SUMMARY

In this study, the localization of opiate receptors in various brain regions has been demonstrated, autoradiographic examination showed for with very high densities in the locus coeruleus, corpus striatum and interpeduncular nucleus, with moderate densities in the cerebellum, deep cerebral cortex and hippocampus.

KeyWords: Endogen opiate receptors, Autoradiographic, Brain.

T J Research Med Sri V.8, N.4, 1990, 314-318

GİRİŞ

Son on yıl içerisinde endojen opiyad reseptörlerinin çeşitli beyin bölgelerindeki dağılımı ile ilgili olarak bir çok çahşma yapılmıştır (2,3,4,5,6,7,12). Günümüzde önemi hızla artan endojen opiyad reseptörlerinin beyin bölgelerindeki dağılımlarının otohistoradiografik yöntemle gösterilmesi amacıyla bu çahşma yapılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezinden sağlanan homogen bir suştan 150-200 g ağırlığında 30 adet erkek beyaz sıçan kullanıldı. Ön çalışmalarda kontrol grubu hayvanların bir kısmında kuyruk venlerini bulma ve çok kısa sürede spinal kord, medulla ve beynin çıkarılması alıştırmaları yapıldı. Deney öncesi, hayvanlara 40mg/kg nembutal intraperitoneal

olarak uygulandı. Daha sonra 200 u, CI[H3] diprenorfin* 0.3 ml serum fizyolojik ile kuyruk veninden her sıçana enjekte edildi. Kontrol grubu sıçanlara yalnızca 0.3ml serum fizyolojik kuyruk veninden verildi.

Difrenorfinin reseptörlere bağlanması için gerekli olan bir saatlik süre sonunda hem deney grubu hemde kontrol grubu sıçanlarda ponstan itibaren tüm beyin bölgeleri total olarak çok kısa sürede ve zedelenmeden çıkarıldı. Pons ve beynin diğer bölümleri frozen kesit aletinde -20°C şok ile dondurulduktan sonra transvers planda 2-3 mm ilk kesiler yapıldı. Bu doku parçalarından Reichert-Jung Cryocut E frozen kesit aleti ile 6-10 mikrometre kalınlığında kesitler asit solusyonuyla yıkanmış temiz lamalar üzerine alındı. Önceden hazırlanmış karanlık odada distile su ile 1:1 oramda sulandırılmış ışık mikroskopik otobistoradyografi tekniğinde kullanılan ve [H3]

*Bu çahşma Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. (Kod no: 86.114.001.1)



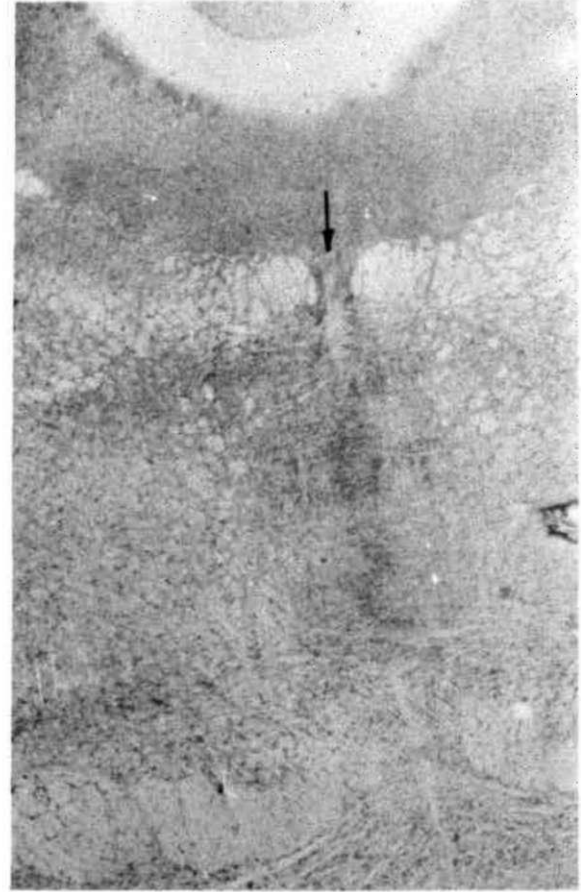
Şekil 1: [H3] diprenorfin verilmiş sıçanda ponsda 5. kranial sinirin kök liflerinin çıktığı yerin üst seviyesinden yapılan transvers bir kesitt 4. ventrikülün lateral tarafından grain yoğunluğu çok fazla olan lokus sereleus (ok) izlenmektedir. Pironin-Y x 3.2.

diprenorfin ile uyumlu özel fotoğraf emülsiyonu Kodak NTB3** (Nüclear track solüsyonu) 25 ml lik beherglass içine tek tek daldırılarak kesit yüzeylerinin emülsiyonla kaplanması sağlandı. Kesitin bulunmadığı lam yüzeyi yumuşak kağıtla silinerek temizlendi. Silikajel yerleştirilmiş özel kutulara alman lamlar karardık odada 2-4°C ye ayarlanmış buzdolabına kaldırıldı. Fotoğraf emülsiyonunun poz süresi için 4-8 hafta gerekli oldu. Bu süre sonunda her grupta kontrol preparatlarının banyosu ile tespit edildi.

İnkübasyon periyodu sonunda emülsiyon kaplı lamlar oda sıcaklığına getirildi. Her preparat

* [H3] ile işaretlenmiş opiyad antagonist diprenorfin [15,16(n)-H3] (25-50 CIlmmo) ingiltere'den Amersham laboratuvarlarından temin edildi.

** Kodak NTB3 fotoğrafemülsiyonu (Eastman Kodak Rochester Nüclear Tract solüsyonu) Dubai, Birleşik Arap Emirlikleri (U.A.E) den temin edildi



Şekil 2: [H3] diprenorfin verilmiş sıçanda 5. kranial sinirin çıkış yerinden yapılan transvers bir kesitte ponsa ait panoramik görünüm izlenmektedir. Ok, median rafe, S. serebellum. Prironin-Y x 3.2.

karanlık odada özel şalelerde dektol (Siyah-beyaz film banyosu) ve film tespit solüsyonu ile muamele edildi. Mikroskop altında banyo işlemi kontrol edilen lamlar Carnoy solüsyonuyla tespitten sonra Pironin-Y ile boyandı. Lamlar balsam ile kapatıldı. Elde edilen preparatlar kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak mikroskop altında incelendikten sonra Carl-Zeiss Jena-Jenoval marka fotomikroskopunda siyah-beyaz (orwo ve renkli (kodak) filmleri çekildi.

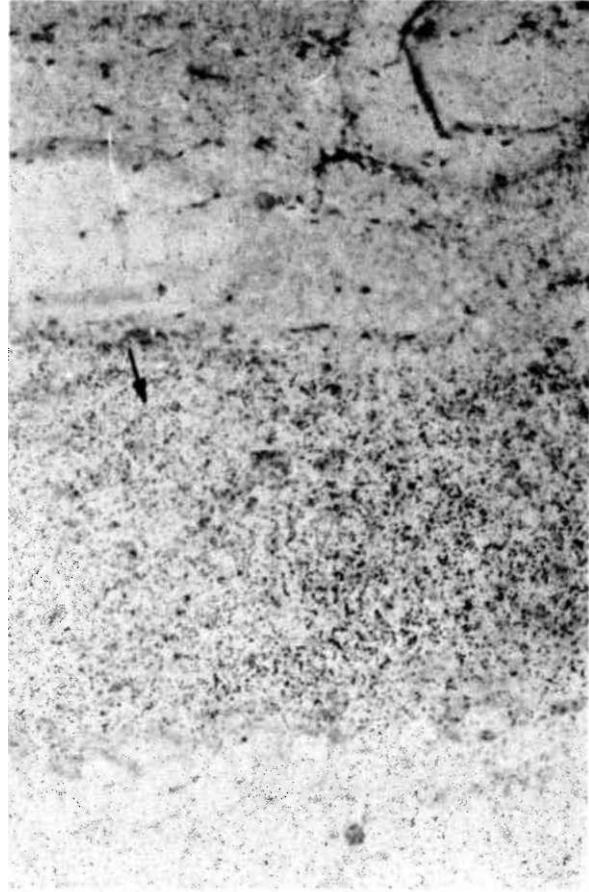
BULGULAR

200mCi [H3] diprenorfin verilen sıçanların santral sinir sisteminden elde edilen kesitlerde



Şekil 3: [H3] diprenorfin verilmiş sıçanda ponto-serebellar kavşaktan yapılan transvers bir kesitte serebellumun (ok) son derece az grain yoğunluğu gösterdiği izlenmektedir. Pironin-Y x 32.

grain yoğunluğu Atweh'e (1) göre ayrı ayrı değerlendirildi. Buna göre [H3] diprenorfin tutulumu gösteren alanlar az yoğun, orta derecede yoğun, yoğun ve çok yoğun olarak derecelendirildi. [H3] diprenorfin verilen sıçanların pons seviyesinden yapılan seri kesitlerde 4. ventrikülün lateralinde lokus sereleus'da grain yoğunluğu çok fazla olarak izlendi (Şekil 1). Aynı zamanda median rafenin her iki yanında formasyo retikularise ait retikülotegmental nükleusta çok yoğun grain dağılımı görüldü (Şekil 2). Bu bölgeden elde edilen serebellum kesitlerinde de serebellar kortekste grain dağılımı son derece az yoğun bulundu (Şekil 3). Mezensefalondan elde edilen seri kesitlerde yalnızca periaquaduktal gri cevherde grain dağılımı yoğun olarak izlendi (Şekil 4). [H3] diprenorfin verilmiş



Şekil 4: [H3] diprenorfin verilmiş sıçanda mezensefalondan elde edilen transvers kesitte preiaquaduktal gri cevherde yoğun grain dağılımı izlenmektedir (ok). Pironin-Y x25.

sıçanlarda çeşitli seviyelerden elde edilen beyin kesitlerinde tüm kortekste grain dağılımı az yoğundu. Aynı şekilde priform korteks, hipokampus, girus dentatus, hipotalamusda grain dağılımı az yoğun olarak bulundu.

Talamus bölgesinde ise talamusun sub-nüklear gruplarından olan ventral letarel nükleusun ventral posteromedial, ventral posterolateral nükleusları ayrıca talamik retiküler nükleuslarda grain dağılımı orta derecede yoğun izlendi (Şekil 5).

[H3] diprenorfin verilmiş sıçanlarda inter-ventriküler foramen seviyesinden yapılan transvers kesitte korpus striatumda grain dağılımı çok yoğun olarak izlendi (Şekil 6).



Şekil 5. [H3] diprenorfin verilmiş sıçanlarda, talamusun subnüklear gruplarından olan ventral lateral nükleusun, ventral posteromedial (VPM), ventral posterolateral (VPL),aynca talamik retiküler (TR) nükleuslarda grain yoğunluğu orta derecede izlendi. V, III. ventrikül. Pironin-Y x3.2.

TARTIŞMA

Birçok araştırmacı ponsda yapılan seri kesitlerde grain dağılımı yönünden çok yoğun görülen bölgelerin lokus sereleus (locus coeruleus), interpedinküler nükleus, periventriküler gri cevher olduğunu bildirmişlerdir.

Pert ve arkadaşlarınınca yapılan çalışmada beyincik kesitlerinde grain dağılımı az yoğun olarak tespit edilmiş, çok yoğun bölgenin lokus sereleus, periventriküler gri cevherin ve interpedinküler nükleus olduğu vurgulanmıştır (9). Grain dağılımının çok yoğun olduğu bölge olan lokus sereleus 4. ventrikülün üst kısmının lateral kenarında yer alır. Bu pigmentli nükleusun önemi



Şekil 6. [H3] diprenorfin verilmiş sıçand interventriküler foraseviyesinden yapılan transkors kesitte korpus striatumda çok yoğun grain dağılımı olan bölgeler izlenmektedir. Pironin-Y x 3.2.

uzun süre anlaşılammıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda trigeminal nükleusla ilişkili olabileceği, retiküler formasyoya inen lifler verdiği ve ponsun pnömotaksik merkezleri ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür.

1977 yılında Bird ve arkadaşlarınınca yapılan çalışmada lokus sereleus diğer beyin sahalarına uzanan ve nor-adrenalin içeren nöranal sistem içinde olduğu ileri sürülmüştür. Lokus sereleustaki nor-adrenarjik hücrelerin endojen opiyadlar tarafından etkilendiği elektro-fizyolojik olarak gösterilmiştir (3).

Korf ve arkadaşları ise lokus sereleustaki nöronların aktivitelerini sistemik olarak analjezik

dozlarda morjin ahmı ile değıştirebileceğini göstermişlerdir (8).

Başka bir çalışmada da, spinal trigeminal nükleus nöronlarının sitümülasyonu üzerindeki inhibitör etkisini azalttığını göstermişlerdir (10). Çeşitli anatomik ve biyokimyasal tekniklerle lokus sereleustan çıkan nor-adrenalin yollarının orta beyin dorsal kısmına, diensefalik seviyede orta ön beyin kısmına ve septal bölgeye uzandığı gösterilmiştir. Bu nedenle lokus sereleustaki lezyonlar nor-adrenalin sinir terminallerini etkilemektedir (3,11).

Çalışmamızda ponsdan yapılan seri kesitlerde periventriküler gri cevher ve lokus sereleus otohstoradyografik grain dağılımı yönünden çok yoğun alanlar olarak dikkati çekti. Aynı zamanda ponsda median rafenin her iki yanmda formasyo retikularise ait retikülotegmental nükleusta çok yoğun madde tutulumu izlendi.

Çeşitli kaynaklarda belirttiği gibi beyincik grain dağılımı yönünden az yoğun alanlara uyuyordu.

Pert ve arkadaşları mezensefalonda akuaduktus mezensefalinin etrafındaki periakuaduktal gri cevherde grain dağılımı yoğun olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda bu bölgede grain dağılımı yoğun olarak bulunmuştur.

Otohstoradyografik çalışmalarda beyin korteksinde opiyad reseptörlerle ilgili grain dağılımı yönünden, az yoğun olarak bulunmuştur. Piriform korteks, grius dentatus, hipokampus, hipotalamus bölgesinde de grain dağılımı az yoğundur. Buna karşın korpus sitriatumda grain dağılımı çok yoğun

olarak bildirilmiştir. Talamus bölgesinde ise orta derecede grain yoğunluğu dikkati çekmiştir (9).

Çalışmamızda da üst beyin kesitlerinde grain dağılımı yönünden korpus sitriatum çok yoğun alanlara uyuyordu. Talamusun subnüklear gruplarından olan ventral posteromedial, ventral posterolateral, ayrıca talamik retiküler nükleuslarda grain dağılımı orta derecede yoğun görüldü.

Grain dağılımının çok yoğun görüldüğü korpus sitriatum dopaminerjik reseptörlerin en yoğun bulunduğu bölgedir. Bu bulgular gerek lokus sereleus gerekse korpus sitriatumda endojen opiyadların etkilerini, katekolamin reseptörlerini sitümüle ederek sağladığı görüşünü desteklemektedir. Böylece lokus sereleus ve korpus sitriatumdaki reseptörler giderek daha az grain yoğunluğu gösteren diğer kortikal ve serebellar bölgelerdeki nörol aktiviteyi etkilemektedir.

Bu çalışmanın verileri ile şu sonuca ulaşılmıştır.

Otohstoradyografik olarak enMojen opiyad reseptörleri lokus sereleus ve korpus sitriatumda çok yoğun grain dağılımı belirlenmiştir. Bu bölgelerde katekolamin reseptörlerinin de çok fazla bulunması opiyadların gerek adrenarjik, gerekse dopaminerjik reseptörleri etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bu sonuç henüz tartışılmakta olan endojen opiyadların fizyolojik etkilerini açıklamakta yararlı bir bilgi olarak kabul edilebilir.

1. Atweth SF, Kuhar MJ. Autoriographic localization of opiate receptors in rat brain. I. Siplal conJRand lower medulla. *Brain research*. 12:53-67,1977.
2. Bardo MT, Bhatnagar RK. Chronic naltrexone increases opiate binding in brain and produces supersensitivity to morphine in the locus coeruleus of the rat. *Brain research* 289: 223-224,1983.
3. Bird SJ, Kuhar MJ. Iontophoretic application of opiates to the locus coeruleus. *Brain research*. 122:523-533,1977.
4. Brzewlocko B; Stala L. The effect of various criate recetör agonists on the seizure threshold in the rat. Is dynorgin on endogeneous anticonvulsant. *Life Sciences*. 33: 595-598,1983.
5. Dray A, Nunan L. Opioid inhibition of reflex urinary bladder contractions. Dissociation of supkaspinal and spinal mechanisms. *Brain research*. 337: 142-145,1985.
6. Faden A. Opiate antagonists and thyrotropin-releasing hormone. *Jama*. 252:1177-1180,1984.

7. Hamm RJ, Knisely JS. Environmentally induced anal gesia: An age-rdelated decline in an endogenous opioid system. *Journal of Gerontology*. 3:268-274,1985.
8. Korf J, Bunney BS. Noradrenergic neurons: Morphine inhibition of spontaneous activity. *Europ. J. Pharmacol*. 25: 165-169,1974.
9. Pert CB, Kuhar MJ. Autoradiographic localization of the opiate receptor in rat brain. *Life Science*. 16:1849-1851, 1975.
10. Sasa M, Munekiyo K. Morphine interference with noradrenalinemediated inhibition from locus coeruleus. *Life Science*. 17:1373-1380,1975.
11. Trevino DL, Carstens E. Confirmation of the location ofspinothalamic neurons in the cat and monkey by the retrograe transport of horseradish peroxidase. *Brain research*. 98: 177-182,1975.
12. Zaloga GP, Hostinsky C. Endogenous opioid peptides. Critical care implications. *Reviews in critical care*. 13: 421-430,1984.