

156926

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

**NİKOTİNİN GENÇ VE YAŞLI RATLARDA HİPOKAMPÜSTE
LİPİD PEROKSİDASYONU, NİKOTİNİK ASETİLKOLİN $\alpha 7$
RESEPTÖRÜ VE NR2A VE NR2B RESEPTÖR
DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

Dr. DUYGU KUMBUL DOĞUÇ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. NAMIK DELİBAŞ

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından
554 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA - 2004

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR

KISALTMALAR

1. GİRİŞ

2. GENEL BİLGİLER

- 2.1. Nikotin
- 2.2. Kolinerjik Sistem
 - 2.2.1. Asetilkolin
 - 2.2.2. Kolinerjik Sinir Sisteminin Organizasyonu
 - 2.2.3. Kolinerjik Reseptörler
 - 2.2.4. Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri (nAChR)
 - 2.2.5. Nikotinin MSS'inde Kolinerjik Sistem ve Diğer Sistemlerle Etkileşimi
 - 2.2.6. Nikotin, Nikotinik sistem ve Bazı MSS Hastalıklarıyla İlişkisi
- 2.3. Glutamat Reseptörleri
 - 2.3.1. NMDAR
- 2.4. Nikotin, Nikotinik Kolinerjik Sistem ve Glutamaterjik Sistem Etkileşimi
- 2.5. MSS ve NO
- 2.6. MSS ve Oksidatif Stres
 - 2.6.1. Nikotin ve MSS'inde oksidatif stres

3. MATERYAL-METOD

- 3.1. Materyal
 - 3.1.1. Deney Hayvanları
 - 3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Aletler
 - 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler
 - 3.1.4. Kullanılan Çözeltiler
- 3.2. Metod
 - 3.2.1. Homojenizasyon
 - 3.2.2. Lipid Peroksidasyonu Tayini
 - 3.2.3. NO Tayini
 - 3.2.4. SDS-PAGE Yöntemi
 - 3.2.5. Western Blot Yöntemi
 - 3.2.6. İstatistiksel Analiz

4. BULGULAR

5. TARTIŞMA

ÖZET

SUMMARY

KAYNAKLAR

TEŞEKKÜR

Biyokimya uzmanlık eğitimim boyunca donanımlı bir eğitim almamda büyük emeği geçen tez danıőmanım ve Anabilim Dalı Baőkanımız Prof.Dr. Namık DELİBAŞ'a teşekkür ederim. Ayrıca tezimi hazırlanmamda bana destek ve yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Recep SÜTÇÜ'ye ve ihtisasım boyunca bana katkılarından dolayı hocalarım Doç.Dr. Fatih GÜLTEKİN'e, Doç.Dr. İrfan ALTUNTAŐ'a, Doç.Dr. Hüseyin VURAL'a ve Yrd.Doç.Dr. Mehmet AKDOĞAN'a teşekkür ederim.

Tez çalıőmam süresince her zaman yardım ve destekleriyle yanımda olan başta Dr.Özlem Öztürk ve Dr. Burcu Fenercioğlu'na ve diğer asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimi hazırlarken vakitlerinden çaldığım için her türlü kaprislerini bana yaőatan dünya tatlısı kızıma ve eőime var oldukları ve benim oldukları için teşekkür ederim.

KISALTMALAR

AA	Araşidonik Asit
A β	Amiloid β -peptid
ACh	Asetilkolin
AH	Alzheimer Hastalığı
ALS	Amniyotrofik Lateral Skleroz
AMPAR	α -amino-3-hidroksi-5-metil İzoksozole Propionat tercih eden reseptörler
APP	β -amiloid Prekürsör Protein
APV	2-amino-5-phaphonovalerikasit
CAMKII	Ca ⁺² Kalmudiline Bağımlı Proteinkinaz II
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
Cat	Katalaz
cGMP	Guanozin Monofosfat
ChAT	Kolin Asetiltransferaz
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3 dione
CHO	Chinese Hamster Ovary
DH β E	Dihydro- β -erythroidine
EEG	Elektroensefalografi
EPSP	Eksitatör Postsnaptik Potansiyel
GSH	Glutasyon
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KAR	Kainat tercih eden reseptörler
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LTD	Long Term Depression
LTP	Long Term Potentiation
MDA	Malondialdehid
MLA	Methyllycaconitine
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
mAChR	Muskarinik Asetil Kolin Reseptörleri
nAChR	Nikotinik Asetil Kolin Reseptörleri
NMDAR	N-metil-D-aspartat tercih eden reseptörler
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NS-DA	Nitrostriatal Dopaminerjik
PD	Parkinson Hastalığı
PKA	Proteinkinaz A
PKC	Proteinkinaz C
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	Reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBARS	Tiobarbitürik asit reaktif substansları

1.GİRİŞ

Nikotin piridin ve pirolidin halkasından oluşan ve tobacco bitkisinin yapraklarından izole edilen alkaloid bir bileşiktir. Sigara dumanının önemli bir komponentidir (1).Nikotin kan beyin bariyerini geçerek endojen nörotransmitter ACh gibi davranır ve beyinde birden çok reseptör subtipiyle etkileşime girer (2).

Sigara tiryakilerinde nikotinin, özellikle dikkat isteyen işlerde performansı arttırdığı gösterilmiştir. Sigara kullanmayanlara nikotin yamaları yapıştırularak dikkat ve uyanıklıkta gelişme sağlandığı rapor edilmiştir (3). Alzheimer hastalığında (AH) kognitif disfonksiyonunun kortex ve hipokampusta nikotinik reseptörlerde dramatik bir düşüşle beraberdir. Bu veriler nikotin ile nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR) üzerinden nöroprotektif etki sağlanabileceğini düşündürmektedir (4-6).

Nikotinik bazlı terapötik yaklaşım AH, Şizofreni, Dikkat Bozukluğu ve Hiperaktivite Hastalığı gibi çeşitli kognitif bozukluklarla seyreden hastalıkların tedavisinde yararlı olabilir (5,6).

Rat hipokampüsünde $\alpha 7$ nikotinik reseptörler yüksek konsantrasyonda bulunmuştur. Nikotinik $\alpha 7$ reseptörlerin fonksiyonel rolü hala araştırılmaktadır. $\alpha 7$ nikotinik asetilkolin reseptörlerinin ratlarda selektif stimülasyonu ile hafızanın geliştirilebildiği gösterilmiştir. Bu etki için hipokampüsün kritik bir bölge olduğu düşünülmüştür. $\alpha 7$ nikotinik asetilkolin reseptörlerinin stimülasyonu bu reseptörleri hipokampal long term potensiyalizasyon (LTP) olayı ile ilişkilendirilmiştir. Selektif $\alpha 7$ agonistlerle yapılan deneysel çalışmalarda genç ve yaşlı ratlarda kısa süreli hafızayı anlamlı bir şekilde geliştirebildiği saptanmıştır (4).

Nikotin direk nikotinik reseptör subtipleri üzerinden ve çeşitli nörotransmitterlerle etkileşimlerle kompleks ve çeşitli etkilerini gösterir. Bu etkileşimlerin mekanizmasını anlamak hafıza fonksiyonu üzerine nikotin etkisinin kompleks doğasını anlamaya yardımcı olacaktır. Nikotin çeşitli nörotransmitterlerin salınımını stimüle eder. Hafıza üzerine nikotinik etkilerin önemli yönü nikotin ile indüklenen nörotransmitter salınımının sekonder etkileriyle yönlendiriliyor olabilmesidir (7).

Glutamat reseptör sistemi ve nikotinik sistem arasında direk etkileşim vardır. Nikotin glutamat salınımını stimüle etmektedir. Çok çeşitli farmakolojik etkileri de bu mekanizmayla yönlendiriliyor olabilir. Glutamat reseptör sistemleri özellikle de glutamat N-metil-D-aspartat tercih eden reseptör (NMDAR) subtipinin hafıza fonksiyonu üzerinde çok önemli olduğu gösterilmiştir. Özellikle kognitif fonksiyonla ilgili olarak, hipokampüste nikotin ile indüklenen glutamat salınımı çok önemlidir. Daha önceki çalışmalarda hipokampal glutamat

NMDA sistemleri ve hipokampal nikotik sistemler hafıza fonksiyonu için önemli bulunmuşlardır (7).

Eksitatör sinaptik transmisyon nAChR'lerinin modülasyon için muhtemel hedefidir. Nikotin, presinaptik nAChR'lerini aktive ederek glutamat salınımı yapan sinir terminallerine Ca^{+2} iyonlarının girişini sağlayarak glutamaterjik sinaptik aşırımı arttırdığı düşünülmektedir (8). Salınan glutamat kognitif işlemlerde özellikle rol oynayan NMDAR tipinin de içinde bulunduğu çok sayıda postsinaptik reseptörü aktive eder. Postsinaptik hücrelerdeki NMDAR kanallarından Ca^{+2} kalmodulin aktive olur. Kalmodulin ise nitrik oksit sentazı (NOS) stimüle ederek nitrik oksit (NO) üretilmesini sağlar. Sonuçta NO soluble guanilil siklazı aktive ederek cGMP üretir. Nöronal olarak üretilen NO'nun hafıza formasyonunda rol oynadığına dair bazı kanıtlar vardır. NO, nikotinin MSS'de etkisinde aracı veya sonuç moleküllerden biri gibi görünmektedir. Bu yaklaşımların ışığında çalışmamızda hipokampus NO düzeylerini inceledik (8-10).

Serbest radikaller, AH, Parkinson hastalığı (PH) gibi yaşlanma sürecinin kronik hastalıklarının başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynarlar (11,12). Yaşlanma sürecinde oksidan ve antioksidan sistem arasındaki denge daha çok oksidan yöne kaymaktadır. Ancak PH ve AH riski ile sigara kullanımı arasında ters bir orantı olduğu çeşitli epidemiyolojik araştırmalarla ortaya konmuştur. Sigara dumanı içindeki bileşiklerden biri olan nikotinin bu etkilerden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Bilimsel çalışmalar göstermiştir ki sadece sigara kullanımı değil nikotin sakızı, nikotin yamaları da PH'de tremorları ve bradikineziyi azaltır. AH'de de dikkat, bilginin işlenmesi gibi fonksiyonları geliştirir. Ayrıca genç ve yaşlı ratlarda nikotin tedavisinin kognitif fonksiyonları düzelttiği görülmüştür (13). PH ve AH patogenezinde serbest radikaller ve demir (Fe) ile indüklenen oksidatif stresin rol oynadığına dair kanıtlar artmaktadır. (13) PH ve AH'de nikotinin sağladığı yararlı veya koruyucu etkilerin en azından bir kısmının antioksidan mekanizmalarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. (2)

Biz de bu çalışma ile subkronik nikotin uygulamasının öğrenme ve hafıza ile ilişkili yollarda görev yapan NR2A, NR2B ve bunların hipokampus $\alpha7$ nAChR konsantrasyonu ile ilişkisini ve reseptör konsantrasyon değişimleriyle doku malondialdehit (MDA) ve NO düzeylerine bakarak oksidan sistem ile arasındaki ilişkiyi saptamayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Nikotin

Nikotin piridin ve pirolidin halkasından oluşan ve tobacco bitkisinin yapraklarından izole edilen alkaloid bir bileşiktir. Sigara dumanının önemli bir komponentidir (1). nAChR'leri üzerinden nöronlarda ve diğer hücrelerde agonist gibi davranırlar. Nikotin kan beyin bariyerini geçerek endojen nörotransmitter asetilkolin (ACh) gibi davranır ve beyinde birden çok reseptör subtipiyle etkileşime girer (2). Nikotin MSS'yi etkileyerek yüksek derecede tiryakiliğe neden olur. İnsanların en sık kullandığı maddedir. Sadece sigara tiryakileri değil sigara kullanmayanlar da pasif olarak nikotine maruz kalırlar (14).

Tütünün genel özellikleri:

Tütün yaklaşık 3500-4000 bileşik içerir. Dumanı gaz ve partikül fazlarına ayrılabilir. Gaz fazı; başlıca karbonmonoksit, karbondioksit, nitrojen oksid, amonyak, voletil nitroaminler, hidrojen siyanür, voletil hidrokarbonlar, alkol, aldehit ve ketonlardan oluşur. Bunlar özellikle solunum yollarında silya hareketlerini inhibe ederler.Partikül fazı ise nikotin ve katrandan oluşur. Katran başlıca karsinojen olarak bilinen polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve radyoaktif maddeleri içerir (15).

.Nikotinin genel özellikleri:

Nikotin MSS'inde nöroregülatör sistemler üzerine doğrudan ve dolaylı etkilerle fizyolojik, biyokimyasal ve davranışsal fonksiyonları etkilemesi ve tütüne bağımlılığı tetiklemesi açısından önemlidir (16,17).

Nikotinin tüm membranlardan solunum yollarından, mideden, ince barsaktan emilimi çok hızlıdır. Çok kısa sürede beyne ulaşır. Sigara içiminden sonra nikotinin plazma konsantrasyonu 25-50 ng/ml' dir. Yarılanma ömrü 30-60 dakikadır. Nikotinin % 80-90' ı özellikle karaciğerde, böbrekte ve akciğerde değişime uğrar. En önemli metaboliti kotinin ve nikotin N-oksittir. Nikotin metabolitleri böbrekten atılır (18).

Nikotine cevap doza bağımlıdır. Nöromüsküler bağlantılar, otonom ganglionlar ve beyinde düşük dozlarda uyarıcı, yüksek dozlarda inhibe edici etkisi nedeniyle bifazik cevaplar oluşturur (17). Kronik kullananlarda tolerans gelişir. Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda cevap şiddeti azalır. Tolere edemeyenlerde kusma, tremor, konvulziyonlar ve aşırı dozlarda ölüme neden olur. Nikotin alımı, bir takım davranışsal ve fizyolojik cevaplar oluşturur.

Lokomotor aktivitede artış, beyinde ödül alanların uyarılması, öğrenme hafıza gibi entellektüel fonksiyonlar üzerine iyileştirici etkileri yanında bazı periferik etkiler oluşturur. Sempatik sistemi uyarıp, adrenal medulladan epinefrin salgılatarak kalp hızı ve kan basıncını artırır. Kemoreseptörleri uyarıp solunum hızında ve kalp hızında artışa neden olur. Nikotinin nöroregülatör sistemler üzerine etkilerini anlayabilmek için spesifik kolinerjik nöronlar ve buralardaki reseptörleri iyi bilmek gerekir. Spesifik kolinerjik nöronlar ve nöroregülatör etkiler arasındaki ilişkiler genellikle nikotinic kolinerjik ve muskarinic kolinerjik blokerler kullanılarak araştırılmıştır. nAChR'lerinin en spesifik antagonisti kan beyin bariyerini rahatlıkla geçebilen mekamilamindir. Periferik ganglionik antagonist hekzametanyum ve muskarinic antagonistler atropin ve skopolamin nAChR'leri üzerinde çok daha az etkilidirler (17,19). Nikotinin hem merkezi, hem de periferik etkilerini nAChR'leri aracılığıyla gösterir.

2.2. Kolinerjik Sistem

Sempatik ve parasempatik sistemin 1. sıra nöronlarından ve parasempatik sistemin 2. sıra nöronlarından oluşur. Bu nöronların ganglionlardaki veya nöroefektör kavşaklardaki akson uçlarından salıverilen ve sinaptik aşırımdan sorumlu olan nörotransmitteri asetilkolindir (20).

2.2.1. Asetilkolin (ACh)

ACh, kolinerjik sinir uçlarından kolinin enzimatik asetilasyonu ile sentezlenir. Bu olayı katalizleyen enzim kolin asetiltransferazdır (ChAT) (21). ChAT sinir sisteminde özellikle ACh sentezlenen bölgelerde bulunur. Kolinerjik nöronlarda, ChAT, sinir terminallerinde konsantre olur. Somada sentezlendikten sonra aksona gider. ChAT sinaptozomal fraksiyonda primer olarak stoplazmadadır. Fizyolojik şartlarda ChAT enziminin depo veziküllerin dışına bağlandığına inanılmakta ve bu lokalizasyonda sentezlenen ACh tercihen veziküle girmektedir. Asetil kaynağı, sinir ucundaki mitokondrilerde sentez edilen asetil koenzim A'dır. Memeli beyinde ACh sentezi için kullanılan asetil koenzim A glukozdan kaynaklanan pirüvattan gelir. Kolin sinir ucuna sinaps veya kavşak aralığından aktif transport suretiyle alınır. Kolin kaynakları; aralıktaki yıkılan ACh'den oluşan kolin, vücutta yıkılan fosfolipidlerden oluşan kolindir. Kolinerjik sinir ucu membranında kolini içeriye pompalayan bir kolin uptake mekanizması (kolin pompası) vardır. Bu pompa protein yapıdadır, kolini 1-5 μM K_m ile Na^+ bağımlı yüksek affiniteli uptake sistemi ile alır. Diğer dokuların kolin uptake sistemleri düşük affinitelidir (K_m 10-100 μM). ACh'nin kendisi geri alıma uğramaz. ACh oluşumu bu uptake mekanizmasıyla belirlenen intrasellüler kolin

konsantrasyonuyla sınırlandırılır. Hemicholinium-3 yüksek affiniteli kolin uptake sisteminin potent inhibitörüdür. K_i 'si submikromolar düzeyindedir (20,22).

ACh sentezinde hız kısıtlayan basamak kolinin membrandan transportudur. Kolinerjik sinir etkinliğinin artması ile fazla ACh salıverilir ve ACh'nin yıkımı ile aralıkta fazla kolin oluşturulur. Bu da kolin transportunu hızlandırır. Sinir ucunda ACh aşırı derecede oluşursa kolin, kolin kinaz enzimi ile inaktif fosfolipidlere dönüştürülür (20).

Kolinin asetillenmesi esas olarak stoplazma içinde olur. Böylece oluşan ACh 30-60 nm çapındaki veziküller içinde depolanır, bunlara depo veziküller denir.

Vesamicol, veziküler ACh uptake'ini selektif olarak bloke eder. İnhibisyon non kompetitifdir. Bu da ACh'nin bağlanma bölgesinden başka yere etkidiğini ifade eder. Vesamicol, yeni sentezlenmiş ACh'nin uyarılma sonucu salınımını, yüksek affiniteli kolin uptake'ini, ACh sentezini veya Ca^{+2} akımını anlamlı bir şekilde etkilemeden antagonize eder. Veziküler ACh uptake mekanizmasının blokajına sekonder olarak ACh salınımı engellenir. Bu da depo veziküllerin ACh salınımının bir parçası olduğunu gösterir (20,22).

ACh'nin salıverilmesi: Sinir ucunun depolarizasyonu ACh sinaps veya kavşak aralığına salıverilir. Salıverilme parsiyel ekzositoz yoluyla olur. Şöyleki; vezikül membranı stoplazma membranına belirli noktalarda yapışır, temas bölgelerinde membranlar erir ve depo veziküller içindeki ACh molekülleri aralığa atılır. Daha sonra membran üzerinde oluşan delik kapanır. İçeriğini boşaltan ve stoplazmada kalan boş veziküller tekrar ACh depolamada kullanılırlar. Bu salıverilme şekline kuvantal salıverilme denir. Sinir uçlarından istirahat halinde iken nörotransmitterlerin sızması da mümkündür buna non-kuvantal biçimde salıverilme denir. Eksitasyon ile salıverilme arasındaki ilişkiyi Ca^{+2} iyonları sağlar. Sinir ucunun depolarizasyonu membran içindeki voltaja bağımlı Ca^{+2} kanallarını açar ve Ca^{+2} içeri girer. Presinaptik kolinerjik uçlardaki fonksiyonel, voltaja-bağımlı Ca^{+2} kanalları, genellikle N tipi kanallardır.

Presinaptik uçlarda veziküllerin iki havuz halinde buldukları gösterilmiştir. Salıverilmeye hazır havuz, presinaptik uçtaki toplam vezikül sayısının ufak bir kısmını oluşturur ve oradaki veziküller stoplazma içinde serbest durumdadır. Sinir ucu depolarize edilince bu havuzdaki veziküllerin az bir kısmı yukarıda belirtilen olaylar sonucu stoplazma membranına yanaşır. Füzyon yaparak içerdiği molekülleri hızla sinaps veya kavşak aralığına salıverir. Çok daha büyük olan ikinci havuz hücre iskeletine bağlanmış olan yedek vezikül havuzudur. İki havuz arasında varolan iki yönlü dengeyi, vezikül membranında yerleşmiş olan fosfoproteinler olan sinapsin I ve II türleri düzenler. Depolarizasyon sonucu Ca^{+2} 'un içeri girmesi Ca^{+2} Kalmudiline Bağımlı Proteinkinaz II'yi (CAMK II) ve protein kinaz A'yı aktive

ederek sinapsinlerin fosforilasyonuna ve salıverilebilir vezikül sayısının, bağlı olan havuz aleyhine artmasına neden olur (20,22).

ACh salıverilmesinin modülasyonu: Nöroefektör kavşaklardaki kolinerjik sinir uçlarında asetilkolin salıverilmesini değiştiren bazı reseptörlerin (presinaptik reseptörlerin) bulunduğu gösterilmiştir. Bunların bir türü muskarinik presinaptik reseptörlerdir. Bu reseptörlerin aktivasyonu sonucu ACh kendi salıverilmesini azaltır. O halde bu tip reseptörler otoreseptör görevi yaparlar ve bir negatif feedback düzenleme mekanizmasının bir parçasını oluştururlar. Atropin ile bu reseptörlerin blokajı ACh salıverilmesini arttırır. Söz konusu reseptörler, pek çok yerde muskarinik reseptörlerin M₂ subtipine uyan özellikler gösterir. Bazı yerlerdeki kolinerjik sinir uçlarında M₁ veya M₃ subtipi muskarinik otoreseptörler bulunur. Kolinerjik sinir uçlarında α -adrenerjik (α_2 subtipi), dopaminerjik, opioid μ ve serotonerjik (5-HT₁-benzeri) reseptörler de bulunur. Salıverilen nörotransmittere uyan otoreseptörler dışında kalan, bütün bu reseptörlere presinaptik heteroreseptörler denir (20).

ACh'nin inaktivasyonu: ACh'in eliminasyonu, sinaps veya kavşak aralığında bol miktarda bulunan asetilkolinesteraz enzimi tarafından hidroliz edilerek kolin ve asetik aside dönüştürölmek suretiyle olur. Histokimyasal teknikler kullanılarak elektron mikroskopisi ile yapılan incelemeler adı geçen enzimin, kolinerjik sinaps veya kavşaklarda hem sinir uçlarında ve hem de kavşak sonrası veya postsinaptik membran üzerinde yerleştiğini göstermiştir. Gerçek kolin esteraz adıyla da anılan bu enzim, kolin esterleri içinde en hızlı ACh'i hidroliz eder. Psödokolinesteraz diye adlandırılan ikinci bir kolin esteraz türü asetilkolini daha yavaş parçalar, bu enzimin en hızlı parçaladığı kolin esteri bütirilkolindir. Psödokolinesteraz kolinerjik sinirlerde ve glia hücrelerinde önemsiz derecede bulunur. Bu yerlerdeki asetilkolin hidrolizine katkısı yoktur. Psödokolinesteraz plazmada, karaciğer ve diğer organlarda da bulunur. Buralarda non-selektif bir esteraz işlevi yapar (20,22).

2.2.2. Kolinerjik Sinir Sisteminin Organizasyonu

Ach reseptörleri farmakolojik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Klasifikasyon nikotin ve muskarin adlı iki alkaloidin reseptördeki farmakolojik aktivitesi üzerine kuruludur. Muskarinik reseptörlerin (mAChR) antagonisti atropin ile, nikotinik reseptörlerin (nAChR) antagonisti d-tübokürarin adlı ajanların tamamen farklı aktiviteleri vardır. Bu da ACh için birden fazla reseptör olduğunu desteklemektedir (20,22,23).

Nöromusküler kavşaktaki nAChR'leri bazen N₁ reseptörler olarak belirtilir. Feniltrimetilamonyum bu reseptörlerin selektif agonistidir. En potenti olan dekametonyum

gibi bisquarterner ajanlar ile membran depolarizasyonu sağlanır. d-tübokürarin kompetitif antagonisti, yılan α -toksini ise non-kompetitif antagonistidir, irreversible blokaj olur.

Ganglionlardaki nAChRler; N_2 reseptörleri, 1-1-dimetil-4-fenilpiperazinyum ile stimüle edilirler. Trimethan tarafından kompetitif, hexametyum gibi biquarterner ajanlarca nonkompetitif olarak bloke edilirler. Bu reseptörler α -bungatoksine rezistandır (20).

MSS'de çok sayıda farklı nöronal nAChR vardır. Bunlar kaslardakilerden çok ganglionlardaki nAChR'lerine benzerler. Günümüzde MSS'de en az 10 farklı nikotinik reseptör α subüniti ve 4 farklı β subünit geni tanımlanmış ve klonlanmıştır (2).

Nikotinik ve muskarinik reseptörlerin subtipleri periferik sinir sisteminde ayrı anatomik lokalizasyonlar gösterirler ve bu da klasifikasyonu kolaylaştırır.

İskelet kaslarının reseptörleri nöromusküler kavşak veya postsinaptik motor son plak bölgesinde birarada bulunmaktadır (20). Denerve veya embriyonik kaslar gibi innerve olmayan kaslarda reseptörler kasın yüzeyinde dağılmışlardır ve bu extrajunctional reseptörler hızla sentezlenip degrade edilirler. Junctional reseptörlerin turnoveri biraz daha düşük hızla olmaktadır ve junctional reseptörler pentamerik yapıda γ yerine ϵ subünitinin geçmesiyle ayırddedilir (22).

Adrenal bezde parasempatik ve sempatik ganglionlarda postsinaptik nöronlarda ganglionik nikotinik reseptörler bulunur. Ganglionik nikotinik reseptörler embriyonik nöral krestten orijin alan dokularda bulunur. Sempatik ve parasempatik ganglionlarda benzer özellikler gösterir. Muskarinik reseptörler postganglionik parasempatik transmisyonundan sorumludur. Ancak terleme, piloereksiyon gibi sempatik sinir sisteminden orijin alan olaylar muskarinik reseptörlerce yönetilir (20).

2.2.3. Kolinerjik Reseptörler (Kolinoseptörler)

ACh'nin otonom sinir sistemi ile ilgili nöronlar ve efektör hücreler üzerindeki etkisine, birbirinden çok farklı yapıda reseptörler olan nikotinik reseptörler ve muskarinik reseptörler aracılık eder. Bu reseptörlerin dokudaki dağılımları ve dansiteleri, radyoligand bağlanma yöntemleri ile etraflı bir şekilde incelenmiştir; örneğin nöromusküler kavşakta ve elektroplak sinapslarında radyoaktif iyotla işaretlenmiş α -bungarotoksin kullanılarak yapılan deneylerde nikotinik reseptör dansitesinin postsinaptik membranda $30000/\mu m^2$ dolayında olduğu bulunmuştur. Spesifik kolinerjik nöronlar ve nöroregülatör etkiler arasındaki ilişkiler genellikle nikotinik kolinerjik ve muskarinik kolinerjik blokerler kullanılarak araştırılmıştır. nAChR'lerinin en spesifik antagonisti kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçebilen

mekamılamındır. Periferik ganglionik antagonist hekzametonyum ve muskarinik antagonistler atropin ve skopolamin nAChR'ler üzerinde çok daha az etkilidirler (20).

2.2.4. Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri (nAChR)

İlk olarak Electrophorus Californica adlı balığın elektrik organından (elektroplaktan) sodyum dodecyl sülfat gibi bir anyonik deterjan kullanılarak çözünmesi sağlanan nAChR'leri ayrıştırılıp saflaştırılarak ayrıntılı şekilde incelenmiş, aminoasit sekansları saptanmıştır (21). nAChR'ler, yapıcı ligand kapılı katyon kanallarıdır. nAChR proteini beş polipeptid subünitten oluşan pentamerik bir yapıya sahiptir. Bu subünitlerin aminoasit rezidülerinin %30 ila 40'ı homologtur. Subünitler α , β , γ , δ ve ϵ 'dur. Kaslarda α subünitinin 2 kopyası vardır, diğer 3 subünit β , γ ve δ tek kopya şeklindedir. Nikotinik reseptör protein kompleksinin molekül ağırlığı 280kD'dur. Bu subünitler bir merkezi kavite çevresinde yerleşmişlerdir. Reseptörün çok büyük bir kısmı extrasellüler yüzdedir. Bu merkezi kavite bir iyon kanalıdır. Dinlenme durumunda iyonlara geçirgen değildir. Aktive olduğunda 6.5 Å⁰ açılıyor. Açık kanal katyonlara selektiftir. Aslında Na⁺, Ca⁺² ve K⁺ geçirmekle beraber, ACh ile aktive edilip açıldığında Na⁺ kanalı gibi çalışır ve depolarizasyona yol açar. İki α subüniti ve γ ile δ subünitlerinin α subünitine bakan yüzleri agonist ve kompetitif antagonist bağlanma bölgelerini oluşturur. Dolayısıyla α subünitine ligand bağlanırken, β subüniti reseptör ligand bağlanmasını ve reseptörün desensitizasyon hızını modüle eder. Ligand kapılı katyon kanalı yapısındaki reseptör ailesinin hepsinde α subünitinde 128. pozisyondaki sistein ile 142. pozisyondaki sistein arasında disülfid köprüsü vardır. Yine α subünitini tanıtan yapısal özellik olarak 192-193. sistein aminoasitleri arasında disülfid köprüsü vardır. Son çalışmalar göstermiştir ki α subünitindeki 185. ve 200. rezidüer agonist ve antagonist bağlanma yüzeylerinin bir kısmını oluşturduğu için önemlidir. Agonist bağlayan bölgeler içeren rezidüer tirozin ve triptofan gibi aromatik yan zincirler içerirler ki bunlar agonistlerle katyonik etkileşimler yaparlar (20,22,23).

Her bir subünit polipeptid zinciri 4 tane membranı kateden 4 hidrofobik segmentten oluşur. Bu transmembran bölgeler 210. rezidüden sonradır ve molekül extrasellüler yüzeyde amino terminal kısım ile son bulur. Bu 4 segment M₁, M₂, M₃ ve M₄ olarak isimlendirilmektedir. M₃ ve M₄ arasında geniş stoplazmik bir loop vardır. Bu intrasellüler loop serin/treonin kinazlar içindir. M₂ iyon kanalına göre proximaldedir. α helikal yapıdadır ve kanal lümenine doğru serin ve treonin rezidüleri içerir. Reseptörün iyon kanalının, kanalın derinliklerinde stoplazmik bölgede yer alan bir kapısı olduğu düşünülmektedir. İyon selektivitesini kanalın çevresinde yerleşim gösteren her 5 subünitin yüklü aminoasitlerinin

oluşturduğu halka kontrol eder. Bu kontrol bölgesi extrasellüler kısımda α -Glu 262'den stoplazmik kısımdaki α -Glu 241'e kadardır. α -Thr 244'e denk gelen pozisyonadaki amidlerin hidrojen iskeletleri ve karbonil grupları ve hidroksillenmiş aminoasidlerin oluşturduğu halka ile iyon selektivitesi ve permeabilitesi ayarlanır (22).

nAChR'leri dinlenim konumundayken ACh'e rölatif olarak düşük affinite gösterir. Agonist bağlandığında, iyon kanalı kapalı-dinlenim konumundan açık konuma geçer, Na^+ , K^+ , ve Ca^{+2} akımı olur. Aktivasyon esnasında ACh'e ilgi artmıştır, allosterik etkileşimle diğer bir ACh molekülünün bağlanması artmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda ACh varlığında ACh'e affinite de artmaktadır. Agonistin ortamdaki varlığının devam etmesiyle iyon kanalı kapanır ve reseptör desensitize olur. Bu durumda, nAChRs agonist bağlanmasına daha yüksek affinite gösterse de aktivasyona dirençlidir. Desensitize haldeki reseptörün birçok durumu vardır. Desensitizasyon ve geri dönüş oranı nAChR subtipine göre değişir. Örn: α_7 nAChR çok hızlı desensitize olur. Uzayan agonist uygulaması reseptörü inaktive duruma geçirebilir ve geri dönüşü çok yavaş olur. $\alpha_4\beta_2$ nöronal nAChR'leri kronik nikotin tedavisiyle inaktivasyona eğilimlidir. Dinlenim, açık ve desensitize konumlar arası geçişler reversibldir. Agonistler önce aktive (açık) konuma getirirler, antagonistler ise tercihen nAChR'lerini dinlenim veya desensitize konfigürasyonlardan biri şeklinde-kapalı konumda tutarlar (21,23,24).

Nikotik reseptörler daha önce değinildiği gibi bir katyon kanalının intrinsik bir bölümünü teşkil ederler veya başka bir deyişle bu kanalla direkt olarak kenetlenmişlerdir. nAChR'lerinin ACh ve diğer nikotik reseptör agonistleri tarafından aktive edilmesi kanalın kısa bir süre için açılmasına neden olur; bu sırada kanalın konduktansı nisbeten fazla artar (gangliyon alt-tipinde 35-40 ve çizgili kas alt-tipinde 35-50 pikoSiemens). Nikotik reseptörlerin kenetlendiği katyon kanalı tipi esas olarak Na^+ 'u ve daha az derecede olarak Ca^{++} ve K^+ 'u geçiren kanallardır. Bu kanalların açılması hücreleri depolarize eder; gangliyon ve iskelet kası hücrelerinde eksitator postsinaptik potansiyel (EPSP) oluşturur. Bu potansiyel çizgili kasın nöromüsküler kavşağında son plak potansiyeli diye adlandırılır (20).

α 'ların en az 10 ve β 'ların en az 4 subtipi vardır (α_1 'den α_{10} 'a kadar, β_1 'den β_4 'e kadar). Reseptörün yerine ve tipine göre içerdiği alt birim türleri değişkenlik gösterir. nAChR'ler otonom ganglionlarda, adrenal kromaffin hücreleri, primer duysal nöronlarda ve iskelet kas liflerinde olmak üzere periferde geniş bir dağılım gösterir (2,23).

Kas son plaktaki nAChR'leri $(\alpha_1)_2\beta_1\varepsilon\delta$ şeklindeki subünit kombinasyonu gösterir halbuki extrajunctional nAChR'leri $(\alpha_1)_2\beta_1\gamma\delta$ şeklindeki subünit kombinasyonundan oluşur (Fetal ve denerve kaslarda) (23).

MSS'e bakıldığında ise beynin hemen hemen her bölgesinde hem presinaptik hem postsinaptik olarak yerleşmişlerdir. Nikotik reseptörler daha çok pre junctionaldır (20).

Nikotik Reseptörlerin Alt Tipleri

Çizgili kasların nöromusküler kavşaklarındaki nikotik reseptörlerin ve otonomik ganglionlarla adrenal medullanın kromaffin hücrelerindeki nikotik reseptörlerin belirli blokör ilaçlara karşı duyarlılığının farklı olmasına bakarak nikotik reseptörlerin iki tipi ayırt edilmiştir. Bunlar çizgili kas tipi (N_m/N_1) reseptörler ve ganglion tipi (N_g/N_2) reseptörlerdir. Daha sonra santral sinir sistemi nöronlarında nöronal nikotik MSS reseptörleri tanımlanmıştır.

Çizgili kas tipi (N_m) reseptörler α tükürarın, panküronyum ve benzeri çizgili kas felç edici ilaçlar tarafından selektif ve güçlü bir şekilde bloke edilirler. Ganglion (N_g) tipi reseptörler heksametyonyum, mekamilamin ve diğer gangliyon bloke edici ilaçlar tarafından selektif bir şekilde bloke edilirler; dimetilfenilpiperazinium (DMPP) maddesi bu reseptörlerin selektif bir agonistidir. Bir yılan zehiri olan α —bungarotoksin çizgili kas tipi reseptörleri selektif olarak bloke eder, fakat gangliyon tipi reseptörlere dokunmaz. Diğer bir yılan zehiri kappa-bungarotoksin (diğer adıyla nöronal bungarotoksin) gangliyon tipi reseptörleri selektif şekilde bloke eder. ACh ve nikotin, çizgili kas ve gangliyon tipi kolinerjik reseptörlerin non—selektif agonistleridir. Nöronal MSS tipi reseptörlerin altbirim bileşimi diğerlerinden farklı olmakla beraber, yukarıda sayılan toksin ve ilaçlara duyarlılıkları gangliyon tipi reseptörlerinki gibidir. N_m reseptörler, erişkin kasında 2 tane α_1 ve birer tane β_1 , ε ve δ alt birimlerinden oluşur, konduktansı 35-50 pS (pikoSiemens)'tir; embriyonik kasta ε alt biriminin yerini γ alt birimi almıştır. N_g 'ler genellikle sadece α_3 ve β_4 alt birimlerinden oluşan pentamerlerdir (20).

Nöronal nAChRs

1980'de [3 H]-Nikotinin rat beyninde bağlanma bölgeleri olduğu ve bu bölgelerin eşsiz nikotik farmakolojiye sahip olduğu rapor edilmiştir. [3 H]-Nikotin, α -bungatoksin ile bloke olmaz (23). Bildirilen klonlanmış ilk nöronal nAChR subtipi 1986'da α_3 'dür. Günümüzde memelilerde saptanan nöronal nAChR subünitleri 11 (α_2 - α_7 , α_9 , α_{10} , β_2 - β_4) tanedir. Buna ek olarak kuş türünde α_8 subüniti tanımlanmıştır. α ve β subünitleri ayrı fakat ilişkili gen familyasındandır (23).

nAChR'leri santral ve periferik sinir sisteminin her yerinde bulunurlar. Otonomik nörotransmisyon ve kas kontraksiyonunun başlatılması şeklindeki asıl rolüne ek olarak, MSS'deki nAChR'leri daha çok modülatör rolü oynar (22). Nöronal nAChR'leri, AH, PH, Şizofreni, Tourette Sendromu, Dikkat Bozukluğu gibi hastalıklarla ilişkisi nedeniyle önem kazanmaya başlamıştır. Nöronal nAChR'leri bu hastalıkların tedavisinde ilaçlar için hedef olarak algılanmaktadır (23). Nöronal nAChR'leri, α ve β subünitlerinin pentamerik kombinasyonlarından oluşur, bu da doğal nöronal nAChR'lerine bol miktarda çeşitlilik sağlar.

Xenopus Oocytes ve memeli hücre dizisinde nAChR'lerinin heterolog ekspresyonu bazı kurallarla düzenlenir bu da doğal nAChR'lerinin subünitlerini sınırlar. α_2 , α_3 ve α_4 subünitlerinin β_2 ve β_4 subünitleriyle ikili kombinasyonları fonksiyonel nAChR'lerini oluşturur, ancak α_5 ve β_3 subünitleri genellikle fonksiyonel nAChR'lerini oluşturamaz. Bunlar da en azından diğer subünitlerle bir araya gelerek heteromerler oluştururlar. α_6 subüniti, β_4 ile fonksiyonel nAChR'ler oluşturabiliyor. Yine α_6 subüniti β_3 ile kombinasyon oluşturuyor. α_6 subüniti biyojenik amin içeren nöronlarda lokalizedir. α_7 , α_8 ve α_9 subünitleri sağlam homomerik reseptörler oluştururlar. α_{10} subüniti sadece fonksiyonel α_9 subüniti ile birlikte reseptör oluşturacak şekilde ifade edilir. α_9 subüniti içeren reseptörler muskarinik reseptörlerin bazı özelliklerini taşır.

Doğal sistemlerde, nAChR'lerinin subünit kombinasyonu hakkında bilgi eksiktir. Sadece birkaç major subtip tanımlanmıştır. Bunlardan biri $\alpha_4\beta_2$ 'dir. MSS'de rölaf olarak çok miktardadır, MSS'nin predominant kombinasyonudur. Xenopus Oocytes'de $\alpha_4\beta_2$ kombinasyonu $(\alpha_4)_2(\beta_2)_3$ şeklindedir. Diğer major subtip α_7 'dir. Genellikle MSS'de ve PSS'de homomerik nAChR şeklinde bulunuyor. İn vivo şartlarda α_7 subüniti içeren reseptörün yüksek Ca^{+2} permeabilitesi vardır. α_3 subüniti genellikle β_2 , β_4 ve α_5 subünitleriyle yoğunlukla periferik ganglionlarda ve $\alpha_4\beta_2$ de MSS'de yer almıştır. MSS'deki nikotinik reseptörler presinaptik lokasyonlarda fonksiyon gösteriyorlar ve MSS'deki bazı transmitterlerin salınımını düzenliyor. Elektrofizyolojik ve mikrodializ çalışmaları sonucunda elde edilen kanıtlar göstermektedir ki glutaminerjik, dopaminerjik, seratonerjik, peptiderjik ve kolinerjik yollar presinaptik nikotinik reseptörlerin kontrolü altındadır (22,25).

2.2.5. Nikotinin MSS'de kolinerjik sistem ve diğer sistemlerle etkileşimi

Nikotinin yaygın kolinerjik etkileri vardır. ACh nörotransmitterinin etkilerini taklit eder. ACh salınımını indükler. Elektroensefalogramda desinkronizasyona neden olur (17). Kedilerde yapılan deneylerde, kortikal aktivasyon mAChR blokleri olan atropinle önlendiği

halde davranışsal uyanıklık atropinden etkilenmemiştir. Bu ise kortikal aktivitenin muskarinik reseptörler aracılığıyla davranışsal uyanıklığın ise limbik sistemdeki muhtemelen hipokampusta bulunan nAChR'ler aracılığıyla olduğunu düşündürmüştür (26).

nAChR'lerinin çoğu retiküler aktive edici sistemin kolinerjik lifleri üzerindedir. Bu sistemin aktive olması algılamayı kolaylaştıran uyanıklık ve bilinçli dikkat durumu oluşturur. Ayrıca $\alpha 4$ alt tipinden zengin hipokampus, perforant eksitatör yoldan dentat girusa giden nöronlar ise nikotinin öğrenme üzerine olan etkilerini açıklayabilir (19). Kognitif fonksiyonlarda ACh sistemlerinin önemi uzun yıllardır bilinmekte olup, araştırmalar genellikle mAChR'ler üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak son yıllarda dikkat, algılama, öğrenme, hafıza ve bilginin işlenmesi gibi beynin yüksek fonksiyonlarında nikotinik sistemlerin etkileri de araştırılmakta olup, nikotinin bu fonksiyonlar üzerine iyileştirici etkileri de rapor edilmiştir (26). Bununla beraber nAChR'lerinin spesifik antagonisti mekamilaminin hafızayı kötüleştirdiği de bilinmektedir (17, 26).

Nikotin ACh'den başka dopamin, norepinefrin, serotonin ve GABA'yı da içeren çeşitli nörotransmitterlerin serbestlemesine de neden olur (27). Kognitif fonksiyonlarda kolinerjik ve dopaminerjik mekanizmalar arasındaki ilişkiye de dikkat çekilmiştir. Nikotinik ve muskarinik AChR'leri ile dopamin reseptörleri (D1, D2) arasında kompleks bir ilişki vardır. nAChR antagonisti olan mekamilamin ile engellenmiş öğrenme fonksiyonu dopamin reseptör (özellikle D2 antagonisti) blokeri ile daha da kötüleşmiş, ancak dopaminerjik agonist ile düzelmiştir (26). mAChRs ise daha çok D1 reseptörleri ile etkileşmektedir.

Nikotin alımı hipokampus ve frontal kortekste tirozin hidroksilaz aktivitesini ve norepinefrin salınımını artırmıştır (13). Nikotinin davranış üzerine olan etkilerinden bazıları muhtemelen nonkolinerjik transmitter sistemleri, yani aminojerjik yollar ile olan etkileşimine bağlanmaktadır (28). Ayrıca Ca^{+2} 'a bağımlı şekilde glutamik asit başta olmak üzere aminoasitlerin salınımını da arttırmaktadır (16). Kortekste piramidal hücrelerde ve talamusdan yükselen glutamaterjik terminaller üzerindeki nAChR'lerle eksite edici potansiyelleride güçlendirmektedir (17).

Nikotine tolerans; reseptör desensitizasyonu veya voltaj kapılı iyon kanallarının inaktivasyonu şeklindedir. Dolayısıyla kronik olarak uygulanan nikotin, günler süren hassasiyet azalmasına neden olacaktır (29).

2.2.6. Nikotin, Nikotinik Sistem Ve Bazı MSS Hastalıklarıyla İlişkisi

Nikotinik Sistem kognitif fonksiyonun nöral temelinde hayati rol oynar. Nikotinik bazlı terapötik yaklaşım AH, Şizofreni, Dikkat Bozukluğu ve Hiperaktivite Hastalığı gibi çeşitli kognitif hastalıkların tedavisinde yararlı olabilir. AH insidansı ile sigara kullanımı arasındaki negatif korelasyon birçok epidemiyolojik araştırmacı tarafından bulunmuştur (5,6). Sigara tiryakilerinde nikotinin, özellikle dikkat isteyen işlerde performansı arttırdığı gösterilmiştir. Sigara kullanmayanlara nikotin yamaları yapıştırılarak dikkat ve uyanıklıkta gelişme sağlandığı rapor edilmiştir. AH'de kognitif disfonksiyon korteks ve hipokampusta nikotinik reseptörlerde dramatik bir düşüşle beraberdir (4). Bu veriler nikotin ile nAChR'leri üzerinden nöroprotektif etki sağlanabileceğini düşündürmektedir (4-6).

nAChR'leri özellikle dikkat, uyanıklık, hafızanın pekiştirilmesi, duyuşsal algı gibi çeşitli kompleks kognitif fonksiyonlar ve lokomotor aktivitenin kontrolü, ağrının algılanması, vücut ısısının regülasyonu ve nöroprotektif etkiler gibi birçok beyin fonksiyonunda rol oynar (1). AH'nin ana verisi senil plaklar ve bu senil plakların ana bileşeni amiloid β peptid ($A\beta$)'dir. Bu nedenle AH'nin patogeneğinde en önemli olayın β -amiloid prekürsör protein (APP) ekspresyonu olduğuna inanılmaktadır. Nikotin ve APP mRNA arasındaki ilişki araştırılmıştır. İnsan nöroblastoma hücre dizisinden oluşan kültür ortamına 10^{-4} M nikotin eklendikten 1 saat sonra APP mRNA ekspresyonu azalmıştır. 4 saat sonra kontrollerle karşılaştırıldığında APP mRNA ekspresyonunun %20 oranında azaldığı gözlenmiştir. Wistar ratlarla yapılan benzer bir çalışmada benzer değişiklikler gözlenmiştir. Nikotin ile 10 gün düzenli enjeksiyon sonrası serebral kortekte kontrol grubuyla karşılaştırıldığında APP mRNA ekspresyonunda anlamlı bir düşüş saptanmıştır. Tüm bu nikotinin nöronal hücre ölümüne karşı koruyucu etkisini saptamak için PC12 hücreleri sinir büyüme faktöründen mahrum bırakılarak nikotinin bu hücreleri ölümden kurtarıp kurtaramadığı çalışılmış. Ancak 1-10 μ M nikotin uygulanan hücrelerin %50'si 5. günde, 100 μ M nikotin uygulanan hücrelerin de 9. günde tamamının öldüğü saptanmış. Nikotin antagonisti mekamilamin veya heksamethonyum eklendiğinde koruyucu etki tamamen ortadan kalkıyor. Bu da gösteriyor ki nikotin nAChR'ler üzerinden koruyucu etki sağlıyor (6).

Nikotinin nAChR subünitlerinin ekspresyonuna etkisi çalışılmış. Nikotin, PC12 hücrelerinde $\alpha 5$, $\beta 2$ subünitlerinin transkripsiyonunu arttırdığı, $\alpha 5$ 'i kodlayan mRNA'yı 1,5 ile 2 kat, $\beta 2$ subünitini kodlayan mRNA'yı 1,6 ile 2,2 kat arttırdığı saptanmış (6). nAChR'ler hem AH hem de PH'de sağladığı kognitif ve nöroprotektif etkileri ile terapötik hedefler haline gelmiştir (6).

Nikotinik sistemlerin ve reseptör subtiplerinin davranışsal ve farmakolojik doğasının daha iyi ve detaylı olarak tanımlanması, kognitif fonksiyonun temelini tam olarak açıklanması ve daha az yan etkili, terapötik olarak kullanışlı nikotinik ilaçların geliştirilmesi için önemlidir. Kognitif fonksiyonda nikotinik katılımdan sorumlu özel beyin bölgeleri ve nikotinik reseptör subtipleri, selektif lezyon ve lokal ilaç infüzyon teknikleri ile belirlenmiştir. Bu çalışmalar, kognitif fonksiyonda nikotin etkileri için kritik bölge olarak hipokampusü vurgulamıştır. Öğrenme esnasında ratlarda, hipokampal ACh seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir. Hipokampal nAChR'leri, hipokampusün sensory gating fonksiyonu için önemlidir (4).

Levin ve arkadaşları, lokal nikotinik reseptör antagonist infüzyonu yaptıkları bir dizi çalışmada mekansal kısa süreli hafıza fonksiyonu için limbik sistem ve orta beyindeki nAChR'lerinin önemini göstermişlerdir. Hipokampus bu amaçla araştırılan ilk bölge olmuştur. Özellikle medial septal bölge nöronları tarafından hipokampusün kolinerjik innervasyonu optimum hafıza performansı için kritiktir. Bu alandaki ilk çalışmalarda daha çok hipokampüsteki mAChR'lerine odaklanılmıştır. Elbette hipokampal muskarinik reseptörler önemlidir. Ancak septohipokampal kolinerjik innervasyon sadece muskarinik değil nikotinik reseptörleri de kullanır (5). Nikotinik ve muskarinik AChR'lerinin her ikisi de hafıza fonksiyonunda modülatör rol oynar. Bu reseptörlerin antagonist ile blokajı, lezyon oluşturulması veya Alzheimer gibi hastalık süreçleriyle stimülasyonunun veya aktivasyonunun önlenmesi kısa süreli hafıza'da şiddetli bozukluklara yol açar (4). nAChR'ler ve mAChR'lerinin her ikisi de kısa süreli hafıza performansında kritiktir. Bu iki reseptör grubunun blokajı ile ışınal kollu labirentte yapılan deneylerde kısa süreli hafızada bozukluk oluyor (4). Otoradyografik çalışmalar göstermiştir ki; hipokampüsteki nAChR'ler $\alpha 7$ ve $\alpha 4$ içermektedir. Hafıza fonksiyonu üzerine kronik nikotin uygulamasının etkileri için hipokampus önemlidir. İbotenik asid ile hipokampüste yaratılan küçük lezyonlar ki bunlar kısa süreli hafıza performansını anlamlı şekilde bozmaz, kronik nikotin uygulamasıyla indüklenen hafıza gelişimini bloke eder. Kronik nikotin uygulamasının aktivasyon bölgesi olarak kritik olan alan hipokampüsteki septohipokampal projeksiyonların postsinaptik alanlarıdır (5). Nikotin prototipik nikotinik agonisttir. Levin ve arkadaşları ratlara sistematik olarak nikotin uygulamışlar ve ışınal kollu labirentte hafıza fonksiyonunu nasıl etkilediğine bakmışlar ve mekansal kısa süreli hafızayı geliştirdiğini göstermişlerdir. Genel nikotinik kolinerjik antagonist mekamilamin hipokampüse lokal infüzyon ile uygulanmış ve etkisi ışınal kollu labirentte değerlendirilmiş, hafıza fonksiyonunda bozulmaya neden olduğu gösterilmiş (4).

Deneysel hayvan modellerinde nikotik tedavinin kognitif etkilerinin nöral ve davranışsal mekanizmalarının saptanması kritiktir. Bu durumda nikotik reseptör subtipleri, bunların anatomik lokalizasyonları, diğer nöral sistemlerle etkileşimleri önem kazanmaktadır. Farklı tip kognitif disfonksiyonlardan farklı tip nikotik reseptör subtipleri sorumlu gibi gözükmektedir. Örneğin $\alpha 4$ subtipini içeren reseptörler AH'de düşüktür. Bununla beraber şizofrenide $\alpha 4\beta 2$ ve $\alpha 7$ reseptör subtiplerinin her ikisinin de düştüğü görülmüştür (5). Daha önceleri yapılan bazı çalışmalarda nikotinin dikkat ve uyanıklığı artırıcı etkisi rapor edilmiştir ancak rat ve maymun deneyleriyle nikotinin indüklediği kognitif performanstaki iyileşmenin dikkat ve uyanıklığı artırıcı etkisi yanında çok açık bir şekilde hafıza performansında gelişme sağladığı gösterilmiştir (5).

Kognitif fonksiyondan birden çok nikotik reseptör subtipi sorumludur. Daha az yan etkiyle kognitif fonksiyonda gelişme sağlanması için nikotik reseptör subtipine selektif ilaçlar geliştirilmiştir. $\alpha 4\beta 2$ ve $\alpha 7$ nikotik agonistlerin her ikisi de etkilidir. $\alpha 4\beta 2$ nikotik antagonisti dihidro- β -eritroidin (DH β E)'nin ya da $\alpha 7$ antagonisti metilnikonitin (MLA)'nın ventral hipokampüse lokal infüzyonları, ratlarda 8 kollu ışınal labirentte ölçüldüğü üzere, kısa süreli hafızayı bozmuştur. Ventral hipokampüste DH β E ile oluşturulan nikotik $\alpha 4\beta 2$ blokajı sonucu oluşan hafıza bozukluğu kronik sistemik nikotin infüzyonu ile geri döndürülebilmektedir (4). $\alpha 4\beta 2$ agonisti ABT-418 ile maymunlarda yapılan deneysel çalışmalarda hafızayı geliştirdiği ve septal lezyonlarla oluşan hafıza bozukluklarını geri döndürdüğü görülmüş (5).

Rat hipokampüsünde $\alpha 7$ nikotik reseptörler yüksek konsantrasyonda bulunmuştur. Hipokampal internöronlarda özellikle CA3 alanında ve dentat granül tabakasında yüksek konsantrasyonda bulunmuşlardır. Nikotik $\alpha 7$ reseptörlerin fonksiyonel rolü hala araştırılmaktadır. $\alpha 7$ nAChR'lerinin ratlarda selektif stimülasyonu ile hafızanın geliştirilebildiği gösterilmiştir. Bu etki için hipokampüsün kritik bir bölge olduğu düşünülmüştür. $\alpha 7$ nAChR'lerinin stimülasyonu bu reseptörleri hipokampal LTP olayı ile ilişkilendirilmiştir. Bu, hafızanın hücresel bir modeli ve sensory gating ve nöral habituation'ın hipokampal temelli formudur. Son çalışmalar göstermiştir ki $\alpha 7$ nAChRs şizofreni ve nörodejenerasyonda önemli rol oynuyor olabilir. Selektif $\alpha 7$ agonistler genç ve yaşlı ratlarda kısa süreli hafızayı anlamlı bir şekilde geliştirebilmektedir. Diğer bir selektif $\alpha 7$ agonisti olan ARR 17779'un sistemik uygulaması ile ışınal kollu labirentte kısa süreli hafıza anlamlı şekilde artmıştır. Fimbria-fornix kesisi ile oluşan lezyonların neden olduğu hafıza bozuklukları ARR 17779'un sistemik uygulaması ile geri döndürülmüştür (4).

Dolayısıyla yapılan çalışmalarda $\alpha 4\beta 2$ ve $\alpha 7$ nikotinik agonistlerin her ikisinin de hafıza fonksiyonunu geliştirdiği saptanmıştır. Ancak yapılan çalışmalar göstermiştir ki $\alpha 7$ subtipi kısa süreli hafıza fonksiyonu üzerine sistemik nikotin aktivasyonunun ekspresyonunda daha temel roledir. Bu konu ile ilgili diğer nikotinik reseptör subtiplerinin özelliklerini anlamak için daha çok sayıda selektif agonist ve antagonist geliştirilmelidir (5).

Özetle nikotin AH, PH, Şizofreni, Dikkat Bozukluğu ve Hiperaktivite Sendromu gibi nörodejeneratif hastalıklarda dikkati, hafızayı geliştirerek kognitif fonksiyonu ve lokomotor aktiviteyi düzelterek iyileşme sağlamaktadır. Bunu nöroprotektif etkisi ve nAChR'lerinde up-regülasyonla yapmaktadır (1).

2.3. Glutamat Reseptörleri

Glutamat, memeli santral sinir sisteminde en önde gelen eksitatör nörotransmitterdir (30). Kortikospinal motor nöronların spinal motor nöronlara yaptığı sinapslarda major nörotransmitter glutamattır. Normalde üst motor nöron eksitasyonu ile glutamat molekülleri sinaptik aralığa düşerler ve spinal motor nöronlardaki (postsinaptik) reseptör yerlerine giderek spinal motor nöronları depolarize ederler. Glutamat bu etkilerini postsinaptik bölgede NMDA reseptörleri ve non-NMDA (AMPA veya Kainat) reseptörlerine bağlanarak meydana getirir. (20)

Glutamat reseptör ailesinin amino asit dizilişi, ACh, GABA, ve glisin reseptörlerine çok az benzer. Glutamat ayrı bir ailenin üyesidir. Glutamat reseptör ailesinin diğer iki üyesi olan AMPA ve kainat reseptörleri çok yakındırlar. NMDA reseptörü, diğer iki glutamat reseptörüne biraz daha uzaktır. Glutamat kontrollü kanallar dört alt üniteden oluşurlar. Her kanal alt ünitesi üç transmembran α - heliksinden oluşmaktadır (31-33).

Glutamat reseptörleri, temelde postsinaptik membranda lokalizedir. Başlıca 2 tipi vardır.

I- İyonotropik glutamat reseptörleri: Doğrudan iyon kanallarını kontrol eder.

II- Metabotropik glutamat reseptörleri: İkinci haberciler üzerinden dolaylı olarak iyon kanallarını kontrol eder.

I- İyonotropik glutamat reseptörleri

Presinaptik sinir terminallerinden salınan glutamat molekülleri iyonotropik glutamat reseptörlerine bağlandığında bir elektriksel olaya döndürülen kısa bir kimyasal sinyal

meydana getirir. Postsinaptik depolarizasyonla sonuçlanan net bir iç akıma izin veren bir integral katyon seçici kanal içeren iyonotropik glutamat reseptörleri 3 geniş gruba ayrılır :

1. α -amino-3-hidroksi-5-metil izoksozole propionat tercih eden reseptörler (AMPA)
2. Kainat tercih eden reseptörler (KAR)
3. N-metil D-aspartat tercih eden reseptörler (NMDAR)

II- Metabotropik glutamat reseptörleri

trans-(1S, 3R) -1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic asit (ACPD) ile selektif olarak aktive olurlar.

Glutamat iyonotropik reseptörler üzerinden eksitasyon yaparken, metabotropik reseptörler üzerinden eksitasyon veya inhibisyon oluşturabilmektedir.

2.3.1. NMDAR

İyonotropik glutamat reseptörleri sentetik agonistlere göre isimlendirilmişlerdir. NMDA glutamat reseptörleri APV ile selektif olarak bloke olurken, AMPA ve kainat reseptörleri bu ajanla bloke olmazlar. Her iki reseptör de CNQX ile bloke olurlar. Bu nedenlerde AMPAR'leri ve KAR'ler non-NMDA reseptörü olarak da isimlendirilirler (34).

NMDAR agonistleri olan glutamat ve aspartat tipik olarak kısa zincirli dikarboksilik aminoasitlerdir ve kuvvetli exitatör nörotransmitterlerdir. Aspartat da glutamat gibi NMDAR'lerine bağlanır ve aktivite gösterir. Ancak AMPAR'leri ve KAR'lerine bağlandığında oluşturduğu etkiden daha az bir etki gösterir. NMDAR'leri ile AMPAR'leri ve KAR'leri arasında benzerlik azdır. AMPAR'leri ve KAR'lerinin kendi aralarındaki benzerlikleri daha çoktur. Tüm NMDAR alt üniteleri nötral aminoasit içerir. Bir tek M2 bölgesinde polar asparajin rezidüsü bulunur.

Genelde postsinaptik bölgeler hem AMPAR'ü hem de NMDAR'ü içerirken; bazı bölgelerde sadece NMDAR'leri bulunur. Gelişimin erken evresinde sinapslar sadece NMDA tipi reseptörler içerirler (33,35). Non-NMDA iyonotropik reseptörler motor nöronlarda ve beyinde EPSP'nin büyük erken komponentini oluştururlar. Yani birçok sinapsta AMPARs exitatör aşırım sırasında ana başlangıç; şarj edici gibi etki eder. Bu reseptörler göreceli olarak düşük bir katyon iletkenliğine sahiptirler (< 20 pS). Na^+ ve K^+ a geçirgen iken Ca^{+2} a geçirgen değildirler. Bu sırada NMDARs, intrasellüler enzimler ve ikincil mesajcıların aktiverlerini modüle edebilen katı bir Ca^{+2} componenti ile birlikte daha yavaş bir akım sağlar.

EPSP'nin geç komponentini oluşturan NMDA reseptör kanallarının üç özelliği vardır.

1- Yüksek iletkenliğe sahip iyon kanallarını kontrol ederler (50 pS) ve Na⁺ ve K⁺'un yanısıra Ca⁺²'a da geçirgendirler.

2- Kanalın açılması bir ko-faktör olarak glisin ekstrasellüler olarak bulunmasına bağlıdır. Kanal sadece glisin varlığında çalışır. Normal koşullarda ekstrasellüler glisin yoğunluğu NMDAR kanalının çalışabileceği miktarlarda bulunmaktadır. Kinürenik asit ve aminoksalinedikarboksilik asit'in her ikisinin çoğu türevleri glisin bölgesinin kompetitif antagonistleridir.

3- Açılması kimyasal haberciye bağlı olduğu kadar membran potansiyeline de bağlıdır. Bu, NMDAR'ünü diğer voltaj kontrollü kanallardan ayıran bir özelliktir.

Voltaja bağımlılık diğer kanallarda olmayan farklı bir mekanizmadan kaynaklanmaktadır. Diğer kanallarda, membran potansiyelindeki değişiklikler, intrinsek voltaj sensörünün sayesinde kanalda konformasyonel değişikliklere neden olurken NMDA ile aktive olan kanalda ekstrensek bloker olan Mg⁺² (ekstrasellüler Mg⁺²) açık olan kanalı kapayan bir tıkaç gibi davranır ve iyon akışına engel olur. İstirahat membran potansiyelinde (-65 mV'da) Mg⁺² kanala sıkıca bağlanır. Ancak membran depolarize olduğunda (söz gelimi, non-NMDA reseptörleri glutamat ile aktive olduğunda), Mg⁺² elektrostatik etkiyle kanaldan uzaklaştırılır ve Na⁺ ile Ca⁺² un geçişine izin verir. Bu nedenle NMDAR'lerinde en yüksek iyon akımı her iki koşulun da gerçekleşmesiyle ortaya çıkar. Bu özellikleri nedeniyle NMDAR'ü sinaptik presinaptik aktivite ve postsinaptik depolarizasyonu eş zamanlı olarak saptayan bir araç gibi davranır ve postsinaptik hücreye yeterli miktarda ikincil haberci iyon olan Ca⁺² 'un girişine imkan verir . Bu da sinaptik bağlantının kuvvetindeki plastik değişiklikleri başlatır (30,31,33,35).

Birçok hücrede hem non-NMDAR'ler hem de NMDAR'ler bulunmaktadır. Mg⁺², istirahat membran potansiyelinde NMDAR kanalını bloke ettiği için, NMDAR'lerinin EPSP'lerin oluşmasında önemli bir katkısı yoktur. Bu nedenle istirahat durumunda oluşan EPSP'lerde büyük oranlarda non-NMDA reseptörlerinin katkısı bulunmaktadır. Depolarizasyon arttıkça Mg⁺² NMDAR kanalından uzaklaşır ve NMDAR'ü açılarak bu kanallardan iyon akışı gerçekleşir.

NMDAR kanalının diğer bir farkı göreceli olarak daha yavaş açılıp yavaş kapanması ve bu özelliği nedeniyle EPSP'lerin geç fazına katkıda bulunurlar. EPSP nin geç fazı, Mg⁺²'un kanalı bloke etmesi nedeniyle, tek bir presinaptik sinyalden sonra zayıf bir yanıt olarak karşımıza çıkar. Oysa presinaptik nöron ard arda sinyaller gönderirse postsinaptik hücrede EPSP'ler toplanarak 20 mV veya daha fazla bir depolarizasyon oluşturur. Bu durumda NMDAR'ü büyük ölçüde Ca⁺²'un katkısı ile daha büyük akımlara yol açar. NMDAR

aktivasyonu sonucu, post-sinaptik hücrelerde, Ca^{+2} 'a bağımlı enzimler ve bazı ikincil haberciler devreye girer. Bu biyokimyasal reaksiyonlar, sinapta bazı uzun vadeli modifikasyonlara katkıda bulunan sinyal yollarını tetikler. Öğrenme ve bellekte sinapta gerçekleşen değişikliklerin önemli olduğu düşünülmektedir. NMDARs'nin aktivasyonu presinaptik aktiviteye bağlı olduğu için ve uzun süreli sinaptik modifikasyonlar ile ortaya çıktığı için çoğu kez bu duruma *aktiviteye-bağımlı sinaptik modifikasyonlar* denmektedir (31,33).

Gen knockout teknikleri kullanılarak öğrenme ve hafızada rolü olan NMDAR'üne bağlı sinaptik plastisite keşfedilmiştir. Yapılan bu deneyler CA1 hipokampal NMDAR'ünün hipokampusa bağımlı spatial ve non-spatial hafızaların oluşması için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (36). Öğrenmenin değişik formlarının meydana gelmesinde rolü olan hipokampusta sinaptik plastisitenin bir türü olan LTP öğrenme ve hafızanın nöronal mekanizmalarını araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (33,34). LTP sinaptik kuvvetteki aktiviteye bağımlı uzamış artış olarak tanımlanabilir (35). Daha önceki çalışmalar hipokampal sinaptik plastisitenin LTP benzeri formlarının spatial öğrenme ve hafıza ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (33). Hipokampusun CA1 bölgesindeki LTP'nin indüksiyonu bir dizi olayı içerir. İlk olarak NMDAR kanalının presinaptik glutamat salınımına cevap olarak açılması için postsinaptik membranın yeterince depolarize olması gerekir. Kanalın açılması postsinaptik hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun önemli derecede yükselmesine olanak verir. Ca^{+2} 'daki bu artış metabotropik glutamat reseptörünün aktivasyonuna bağlı fosfoinozitid düzeylerindeki yükselmeyle birlikte PKC ve CAMKII'nin de dahil olduğu proteinkinazların aktivasyonuna neden olur. Bu proteinkinazlar daha sonra sinaptik kuvvette uzun süreli modifikasyonlara yol açacak proteinleri düzenlerler (35).

Homosinaptik LTD ise sinaptik kuvvetin aktiviteye bağımlı uzamış zayıflaması olarak tanımlanır ve bir anlamda LTP'nin fonksiyonel karşıtıdır. CA1 alanındaki LTP gibi LTD'nin indüksiyonu da NMDARs'nin aktivasyonuna ihtiyaç duyar (35,36).

Sinaptik aktivitenin regülasyonunda protein fosforilasyonu ve defosforilasyonunun önemli mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. NMDAR kanalının subünitleri farklı proteinkinazlar ve protein fosfatazlar tarafından doğrudan fosforile ve defosforile edilir. NR1 , NR2A ve NR2B subünitleri hem cAMP bağımlı PKA hem de PKC tarafından farklı bölgelerden fosforile edilebilir. CAMKII NR2B subünitinin karboksi terminal ucundaki spesifik bir kalıntıyı ve/veya onun NR2A subünitindeki karşılığını fosforile eder. Protein tirozin kinaz da NR2A ve NR2B subünitlerini fosforile eder (37).

NMDAR tipleri:

NMDAR'lerinin şu ana kadar tanımlanan yedi tane subüniti vardır. Bunlar; NR1, NR2A-B-C-D ve NR3A-B (6,57). NMDARs beynin tümünde yaygın olarak bulunurlar ancak baskın olarak ön beyine lokalize olmuşlardır. En yüksek düzeyde buldukları yer ise hipokampusun CA1 bölgesidir (30).

NR1: Glisin bağlayıcı bölgeyi içerir. 938 aminoasitten'ten meydana gelmiştir. 105,5 kDA ağırlığındadır. NR1 reseptör subtip ekspresyonu MSS'de hemen hemen her yerde bulunur.

NR2: Glutamat bağlayıcı bölgeyi içerir. 4 grubu bulunur:

-NR2A: Beyinde postnatal ekspresyon edilir. 1464 aminoasitten meydana gelir ve 165.5 kDA ağırlığındadır. Ekspresyonu için yüzeyde NR1 N-terminalinin bulunması gereklidir. NR2A; NR1'e benzer olarak önbeyin ve serebellumda bulunur.

-NR2B: Tüm embriyonik beyinde ekspresyon edilir. Ayrıca embriyonik ve neonatal kardiyak myositlerde ekspresyon edilir. Postnatal olarak yalnız ön beyinde ekspresyon edilir. 1482 aminoasitten oluşur ve ağırlığı 165,9 kDA'dır. NR2B'nin ekspresyonu önbeyinde yüksektir.

-NR2C: Postnatal olarak serebellumda ekspresyon edilir. 1239 aminoasitten oluşur ve 135,4 kDA ağırlığındadır. NR2C'nin ekspresyonu ise serebellumda çok fazla miktarda bulunur.

-NR2D: Diencephalon ve beyinsapında embriyonal ve neonatal olarak ekspresyon edilir. 1323 aminoasitten oluşup 142,9 kDA ağırlığındadır. NR2D'nin ekspresyonu ortabeyin ve arkabeyinde yüksek fakat önbeyinde düşük miktardadır. NR2A ekspresyonuna tamamlayıcıdır.

NR3: Silik fonksiyon gösterir. NR3A ve NR3B olarak iki tiptir. Ca^{+2} permeabilitesi yavaş ve uzun sürer. NR3A; Serebellum hariç korteks, hipokampus (CA1), ortabeyin, arkabeyin ve spinal kordda ekspresyon edilir. Neonatal ekspresyonları çok güçlüdür, sonra azalmaya başlarlar (31,32).

NMDARs'nin Yapısı:

Şu anda genellikle hem fikir olunan nokta; NMDAR'lerinin NR1 subüniteleri ve beraberinde NR2 subünitelerinin en azından bir tipinden oluşan heteromerik yapılar olduğudur. NR2 subünitelerinden gelen domainler glisin bağlanma bölgesini oluşturur. Membrana doğru dizilmiş her glutamat reseptör subünitesi, farklı yaklaşımların bir bileşkesinden ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalar kaçınılmaz bir kanıt ortaya koymuştur : NMDAR, AMPAR ve KAR subüniteleri 3 adet membrana uzanan domain içerir (M1, M3 ve

M4). M2 domaini membrana stoplazmik kenardan daldırılmış şekilde bir büküm oluşturur. Her NMDAR alt ünitesi geniş bir extrasellüler N-terminal domaini ve intrasellüler C-terminali sergiler (31,32,35).

NMDAR poru Ca^{+2} 'a yüksek derecede geçirgenlik sağlar ve Mg^{+2} ile bloke olur:

NMDAR'ü voltaja bağımlı tek iyonotropik reseptördür. Normal miktarlarda Ca^{+2} bazı bellek tiplerinin oluşmasında gerekli sinyal yollarını tetiklemektedir. NMDAR'lerinin aktivitesi Mg^{+2} ile voltaja hassas blokajı ve Ca^{+2} 'a geçirgenliği pora uzanmış olan M2 segmentindeki aminoasit rezidülerine dayanmaktadır. Katyon seçiciliği M2 segmentinin kritik bir alanına (N alanı) dayanır, bu alan NR1 ve NR2 alt ünitelerinde bulunan bir asparajin rezidüsü tarafından oluşturulur. NR2 alt ünitesi, membranın extrasellüler yüzünden gelen Mg^{+2} iyonları için temel bağlanma bölgesini içerir. Yani Mg^{+2} blokları M2'deki kritik asparajin rezidüleri veya onlara çok yakın olan aminoasit rezidülerinin etkileşimine dayanır. Bu bağlanma bölgesi; N bölgesi, yüksek Ca^{+2} geçirgenliği için kritiktir. NR1 rezidüleri kanalın dış vestibülünü oluşturur. Bu vestibül M3 (C-terminal ucunda) ve M4 (N-terminal ucunda) segmentlerinin M1'den önce gelen parçaları tarafından oluşturulmuştur (31-33,35).

Santral Sinir Sisteminde NMDA Reseptörünün Nörosteroidler Üzerindeki Etkisi:

Beyinde sentez edilip çevreye salıverilen nörosteroidlerin sinaptik aşırımı ve postsinaptik cevapları biyokimyasal, elektrofizyolojik ve davranışsal incelemelerle ortaya konulmuştur. Nöronlardaki G-proteinleri, GABA veya NMDAR'leri gibi reseptör-iyon kanalı kompleksi üzerindeki bağlanma bölgelerini aktive ederek etkilerini gösterirler. Bu etki genomik etkiden farklı olarak çabuk gelişir. NMDA reseptör aracılığı ile nöronlar içerisine Ca^{+2} girişini arttırırlar. Buna bağlı olarak steroidlerin farelerde NMDA maddesinin konvülsiyon yapıcı etkilerini arttırdıkları bulunmuştur (31,33).

Nörolojik Hastalıklar ve Glutamat Reseptör Aktivasyonunda artış:

Bazı koşullar altında glutamat gibi eksitator nörotransmitterlerin dengesizliği, bazı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Yüksek miktarlarda glutamat nöronlar için toksiktir. Beyindeki birçok hücrede L-glutamata yanıt veren reseptörler bulunmaktadır. Doku kültürlerinde ortama yüksek düzeyde glutamat eklenmesi bir çok nöronu öldürmektedir, buna glutamat eksitotoksitesi adı verilmektedir. Bir çok hücrede bu tür toksisite NMDA tipi reseptörlerden Ca^{+2} 'un hücre içine girişi sorumlu tutulmaktadır. Yüksek intrasellüler Ca^{+2} , kalsiyuma bağlı proteazları ve fosfolipazları aktive ederek hücreye toksik olan serbest radikallerin oluşmasına yol açmaktadır. Stroke (İnme) sonrası hücre hasarından, status epilepsisinde tekrarlayan episodlarında ortaya çıkan hücre ölümünden, Huntington hastalığı, ALS'de olivopontocerebellar atrofi gibi dejeneratif hastalıklarda kronik glutamat reseptör

aktivasyonu ve glutamat toksisitesinin payı olduğu düşünülmektedir. Spesifik NMDAR blokerleri, glutamatın toksik etkisini engelleyebilmesi nedeniyle bugün kliniklerde kullanılmaya başlanmıştır.

Enerji metabolizması ile özellikle uyduğu zaman glutamat ve aspartat exotoksin olabilir. Dikkate değer olarak hipotalamusun arcuate nükleusunda kan-beyin bariyeriyle iyi korunmayan alanlarda akut nörodejenerasyon gösterilmiştir. İyonotropik glutamat reseptörlerinin çoğunun aktivasyonu çeşitli nörodejenerasyon mekanizmalarını içine alır. Örneğin nörodejenerasyonu iskemik olay izler ve LTP benzeri fenomenin patolojik aşırılığı bağlanma mekanizmalarına benzeyebilir. Ca^{+2} girişi ve eşlik eden NMDAR ilgisi ile özellikle AMPAR aktivasyonundan nöronal hasar ortaya çıkar.

Glutamat aracılı nörotoxicitede predispoze nöronlarda bozulmuş ATP üretimi metabolik inhibisyonuna yol açar. Hasarın şiddetlenmesi ile serbest O_2 radikalleri ortaya çıkar. Bozulmuş Ca^{+2} homeostazı ile sonuçta enerji metabolizması hasar görür ve bazı kronik nörodejeneratif hastalıklar belirginleşebilir (31,33,35).

NMDAR'ünün diğer bir özelliği de hallusinerjik bir ilaç olan phenycyclidine (melek tozu olarak da bilinir) ve MK-801 tarafından inhibe edilmesidir. Her ikisi de kanalın iç kısmına ancak Mg^{+2} 'un bağlandığı yer dışında bir yere bağlanmaktadır. NMDAR blokajı şizofreni ile ilişkili hallusinasyonlara benzer bir tablo oluşturmaktadır. Ayrıca, antipsikotik ilaçlar NMDAR kanalından iyon akışını arttırmaktadırlar. Bu bulgular, şizofrenide NMDAR hasarının yer alabileceği hipotezine yol açmıştır (31,33,35).

2.4. Nikotin, Nikotinik Kolinergik Sistem Ve Glutamaterjik Sistem Etkileşimi

Nikotin direk nikotinik reseptör subtipleri üzerinden ve bazı etkileşimlerle çeşitli nörotransmitterlerle kompleks ve çeşitli etkilerini gösterir. Bu etkileşimlerin mekanizmasını anlamak hafıza fonksiyonu üzerine nikotin aktivasyonunun kompleks doğasını anlamaya yardımcı olacaktır. Nikotin çeşitli nörotransmitterlerin salınımını stimüle eder. Hafıza üzerine nikotinik etkilerin önemli yönü nikotin ile indüklenen nörotransmitter salınımının sekonder etkileriyle yönlendiriliyor olabilmesidir (7).

NMDA glutamat reseptör sisteminin hafıza fonksiyonu üzerinde önemli fonksiyonları olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. NMDAR antagonisti dizosilpin (MK-801) hipokampektomi ile benzer şekilde hafıza bozuklukları yapmıştır. Dizosilpin ratlarda ve maymunlarda hafıza bozukluğuna neden olmaktadır. Diğer NMDAR antagonistleriyle de örneğin APV ile de kognitif fonksiyonda bozulma olmaktadır (7).

Glutamat sistemi ve nikotinic sistem arasında direk etkileşim vardır. Nikotinin glutamat salınımını güçlü bir şekilde stimüle ettiği gösterilmiştir ve çok çeşitli farmakolojik etkileri de bu mekanizmayla yönlendiriliyor olabilir. Glutamat sistemleri özellikle de glutamat NMDAR subtipinin hafıza fonksiyonu üzerinde çok önemli olduğu gösterilmiştir. Özellikle kognitif fonksiyonla ilgili olarak, hipokampüste nikotin ile indüklenen glutamat salınımı çok önemlidir. Daha önceki çalışmalarda hipokampal glutamat NMDA sistemleri ve hipokampal nikotinic sistemler hafıza fonksiyonu için önemli bulunmuşlardır (7).

Nikotinin hipokampüsü de içeren farklı beyin bölgelerinde akson terminallerinde bulunan presinaptik reseptörlerde aktivasyon gösterdiği bilinmektedir. Bu reseptörler yoluyla nörotransmitter salınımını arttırdıkları sinaptozomlarla yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Elektrofizyolojik çalışmalarda elde edilen son verilerle birlikte tüm bulgular bize nikotinin postsinaptik nikotinic reseptörlerden çok presinaptik nikotinic reseptörlerde aktivasyon ile davranışsal etkilerini sağladığı ve MSS'de nikotinic reseptörlerin transmisyonu yönlendirmekten çok düzenlediğini düşündürmektedir (8).

Eksitatör sinaptik transmisyon nAChR'lerinin modülasyon için muhtemel hedefidir. Nikotin, presinaptik nAChR'lerini aktive ederek glutamat salınımı yapan sinir terminallerine Ca^{+2} iyonlarının girişini sağlayarak glutamaterjik sinaptik aşırımı arttırdığı düşünülmektedir (8).

Salınan glutamat kognitif işlemlerde özellikle rol oynayan NMDAR tipinin de içinde bulunduğu çok sayıda postsinaptik reseptörü aktive eder. Postsinaptik hücrelerdeki NMDAR'lerinin aktive olmasıyla Ca^{+2} akımı olur ve Ca^{+2} kalmodulin aktive olur. Kalmodulin ise NOS'u stimüle ederek NO üretilmesini sağlar. Sonuçta NO soluble guanilil siklazı aktive ederek cGMP üretir. Bu klasik hücre içi ikinci mesajcı yapı selektif fosfodiesterazlar tarafından bazal düzeylerine düşürülür. Nöronal olarak üretilen NO'nun hafıza formasyonunda rol oynadığına dair bazı kanıtlar vardır. Çeşitli laboratuvar hayvanlarıyla yürütülen deneysel çalışmalarda NOS'u inhibe ederek NO üretiminin bloke edildiğinde öğrenmeyi bozduğu gösterilmiştir (9). Başka bir çalışmada guanilil siklazın inhibisyonuyla koyunlarda koku hafızasının önlediği gösterilmiştir. Özetle çıkarılan sonuç cGMP kognitif olaylarda önemli rol oynuyor gibi görünmektedir (9). CGS19755 (100 μ M) veya MK-801 (30 μ M) adlı NMDAR antagonistlerinin lokal infüzyonuyla nikotin (4 mg/kg) tarafından arttırılan cGMP düzeyi %60 oranında inhibe olmaktadır. Bu iki antagonist tek başına uygulandığında cGMP bazal düzeylerini modifiye etmemektedir. Bu veriler nikotin etki şekliyle glutamaterjik sistem arasında fonksiyonel bir bağlantıya işaret etmektedir (9). cGMP'nin nikotine bağlı artışı mekamilamin'e (genel nikotinic antagonist) de sensitiftir.

Nikotine cGMP yanıtının NMDAR antagonistlerince azaltılması üzerine nikotinin endojen eksitatör aminoasitlerin salınımına neden olup olmadığına bakılmış. İntraperitoneal nikotin (4mg/kg) enjeksiyonu ile aspartat ve glutamat aminoasitlerinin extraselüler düzeylerinde hızlı ve geçici birikim olduğu saptanmış. GABA ve glisin düzeylerini etkilememiştir. İn vivo mikrodializ ile sürekli nikotin verilmeye devam edilerek stabil bir nikotin düzeyi sağlandığında aspartat ve glutamat akımının arttığı, GABA ve glisin aminoasitlerinin yine etkilenmediği saptanmış (9). Hipokampal LTP oluşumunun NOS inhibitörleriyle önlenemediği ve ekzojen NO'nun hipokampal sinaptik potansiyellerin artışını indükleyebildiği de rapor edilmiştir. Benzer şekilde soluble guanilil siklazın blokajının LTP'yi düşürdüğü gösterilmiştir. Son olarak Kendrick ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hipokampüsteki NMDAR/NO/cGMP yolağının bir bütün olarak hafıza formasyonunda yer alabileceği önerilmiştir (9).

2.5. MSS ve NO:

NO; Stabil bir serbest radikaldir. MSS'inde biyolojik haberci molekül gibi davranır ve fizyolojik şartlarda sinaptik plastisite, hafıza oluşumu, serebral kan akımı ve nöroendokrin sekresyonu gibi birçok fonksiyonda rol oynar (10,11,38,39). L-argininden NOS yoluyla enzimatik olarak elde edilir. Bu enzim Ca^{+2} calmoduline ihtiyaç duyar. Ca^{+2} akımı NOS'un aktivasyonuna neden olur. Hücre içi konsantrasyonu aşırı arttığında, nöron ölümü ile sonuçlanan toksik olayları başlatır. MSS'de glutamat aşırımı esnasında, NMDAR'ünün aktivasyonu, büyük miktarda Ca^{+2} akışına neden olur. Bunu takiben de NO oluşumu artar. NO ile aşırı uyarı nöronların tahrip olmasına neden olur (39). Yani NO'nun glutamatın nörotoksik etkisine aracılık ettiğine, LTP ve long term depresyon (LDP)'yi destekleyip, nörotransmitter salınım ve geri alınımını modüle ettiğine inanılmaktadır (10). Nikotin daha çok presinaptik nAChR'leri üzerinden ACh,dopamin, norepinefrin, serotonin, glutamat ve GABA transmitterlerinin salınımını sağlayarak nörokimyasal ve davranışsal etkilerini ortaya koyuyor. Her ne kadar nAChR'lerinin aktivasyonu hücreye özellikle Na^{+} akışı olduğu iyi bilinse de bazı nAChR'lerinin aktivasyonunu Ca^{+2} ile sergilediğine dair kanıtlar vardır. İntraselüler Ca^{+2} artışı nörotransmitter salınımını tetikleyerek, NO sentezinin regülasyonu gibi çeşitli nöronal fonksiyonlar ile etki gösteriyor ki bu da nikotine bağlı kognitif fonksiyonların gelişmesini etkileyebilir (10,40).

2.6. MSS VE Oksidatif Stres

Oksidatif stres sonucu oluşan beyin yıkımı ve fonksiyon yitimi, yaşam kalitesi ve süresiyle bağlantılıdır. Oksidatif stres, serbest radikal üretimi ve hücrelerin serbest radikal hasarına karşı koyabilme yetileri arasındaki sitopatolojik zincirleri ifade eder. Hücre içi serbest radikal kaynakları olan mitokondrial oksidatif metabolizma, nitrik oksit, fosfolipid metabolizması ve proteolitik geçiş yolları, oksidatif strese katkıda bulunur. Oksidatif stres serbest radikallerin üretimiyle artar, serbest radikallerin ortadan kaldırılmasıyla veya oksidatif modifiye moleküllerin onarımıyla azalır. Bu dengesizlik hücresel disfonksiyona ve hücre ölümüne neden olabilen oksidatif modifiye moleküllerin yapılanmasıyla sonuçlanır (38). Çoğu canlı türünün yaşadığı oksidatif çevrede yaşamın sürdürülmesi için, bu canlı türlerinin, oksijence zengin çevrenin zararlı etkileri ile mücadele edebilecek moleküler araçlarla donatılması gereklidir. Organizmalar, oksidasyona karşı direnç sağlayan antioksidan olarak ifade edilen moleküllere sahiptirler (41,42). Antioksidan savunma sistemi diye adlandırılan bu kompleks süreç, genç organizmalardaki çoklu oksidatif reaksiyonlarda dengeyi sağlamak için az veya çok elverişlidir; ancak yaş ilerledikçe veya organizmalar toksin ve/veya serbest radikal üreten reaktiflere maruz kaldıklarında, antioksidan savunma elemanları işlevlerini yapamazlar. Sonuçta ilgili hastalıklar ve yaşlanma belirtileri ortaya çıkar (43). Yaşlanma sürecinde, beslenme ve egzersiz gibi faktörlerin etkisi ile oksidatif stresin tetiklediği ve çok fazla miktarda serbest radikal üretildiği bilinmektedir. Serbest radikaller, ateroskleroz, diyabet, kanser, katarakt, AH, PH ve romatoid artrit gibi yaşlanma sürecinin kronik hastalıklarının başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynarlar (11,12). Yaşlanma sürecinde oksidan ve antioksidan sistem arasındaki denge daha çok oksidan yöne kaymaktadır. Bu nedenle serbest radikal bağlantılı hastalıklara ve erken yaşlanmaya karşı koyabilmenin sırrı, organizmaların yaşam boyunca oksidatif süreçlerin bir sonucu olarak oluşan moleküler bozunmaya karşı koyabilme yeteneklerine bağlıdır (44,45).

Oksidatif stresten etkilenme açısından vücuttaki tüm organlar arasında en fazla payı MSS alır. (39,46). Bunun olası sebepleri şöyledir; Beyin vücut ağırlığının küçük bir yüzdesini (%2) oluşturmasına rağmen solunan oksijenin büyük bir miktarını tüketir (~%20). Oksijenin yan ürünleri ise toksiktir. Bu nedenle nöral doku diğer organlardan daha çabuk yıkıma uğrar. Beynin oksidatif metabolik aktivite hızı yüksektir. Beynin oksidatif hasara karşı koyabilme yeteneği sınırlıdır. Bu durum önemli anti oksidan enzim seviyelerinin düşük olmasına bağlıdır. Beyinde yüksek miktarda demir ve askorbik asit vardır (39).

Nöral membranların içerdiği fosfolipidler kolayca okside olan linoleik asit ve araşidonik asit (AA) gibi çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)'ları yüksek konsantrasyonlarda

içermektedir. AA, beyin kesitlerinde süperoksit anyon radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu artırır. Bu durum nöronal hücrelerin ölüm nedenidir. AA, astrositlere glutamat geçişini azaltır, bu durumda, sinaptik aralıktaki glutamat konsantrasyonu artar. AA, glutamat alınımlarını inhibe ederek ve hücre içi Ca^{++} konsantrasyonlarını arttırarak eksitotoksisiteye neden olabilir (38).

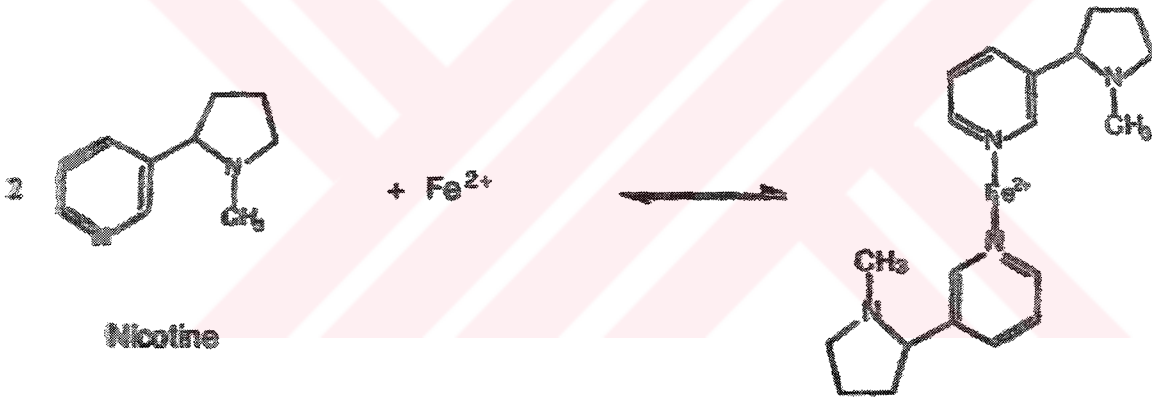
Beyindeki kan-beyin bariyeri birçok toksinin MSS'ne girişini engellemede önemli rol üstlenmiştir. Ancak diğer taraftan antioksidanların girişini de engellemektedir. MSS ile ilgili diğer bir problem ise nöronal hücrelerdeki kaybın kalıcı olmasıdır. Çünkü nöronal hücreler kendilerini yenileyemez. Nöronal kayba neden olan serbest radikallerin, A β tarafından üretildiği bilinmektedir. A β peptidinin nörotoksitesinin azaltılması, hücresel yaşam süresini arttırır. Nöronlarda oksidan hasar sonucu, kan-beyin bariyeri, sinaptik ileti, mitokondrial solunum zinciri ve iyon dengesi bozulur. Bu nedenle, nöronların ve sinaptik bağlantılarının sayılarındaki azalma tüm MSS fonksiyonlarını etkilemektedir. Serbest radikaller AD, PD, Huntington koresi, ALS , Multibl Skleroz, demans, travmatik beyin hasarı epilepsi gibi birçok nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır.

2.6.1. Nikotin ve Oksidatif Stres

PH ve AH riski ile sigara kullanımı arasında ters bir orantı varolduğu bilinmektedir. Sigara dumanı içindeki bileşiklerden biri olan nikotin bu etkilerden sorumludur. Bilimsel çalışmalar göstermiştir ki sadece sigara kullanımı değil nikotin sakızı, nikotin yamaları PH'de tremorları ve bradikineziyi azaltır. AH'de de dikkat, bilginin işlenmesi gibi fonksiyonları geliştirir. Ayrıca genç ve yaşlı ratlarda nikotin tedavisinin kognitif fonksiyonları düzelttiği görülmüştür. PH ve AH'nin patogeneğinde serbest radikaller ve demir (Fe) ile indüklenen oksidatif stresin rol oynadığına dair kanıtlar artmaktadır (9).

Çin Hamster Yumurtalık (CHO) hücrelerinde yapılan invitro bir çalışmada (+)-nikotin,(-)-nikotin ve enantiomerleri ile (4-6mM) hücreler indüklenmiş,10mM doz ile CHO hücrelerinin koloni oluşturması inhibe olmuştur. Hücelere 1 ,5 ve 10mM nikotin 24 saat uygulanmış, malondialdehit (MDA; lipid peroksidasyonun bir indikatörüdür. Hücresel membranların oksidatif stresle bozulması sonucu açığa çıkar.), GSH, LDH düzeyleri kromatografik (HPLC) yöntemle saptanmış. 5 ve 10mM nikotin konsantrasyonuyla GSH düzeyinde anlamlı bir düşüş, MDA düzeyinde anlamlı bir yükselme saptanmış. Ayrıca stoplazmik bir markır olan LDH aktivitesi 5mM ve 10mM nikotin ile yükselmektedir. SOD, Cat gibi serbest radikalleri detoksifiye eden enzimlerin eklenmesiyle kültür ortamında nikotin ile indüklenen GSH düşüşünü inhibe etmiştir. Hücrelerdeki LDH aktivitesi de kontrol

düzeylerine dönmüştür. Bu bulgular göstermiştir ki (+)-nikotin,(-)-nikotin ve enantiomerleri CHO hücrelerinde oksidatif stresi indüklemektedir. Ancak bu çalışma yüksek dozlarda ve CHO hücresinde yapılmıştır. Cevap doz ve dokuya bağlı değişebilir (1). Memelilerde yapılan çalışmalarda nikotinin indüklediği maksimum oksidatif stres rat beyinde mitokondride bulunmuştur. Nikotinin mitokondrial solunum zincirini kırarak süperoksit anyonunu ve hidrojen peroksit oluşumunu arttırdığı rapor edilmiştir (1). Ek olarak nikotinin sitokrom P-450'nin monooksijenazlarınca yönlendirilen metabolizması oksijene ihtiyaç duyar (2). Yüksek doz nikotin ve enantimerlerin hücre içi metabolizması esnasında sitokrom P-450 enzimlerinin aktivitesi artarak serbest radikal oluşumuna neden olabilir. İlginç olarak oksidan etkilerinin tersine PD ve AD'de nikotinin sağladığı yararın antioksidan mekanizmalar üzerinden olabileceği düşünülmüyor. Sigaradaki nikotinin PD'ye karşı koruyucu etkisi vardır, NS-DA nöronları koruyan bazı olası mekanizmalar vardır. PD'de nikotin aktivitesinin akla yakın mekanizmalarından biri nikotinin bilinen mekanizmalarından olan Fe(II) ile kompleksler oluşturabilmesidir. Bu büyük olasılıkla piridin nitrojen yoluyla.



Nikotin tromboxan sentazın demir iyonuna direk bağlanarak enzimi inhibe eder. Nikotin retikülositler ve plasental hücrelerin transferrin aracılığıyla aldığı demir iyonunu azaltır. Bu bulguların ışığında nikotin için şöyle bir hipotez oluşturulmuştur; nikotin demir (II) ile kompleks oluşturarak PH'de koruyucu etki yaratır. Demir ile oluşturduğu kompleks fenton reaksiyonunu bloke eder. Bu şekilde fenton-inaktif koşullarda daha az oksidatif strese neden olabilir. Nikotin, 6-hidroksidopamin nörotoksininin oluşumunu bu şekilde etkileyebilmektedir. Bu da PH ve AH'de nikotinin sağladığı yararlı veya koruyucu etkilerin en azından bir kısmının antioksidan mekanizmalarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (2).

Rat beyininin mitokondrisinden hazırlanan numunelere nikotin uygulandığında 6-hidroksidopamin otooksidasyonu ile lipid peroksidasyonunu azaltmıştır (9). Ratlarda yapılan

çok sayıda çalışmada nikotin uygulamasının öğrenme ve hafıza süreçleri üzerine yararlı etkilerine işaret edilmiştir. Yaşlı ratlarda sentetik ve doğal antioksidanlarla tedavi ile kognitif performans artabilmektedir. Bu durum nikotinin kognitif performansı artırıcı etkisinin antioksidan mekanizmalar üzerinden olabileceği varsayımını doğrulamıştır.

Ancak bu çalışmada hafıza gelişimi sağlanan yaşlı ratlarda beyinlerinde ROS oluşumu ve TBARS oluşumunda herhangi bir azalma görülmedi. Kognitif gelişme gösteren ratlarda kognitif açıdan önemli beyin bölgelerinde (neokortex, hipokampus, neostriatum) ROS üretimini veya lipid peroksidasyonunu etkilemediği gösterilmiştir. Benzer şekilde invitro deneylerde neokortikal homojenatlarla çeşitli dozlarda nikotin ile yapılan çalışmalarda TBARS oluşumunda supresyon gözlenmemiştir. Beyin dokusunda nikotinin antioksidan özelliklerine dair herhangi kanıt bulunamamıştır.

Daha önce yapılan çalışmalar göstermiştir ki lökositlerde nikotinin antioksidan aktivitesi vardır. Bu çalışmadan şu sonucu çıkarabiliriz ki nikotinin antioksidan aktivitesi dokuya spesifik olabilir. Alternatif olarak nikotinin ratların beyinlerinde antioksidan aktiviteleri olabilir bu etkilerini ölçülmeyen oksidatif markırlarla (protein oksidasyonu, DNA oksidasyonu, hidroksil radikali oluşumu) göstermiş olabilirler. Sonuçta, nikotinin motor ve kognitif fonksiyonlar üzerine pozitif etkisi ayrı ayrı veya birbiriyle ilişkili çeşitli non-antioksidan mekanizmalar içerebilir. Öncelikle, nikotin nöronlar üzerindeki presinaptik veya postsinaptik nikotinik reseptörler üzerinden aktivitesini gösterir, ACh ve nonkolinerjik nörotransmitterlerin salınımına neden olur. İkinci bir husus nikotin beyinde glukoz alınımını artırır. Bu açıdan Alzheimer hastalarına glukoz uygulaması ile kognitif performanslarında gelişme sağlanabilmesi dikkate değerdir. Üçüncüsü nikotin uygulaması bölgesel serebral kan akımını artırır, bu da nöronal fonksiyon üzerine yararlı etkiler sağlar. Özetle, kromatografik deneylerde, PH ve AH'de nikotin antioksidan mekanizmalarla terapötik etki sağlayabilmektedir. Ancak hayvan deneyleri nikotinin motor ve kognitif aktivasyonundan non-antioksidan mekanizmaların sorumlu olduğunu düşündürmektedir (9). Newhouse ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada elde ettikleri sonuçlarla şöyle bir hipotez kurmuşlardır; düşük konsantrasyonda nikotin ile serbest radikal oluşumu engellenerek veya zincir kırıcı etkiyle lipid peroksidasyonu engellenerek antioksidan gibi davranmaktadır (1). Dolayısıyla nikotinin oksidan, antioksidan veya bu açıdan hiçbir etkisinin olmadığını gösteren çeşitli çalışmalar vardır. Nikotinin oksidatif stres ve nöral korunma üzerine doz farkı ve etkileyen mekanizma açısından etkileri farklıdır. Genel olarak, yüksek doz nikotin nörotoksikite ve oksidatif stresi stimüle eder. Ancak düşük konsantrasyonda nikotin ile antioksidan gibi davranmakta ve nöral koruyucu etki açısından çok önemli bir rol oynamaktadır. Ancak insan

hücre kültürlerinde ve sigara içiminin sağladığı nikotin konsantrasyonuyla daha detaylı çalışmalar yapılmalıdır. Cevap nikotin konsantrasyonuna ve dokuya özgü olabilir (1).



MATERYAL METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 250-300 gr olan Spraque Dawley cinsi toplam 40 adet erkek rat kullanıldı. Ratlar 3-6 aylık ve 12-24 aylık, genç ve yaşlı grup oluşturmak üzere iki grup halindeydi. Ratlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12saat karanlık) ve ısı (25° C)'da yem ile suyun kısıtlanmadığı koşullarda 4 hafta süre ile beslendiler. Deney sürecinin başlangıcında ve sonunda olmak üzere toplam iki kez tüm ratların ağırlıkları ölçüldü. Ratlar genç kontrol grubu (n=10), genç nikotin grubu (n=10), yaşlı kontrol grubu (n=10) ve yaşlı nikotin grubu (n=10) olmak üzere toplam dört gruba ayrılarak özel olarak hazırlanmış kafeslerde beşerli gruplar halinde tutuldular. Ratlara uygulanacak yeteri kadar (-)-nikotin hidrojen tartrat tuzu (Sigma, Amerika) hergün tekrar tartılıp, serum fizyolojik içinde çözülüp, fosfat tamponu kullanılarak pH'ı 7.4'e ayarlandı.

Nikotin ratlara 0,45 mg/kg olacak şekilde, günde iki kez (08:30 ve 17:30), 18 gün boyunca cilt altına enjekte edildi. Kontrol grubuna da eş zamanlı olarak serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı (47).

Son enjeksiyondan 15 saat sonra eter anestezisi altında ratlar dekapite edilerek öldürüldü. Beyinleri alındı. Soğuk fosfat tamponuyla ıslatılmış filtre kağıdı buz paketleri üzerine konarak hipokampüs çıkartma düzeneği oluşturuldu. Dekapitasyondan hemen sonra bu düzenek üzerinde hipokampüsler çıkarılarak önceden hazırlanmış içi 50mM fosfat tamponu dolu ependorflara konuldu ve -20°C'de saklandı.

Deney süreci boyunca hayvanların davranış ve genel durumları gözlemlendi. Yan etki görülmedi. Deney sonunda genç nikotin grubundan 4 tane, genç kontrol grubundan 2 tane, yaşlı nikotin grubundan 2 tane ve yaşlı kontrol grubundan 1 tane rat öldü.

3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Aletler

- | | |
|-------------------------|--------------------------------|
| 1- Soğutmalı santrifüj: | Eppendorf MR5415 (Almanya) |
| 2- Santrifüj: | Nüve-NF 815 (Türkiye) |
| 3- Derin dondurucu: | Scientific Snijders (Hollanda) |
| 4- Hassas terazi: | Scaltec (İsviçre) |
| 5- Vorteks: | Nüve NM 100 (Türkiye) |

- 6- Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7- Spektrofotometre: Shimadzu UV 1201V 1600 (Japonya)
8- Cam-Teflon Homojenizatör
9- Sonikatör: Bandelin Sonoplus (Almanya)
10- pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
11- Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
12- Elektroferez Cihazı: EC 250 (ABD)
13- U.V Transilluminator 2000:Biorad :

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

(-)-nikotin hidrojen tartrat tuzu (Sigma)

Lipid peroksidasyonu tayini için kullanılanlar:

- 1- Trikloroasetik asit (TCA) Merck (Almanya)
- 2-Tiyobarbitürik asit (TBA) Merck (Almanya)

Nitrik Oksit (NO) tayini için kullanılanlar:

- 1- Sülfonilamid Merck (Almanya)
- 2- N-Naptil ethylenediamine Merck (Almanya)
- 3- NaNO₂ Merck (Almanya)
- 4- Cadmium Merck (Almanya)
- 5- Sülfürik asit Merck (Almanya)
- 6- Sodyum hidroksid Merck (Almanya)
- 7- Glisin Merck (Almanya)

SDS-PAGE ve Western Blot için kullanılanlar:

- 1- Akrilamid : bisakrilamid %30 T, %2.6 C Sigma (Almanya)
- 2-Tris Merck (Almanya)
- 3-Glisin Merck (Almanya)
- 4-SDS Merck (Almanya)
- 5-APS Merck (Almanya)
- 6-TEMED Merck (Almanya)
- 7-2-Merkaptoetanol Merck (Almanya)
- 8-Brom fenol blue Merck (Almanya)
- 9-Sodyum klorür Merck (Almanya)
- 10-Tween 20 Merck (Almanya)

- 11-Bovin Serum Albumin Merck (Almanya)
- 12-EDTA Merck (Almanya)
- 13-EGTA Merck (Almanya)
- 14-Leupeptin Sigma (Almanya)
- 15-Aprotinin Sigma (Almanya)
- 16-Benzamidin Sigma (Almanya)
- 17-Triton X-100 Sigma (Almanya)
- 18-Immobilon P Sigma (Almanya)
- 19-Kromotografi filtre kağıdı Whatman (İngiltere)
- 20-Metanol Merck (Almanya)
- 21-Hidroklorik asit Merck (Almanya)
- 22-Anti NR2A Sigma (Amerika)
- 23-Anti NR2B Sigma (Amerika)
- 24- α 7AChR poliklonal Ab Santa Cruz (Amerika)
- 25-Monoklonal anti-rabbit IgG Sigma (Amerika)
- 26-BCIP/NBT Sigma (Almanya)
- 27-Prestained Molecular Weight Marker Sigma (Amerika)

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

Lipid Peroksidasyonu tayini için kullanılanlar:

1-TCA çözeltisi (%10): 10 g TCA tartılıp, bir miktar distile suda eritilir ve son hacim 100 mililitreye tamamlanır.

2-TBA çözeltisi (%0.67): 0.67 g TBA tartılıp, bir miktar distile suda eritilir ve son hacim 100 mililitreye tamamlanır.

NO için kullanılanlar:

1-Sülfonilamid solüsyonu: % 2,5 fosforik asit içinde, %1 sülfonilamid olacak şekilde distile su içinde hazırlanır.

2-N-Naphtil ethylendiamine solüsyonu: %1 N-Naphtil ethylendiamine distile su içinde hazırlanır.

3-Nitrit Standardı: 100 μ M konsantrasyonda olacak şekilde NaNO_2 olacak distile su içinde hazırlanır. Bu stok standarttan; 80,60,40,20 ve 0 μ M konsantrasyonlarında standartlar distile su içinde hazırlanır.

4-Çalışma tamponu: 15g/L glisin, NaOH ile pH 9.7 olacak şekilde distile su içinde hazırlanır.

5-Sülfirik asit Solüsyonu: 100 mM H₂SO₄ distile su içinde hazırlanır.

6-NaOH Solüsyonu: 55mM NaOH'lık NaOH distile su içinde hazırlanır.

7-Kadmium: Numune başına 0,6 gr olacak şekilde hazırlanır.

SDS-PAGE ve Western-Blot için kullanılanlar:

1- 4xLower Buffer: 1.5 M Tris HCl pH=8.8

36.3 g Tris 170 ml su ile pH' ı 8.8 'e ayarlanır. Soğutulup tekrar ayarlanır. 200 ml 'ye distile suyla tamamlanır.

2- 4xUpper Buffer: 0.5 M Tris HCl pH=6.8

12.1 g Tris, 170 ml su ile pH' ı 6.8 e ayarlanır. Soğutulup pH' ı yeniden 6.8' e ayarlanır. 200 ml 'ye distile suyla tamamlanır.

Lower jel:(% 7.5 lik)

Distile su	4450µl
Acril : bisacril %30 T, %2.6 C	2500µl
4× lower buffer (tris HCl, pH=8.8	2500µl
%10 SDS	100µl
% 10 APS	450µl
TEMED	10µl

Upper jel: (% 4lük)

Distile su	2920µl
Acril : bisacril %30 T, %2.6 C	670µl
4× Upper buffer tris-HCl, pH=6.8	1250µl
%10 SDS	50µl
%10 APS	200µl
TEMED	10µl

3-Homojenizasyon buffer: 50 mM Tris-HCL pH 7.5, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 ng/ml Leupeptin, 100 ng/ml Aprotinin, 10 µmol benzamidin ve % 1 triton X100 bulunacak şekilde total hacim 50 ml ye tamamlandı.

4-Sample buffer

Upper buffer (0.5 M Tris HCl pH=6.8)	2.0 ml
Gliserol	1.6 ml
%10 SDS	3.2 ml
2-Merkaptoetanol	0.8 ml
%0.1(w/v) Brom fenol blue	0.4 ml

5-Running buffer: 5× 15 g Tris72 g, Glisin5 g, SDS, pH 8.3 e ayarlanıp distile su ile 1 lt ye tamamlanır. 5 kat sulandırılarak kullanılır.

6-Transfer buffer: 0.606 g Tris, 2.882 g Glisin, 1 ml % 10 SDS distile su ile 160 ml ye pH= 8.2 -8.4 olacak şekilde tamamlanır. 40 ml metanol eklenir.

7-TTBS (Tris-Tween-Buffer Saline): 12.1 g Tris, 17.5 g NaCl, 2 ml Tween 20 (pipetle yavaşça çekilir, yoğun bir madde olduğu için) pH= 7.5 olarak ayarlanıp 2 litreye distile suyla tamamlanır.

8-Primer antikolar: NR2A 1/3000 ve NR2B 1/5000 oranında taze hazırlanmış % 1 BSA -TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

9-Sekonder antikor: Antirabbit IgG (Alkalen Fosfataz Konjuge) 1:10.000 oranında taze olarak hazırlanmış %1 BSA-TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

3.2. METOD

3.2.1 Homojenizasyon

Hipokampuslar önce tartıldı. Hipokampusün bir yarısı lipid peroksidasyon ürünleri çalışılmak üzere ayrıldı. 1/5 oranında 0.1 M fosfat tamponu konarak homojenize edildi. Hipokampuslerin diğer yarısı SDS-PAGE ve Western Blot prosedürü uygulanmak üzere ayrıldı. Tartılan hipokampuslar her grupta 3 numune olacak şekilde birleştirildi ve 1/5 oranında homojenizasyon tamponu ile karıştırılarak homojenize edildi. İlk adımda buz üzerinde teflon-cam homojenizatör ile 18-20 darbede homojenize edildi. İkinci adımda 30 sn. buz üzerinde sonike edilerek homojenizasyon tamamlandı. Homojenize edilen örnekler 5000 g' de +4°C'da soğutmalı santrifüjde 5 dk santrifüj edildi. Homojenize edilen örneklerin süpernatantlarında Lowry yöntemi kullanılarak protein tayini yapıldı (62). Daha sonra örneklerde MDA ve NO düzeyleri ile SDS-PAGE ve Western Blot çalışıldı.

3.2.2. Lipid Peroksidasyonu Tayini

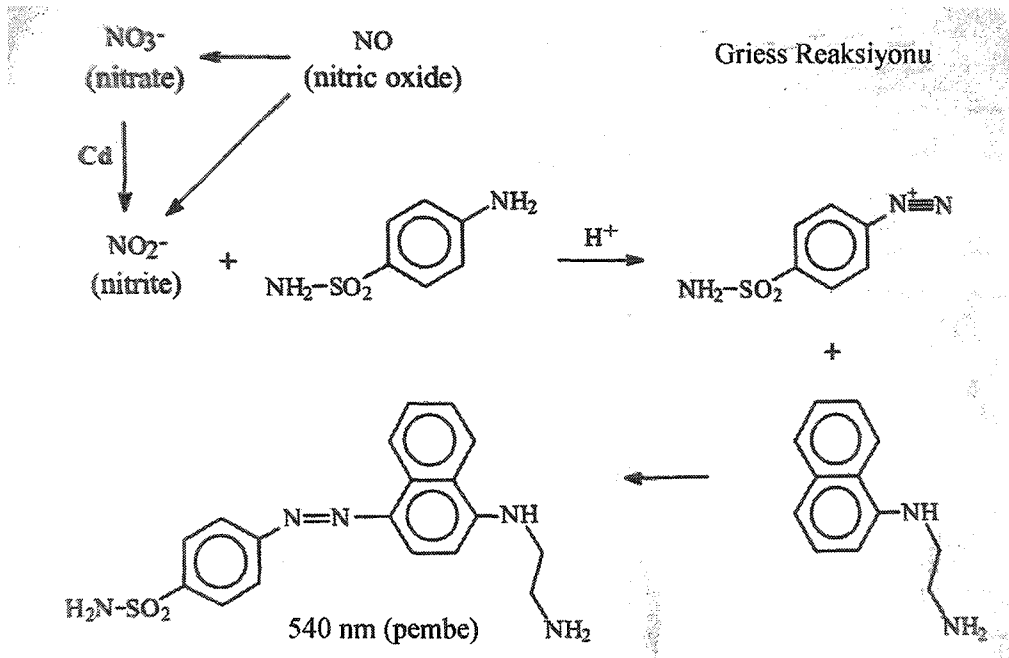
Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA; Draper ve Hadley'in tiyobarbitürik asit reaktivitesi metodu kullanarak ölçüldü (48). Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek, 532 nm de maksimum absorbans veren renkli bir kompleks oluşturur.

Deneyin yapılışı: 0.5 ml örnek üzerine 2.5 ml %10 luk TCA eklenerek karıştırıldı. 15 dakika kaynatılıp soğutuldu. 5000 devir/dk' da 10 dk santrifüj edildi. 2 ml süpernatant alınıp, üzerine 1ml %0.67 lik TBA eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 15 dk kaynatıldı ve hemen soğutuldu. 532 nm de absorbansları, numune yerine distile su konularak hazırlanan köre karşı okundu.

MDA-TBA kompleksinin 532 nm deki ekstinsiyon katsayısından ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) yararlanılarak nanomol/ml cinsinden MDA değerleri bulundu. Elde edilen değerler, protein değerine bölünerek sonuçlar nanomol/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.3. NO Tayini

Griess reaksiyonu ile, nitrik oksit ve nitrat, nitrite dönüştürülerek ölçüm yapıldı (49). Plazmada nitrat NO'nun dominant formudur. Numunelerdeki nitrat, kadmiyum aracılığıyla nitrite indirgenir. Kadmiyum basit heterojen redüktan bir maddedir. Daha sonra sülfonilamid ve N-Naphtyl ethylenediamine ile birleşen nitrit pembe renk alır, 540 nm'de absorbansı ölçülür. Standart olarak hazırlanan nitritler numuneler gibi çalışılıp bulunan absorbans – konsantrasyon grafiğinden bilinmeyen nitrik oksit konsantrasyonları mg protein başına hesaplanır.



3.2.4. SDS-PAGE Yöntemi

Laemmli'nin yöntemi esas alınarak çalışıldı (50). % 7.5'lik lower gel ve % 4'lük upper gel hazırlanıp, kuyucuk başına son konsantrasyonu 12.5 µgr protein olacak şekilde doku homojenatı sample buffer'la 1/1 oranında karıştırılarak uygulandı.

3.2.5. Western Blot Yöntemi

SDS-PAGE prosedürü ile örnekler jel üzerinde proteinlerine ayrıldı ve daha sonra polyvinylidene difluorid (PVDF) membrana (immobilon-P) transfer edilmek üzere transfer tankına alındı. Transfer prosedürü sonrası anti NR2A, anti NR2B ve anti $\alpha 7$ AChR içeren solüsyonlarda bir gece boyunca bekletildi. Daha sonra sekonder antikorla 1 saat süre ile inkübe edilen membranlar taze hazırlanan BCIP/NBT solüsyonunda yeterli boyanma sağlanana kadar bekletildi. Oluşan bantlar BIORAD U.V Transilluminator 2000 cihazı kullanılarak tarandı. Elde edilen bant yoğunlukları her bir reseptör subtipi için kendi arasında karşılaştırıldı.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler "SPSS 10.0 for Windows" paket programı kullanılarak yapıldı. Genel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı One way ANOVA ile değerlendirildi. Grupların birbiriyle karşılaştırılması için Bonferoni testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verildi. P değerinin 0,05'den küçük olması anlamlı kabul edildi.

4. SONUÇLAR

Western Blot analizi ile NR2A, NR2B ve $\alpha 7$ reseptör düzeyleri:

NR2A reseptör analizi sonucu genç nikotin grubunda genç kontrol grubuna göre reseptör düzeyinin anlamlı şekilde artmış olduğunu saptadık ($p < 0.05$). Genç nikotin ile yaşlı nikotin grupları arasında anlamlı bir fark saptayamadık ($p > 0.05$). Yaşlı nikotin grubunda yaşlı kontrol grubuna göre % 28'lik bir artış bulundu ($p > 0.05$). (Tablo 1)

NR2B reseptör düzeyinde genç nikotin grubunda genç kontrol grubuna ($p < 0.05$) ve yaşlı nikotin grubuna göre anlamlı bir artış olduğunu saptadık ($p < 0.05$). Yaşlı nikotin grubunda da yaşlı kontrol grubuna göre %22'lik bir artış bulundu ($p > 0.05$) (Tablo 1)

nACh $\alpha 7$ reseptör düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptamadık. ($p > 0.05$). (Tablo 1)

Hipokampüs MDA düzeyleri:

Gruplar arasında hipokampüs MDA düzeyleri açısından anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$). (Tablo 1)

Hipokampüs NO düzeyleri:

Gruplar arasında hipokampüs NO düzeyleri açısından anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$). (Tablo 1)

Tablo 1: Tüm gruplarda NR2A, NR2B ve nACh $\alpha 7$ reseptör yoğunlukları ile MDA ve NO düzeylerinin ortalamaları ve SEM değerleri

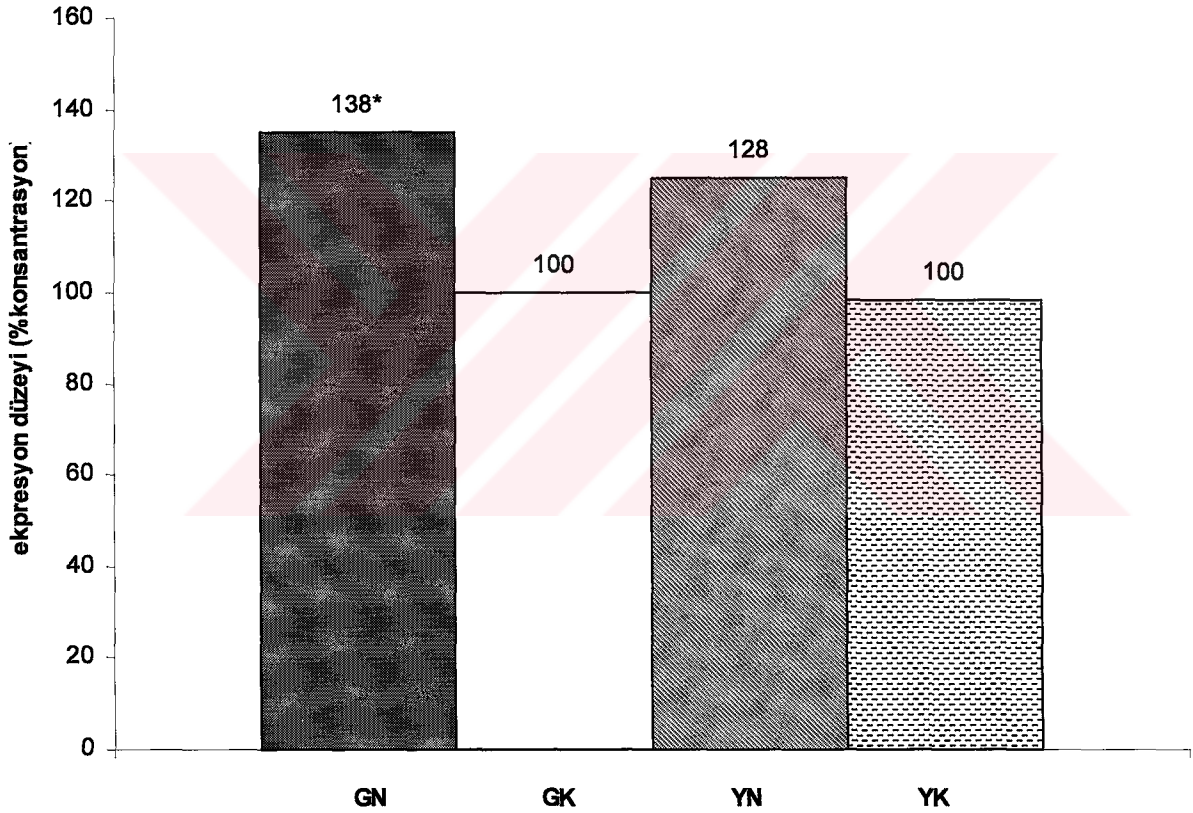
Gruplar	NR2A (optik dansite)	NR2B (optik dansite)	$\alpha 7$ (optik dansite)	MDA (nmol/ mg protein)	NO (μ mol/mg protein)
GN (n=6)	134,86 \pm 2,1	219,35 \pm 16,14	113,86 \pm 11,73	0.0914 \pm 0.016	0.68565 \pm 0.02
GK (n=8)	100	100	100	0.0875 \pm 0.007	0.71080 \pm 0.048
YN (n=8)	109,33 \pm 10,65	122,39 \pm 25,52	97,90 \pm 5,3	0.0942 \pm 0.036	0.72211 \pm 0.038
YK (n=9)	98,39 \pm 3,8	73,57 \pm 16,56	88,05 \pm 1,08	0.0848 \pm 0.016	0.70467 \pm 0.02

GN: Genç nikotin, GK: Genç kontrol, YN: Yaşlı nikotin, YK: Yaşlı kontrol

NR2A

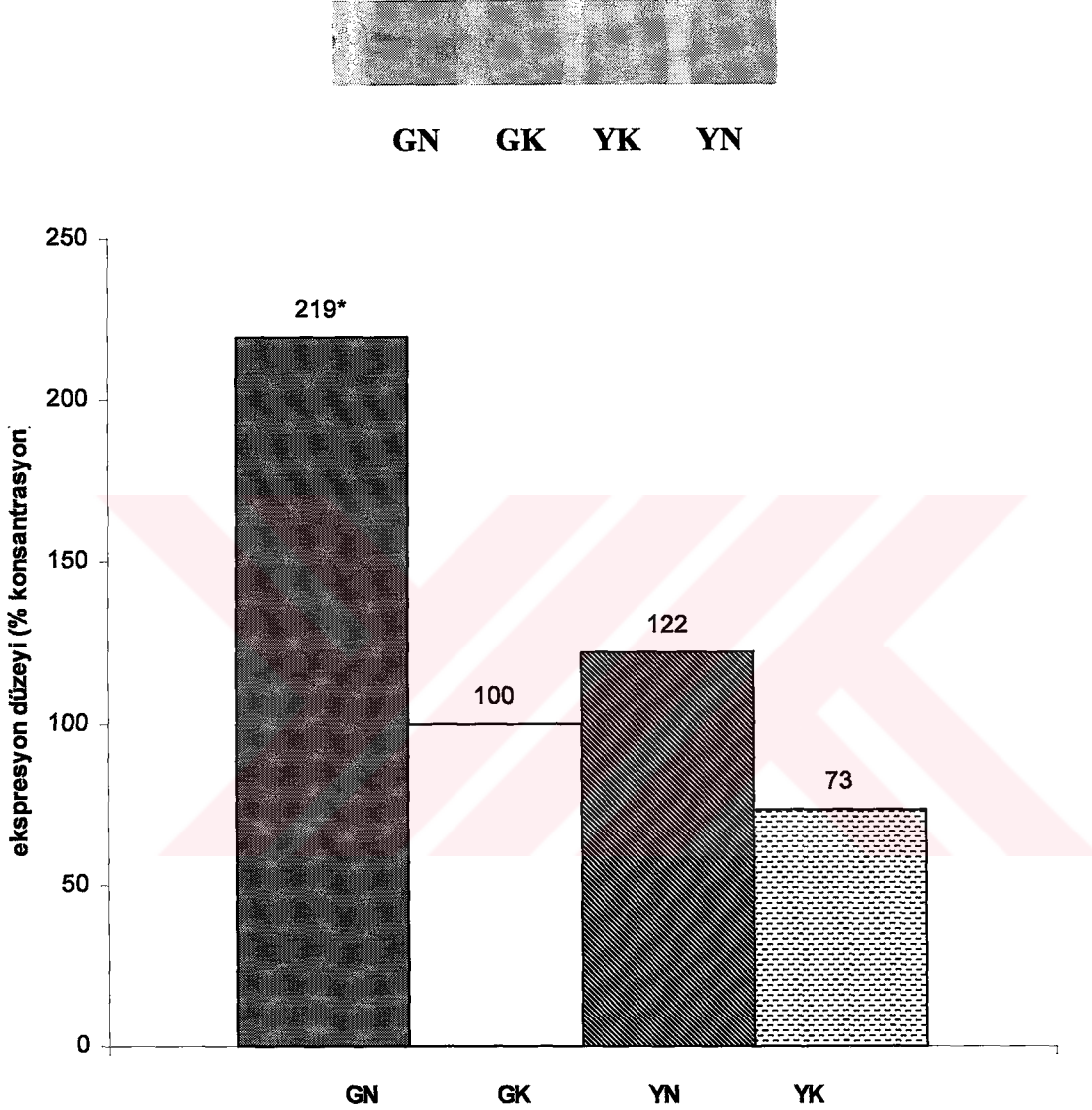


GN GK YK YN



Şekil 1: NR2A'ya ait Western Blot örneği. Sonuçlar GK grubu 100 kabul edilerek kontrole göre ekspresyon düzeyi oranları şeklinde verilmiştir. GK grubuna göre GN grubunda % 38'lik bir artış bulundu ($p < 0.05$). YK'ya göre YN grubunda % 28'lik bir artış bulundu ($p > 0.05$). Sonuçlar ANOVA ve arkasından yapılan Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. (*): $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi. GN: Genç nikotin, GK: Genç kontrol, YN: Yaşlı nikotin, YK: Yaşlı kontrol

NR2B

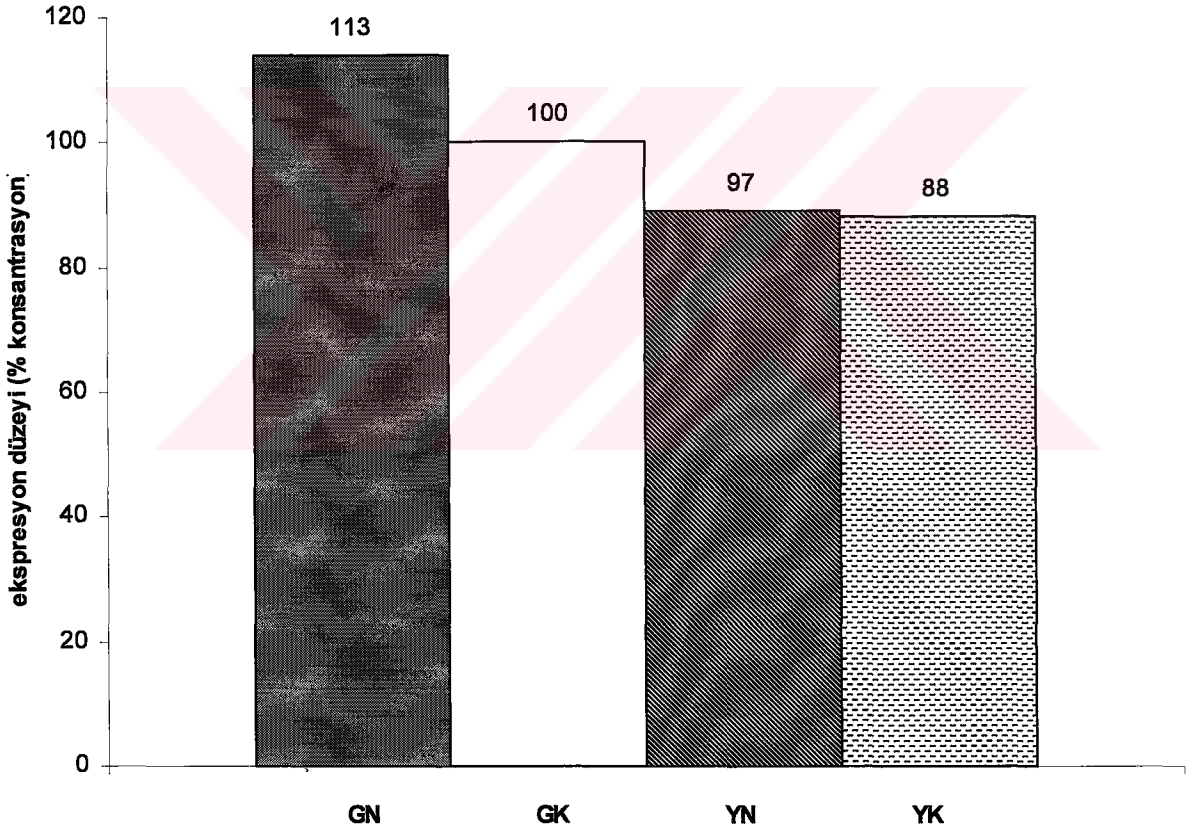


Şekil 2: NR2B'ye ait Western Blot örneği. Sonuçlar GK grubu 100 kabul edilerek kontrole göre ekspresyon düzeyi oranları şeklinde verilmiştir. GK'ya göre GN grubunda % 119'luk bir artış bulundu ($p < 0.05$). YK'ya göre YN grubunda %22'lik bir artış bulundu ($p > 0.05$). Sonuçlar ANOVA ve arkasından yapılan Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. (*): $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi. GN: Genç nikotin, GK: Genç kontrol, YN: Yaşlı nikotin, YK: Yaşlı kontrol

$\alpha 7$



GN GK YK YN



Şekil 3: $\alpha 7$ nAChR'ye ait Western Blot örneği. Sonuçlar GK grubu 100 kabul edilerek kontrole göre ekspresyon düzeyi oranları şeklinde verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Sonuçlar ANOVA ve arkasından yapılan Bonferoni düzeltilmiş Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. (*): $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi. GN: Genç nikotin, GK: Genç kontrol, YN: Yaşlı nikotin, YK: Yaşlı kontrol

5.TARTIŞMA

Nikotinin öğrenme, hafıza, uyanıklık, dikkat, bilginin hızlı işlenmesi, kısa süreli ve uzun süreli hafıza ile ilgili pozitif etkileri gerek deneysel çalışmalarla gerekse klinik çalışmalarla ortaya konmuştur (8). Deneysel çalışmalarda ışınsal kollu labirent, su labirenti gibi kısa süreli hafızayı ve mekansal hafızayı ortaya koyan düzenekler kullanılmıştır. İnsan deneyleri nikotin yamaları veya nikotin sakızları kullanılarak yapılmıştır (3).

Nikotin, AH, PH, Şizofreni, Dikkat Bozukluğu ve Hiperaktivite Sendromu gibi nörodejeneratif hastalıklarda dikkati, hafızayı geliştirerek kognitif fonksiyonu ve lokomotor aktiviteyi düzelterek iyileşme sağlamaktadır. Bunu sağladığı nöroprotektif etki ve nAChR'lerinde up-regülasyonla yaptığını destekleyen çalışmalar vardır (1,6).

Post mortem beyin dokularında sigara kullanmayan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sigara kullananların beyinlerinde yüksek affiniteli [³H]-nikotin bağlanma bölgelerinin arttığı bulunmuştur (51-54). Rodentlerin beyinlerinde kronik nikotin tedavisinin yüksek affiniteli nikotin bağlanma bölgelerini arttırdığı saptanmıştır (55-57). Uzun süre nikotine maruziyet sonrası nAChR'lerinin artışı reseptör sentezinin farklı basamaklarındaki (transkripsiyon, translasyon ve post-translasyonel modifikasyon) değişikliklerin sonucu olabilir veya reseptör alt tiplerinin düzenlenişi ve membran insersiyonlarından kaynaklanabilir (58).

Levin ve arkadaşlarının 8 ışınsal kollu labirentte yürüttüğü deneysel çalışmaların sonucunda selektif $\alpha 7$ agonistler genç ve yaşlı ratlarda kısa süreli hafızayı anlamlı bir şekilde geliştirebildiği saptanmıştır. Diğer bir selektif $\alpha 7$ agonisti olan ARR 17779'un sistemi k uygulaması ışınsal kollu labirentte kısa süreli hafızayı anlamlı şekilde arttırmıştır. Fimbria-fornix kesisi ile oluşan lezyonların neden olduğu hafıza bozuklukları ARR 17779'un sistemik uygulaması ile geri döndürülmüştür (4).

Martin-Ruiz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farklı nAChR'lerinin Western Blot yöntemi uygulanarak protein düzeyleri araştırılmış. Sigara kullananların temporal korteklerinde $\alpha 4$ düzeyinde artış olduğu fakat $\alpha 3$ ve $\alpha 7$ subünitlerinin protein düzeylerinde değişiklik olmadığı rapor edilmiştir (58). Mousavi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sigara kullananların beyin dokularında nAChR'lerinin subünitlerinde protein ve mRNA düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmış. Sigara kullanan kontrol grubunda hipokampusta değil ama temporal kortekste $\alpha 7$ ve $\alpha 4$ protein düzeylerinde artış saptanmış. Hipokampüste hiçbir değişiklik saptanmamış olmasına rağmen bu bulgular daha önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuş. Western blot analizini takiben aynı numunelerde reverse transkriptaz-polimeraz

zincir reaksiyonuyla (RT-PCR) ile mRNA düzeylerine bakılmış ve sigara kullanan ve sigara kullanmayanlar arasında $\alpha 4$ ve $\alpha 7$ nAChR subünitlerinin mRNA düzeyleri arasında farklılık olmadığını bulmuşlar. Dolayısıyla sigara kullananlarda temporal kortexte artan $\alpha 4$ ve $\alpha 7$ nAChR subünitlerinin protein düzeylerine artmış mRNA düzeylerinin eşlik etmediği gösterilmiştir. Nikotin uygulaması ile [^3H]-nikotin bağlanma bölgelerinin ve [^{125}I] α -BTX bağlanma bölgelerinin arttığı rapor edilmiş olsa da bu çalışmada elde edilen bulgular rodent beyinleri ve hücre serilerinde daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak mRNA düzeylerinde herhangi bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (58).

Aynı çalışmada ek olarak sigara kullanan ve kullanmayan Alzheimer hastalarında protein ve mRNA düzeyleri araştırılmış. Hipokampus ve temporal kortexte nAChR subünitlerinden $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ ve hipokampüste $\alpha 7$ subünitinin protein düzeylerinin anlamlı olarak azaldığını gözlemlemişler. Ancak bu düşüş ilgili mRNA düzeylerinde gözlemlenmemiştir.

nAChR subünit protein düzeylerinin sigara kullananların beyinlerinde yükselmiş bulunması ve Alzheimer hastalarında düşük bulunması ve bunlara mRNA düzeylerinde herhangi bir değişikliğin eşlik etmemesi nikotin tarafından nAChR'lerinin up-regülasyonunun post-translasyonel mekanizmalarla gerçekleştiğine işaret etmektedir (58).

Bu tez çalışmasında kronik nikotin tedavisinin nikotinik sistemi temsilen $\alpha 7$ reseptör subüniti ile beraber olası nikotinik-glutamat reseptör sistemlerinin etkileşimini gözlemek üzere NMDAR subtipi NR2A ve NR2B reseptörlerinin protein düzeylerini western blot analiz yöntemiyle inceledik. Ciltaltı enjeksiyon ile subkronik nikotin uyguladığımız ve kontrol amaçlı serum fizyolojik enjeksiyonu yaptığımız ratların hipokampuslarında western blot analizi ile $\alpha 7$ subünitinin protein düzeylerini karşılaştırdık. Gruplar arası anlamlı bir fark bulamadık. Bu veriler daha önce yapılan iki çalışmayla uyumludur. Bulgular, nAChR'lerinin regülasyonunda bölgesel farklılıklar olduğunu ki bunun da diğer nörotransmitter sistemleriyle etkileşime bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Diğer bir muhtemel sebep nikotin dozu ve süresi olabilir.

AH, nAChR'lerinde kayıp ve hipokampüse giden kolinerjik inputlarda dejenerasyon ile seyreden progresif bir hastalıktır (1,8). Her ne kadar AH'nin patogenezi halen tam olarak bilinmemekteyse de senil plakların majör komponenti olan A β , AH'deki en önemli patolojik değişikliklerden biri olduğu ve hastalığın gelişiminde çok önemli bir rol oynadığına işaret edilmiştir (1).

AH insidansı ile sigara kullanımı arasındaki negatif korelasyon birçok epidemiyolojik araştırmacı tarafından bulunmuştur (5,6). Nikotin ve nikotinik reseptör agonistleriyle tedavi yaklaşımı ile Alzheimer hastalarında dikkat ve uyanıklığın arttığı saptanmıştır (3).

Nikotin çeşitli nörotransmitterlerin salınımını stimüle eder. Hafıza üzerine nikotinik etkilerin önemli yönü nikotin ile indüklenen nörotransmitter salınımının sekonder etkileriyle yönlendiriliyor olabilmesidir (7). Nikotin hücreye Ca^{+2} akımını arttırabilmektedir bu yolla veya NOS içeren diğer internöronlara etkiyerek NOS stimülasyonunu sağlar. Nöronal NOS'un inhibisyonu nikotinin tüm beyin bölgelerinde etkilerinin engellenmesine neden olur. Bu da nikotinin nöronal NOS yoluyla NO sentezini arttırdığını desteklemektedir.

MK-801 ile NMDAR'lerinin blokajı sonucu korteks ve hipokampüsten nikotin ile uyarılan NO salınımı inhibe olmuştur. Bu bulgular nikotinin glutamaterjik reseptör sistemiyle olası etkileşimini desteklemektedir. Smith ve arkadaşları doku kültürlerinde lokal nikotin uygulamasını takiben NO salınımını göstermişlerdir. Fedele ve arkadaşları sistemik nikotin uygulaması ile rat hipokampüsünde cGMP düzeylerinin yükselişini saptamışlardır. Bu cevabın lokal NOS inhibisyonuyla bozulduğunu ve MK-801'e sensitif olduğunu göstermişlerdir (10).

nAChR'lerinin $\alpha 7$ subtipi sinaptik terminallerde veya hemen yanında lokalize olduğu ve rat hipokampüsünde glutamaterjik transmisyonu modüle ettiği düşünülmektedir (10). Bu da nAChR'lerinin özellikle $\alpha 7$ subtipinin Ca^{+2} sinyalizasyonundaki önemini gösterir. Hipokampal hücre kültürlerinde nAChR'lerinin stimülasyonu extrasellüler Ca^{+2} varlığında glutamaterjik transmisyonu arttırmıştır (10,40).

Pogun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada akut ve kronik nikotin uygulanan ratların çeşitli beyin bölgelerinde stabil NO metabolitlerinin arttığı gösterilmiştir. Bu sonuç nikotinin nöronal NOS'u stimüle ettiğini desteklemektedir. NOS stimülasyonunun nAChR'lerine Ca^{+2} akımı ile veya nikotinin diğer nörotransmitter ve/veya sinyal iletim sistemleriyle etkileşimi üzerinden olabilir.

Rat kortikal nöron kültürlerinde glutamat veya NMDA'ya maruziyetin hücre yaşamını kısalttığına ait çalışmalar var ve NO nörotoksisitesinde aracı olarak tanımlanmaktadır (10). Shimohama ve arkadaşları hücre kültürünün glutamata maruziyet öncesi nikotin ile ön inkübasyonunun glutamat sitotoksisitesini azalttığını saptamışlar. Bazı araştırmacılar, nikotinin gözlemlenen nöroprotektif etkisini NO oluşumu üzerine olası inhibitör etkisine bağlanmaktadır. Benzer şekilde nikotinin kortikal nöron kültürlerinde $\alpha 7$ nöronal reseptörü yoluyla Ca^{+2} tarafından tetiklenen NO oluşumunu azaltarak glutamat ile indüklenen sitotoksisiteden koruduğu rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda NO üzerine yorumlar gelişmektedir. Bizim çalışmamızda subkronik nikotin uygulanan ratlarla kontrol grubu arasında NO düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptamadık.

Nikotinin nAChR'leri üzerinden veya glutamat salınımını arttırarak NMDAR'leri üzerinden Ca^{+2} akımını arttırarak NOS aktivasyonu NO oluşumu indirek veya direk yollarla arttırdığı gösterilmiştir. Ancak bu çalışmadaki bulgularımız nikotinin NO üzerindeki etkilerini desteklememektedir.

NMDAR sisteminin hafıza fonksiyonu üzerinde önemli fonksiyonları olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. NMDAR antagonisti dizosilpin (MK-801) hipokampektomi ile benzer şekilde hafıza bozuklukları yapmıştır (7).

Glutamat reseptör sistemi ve nikotinik sistem arasında direk etkileşim vardır. Nikotin glutamat salınımını stimüle etmektedir. Nikotinin glutamat salınımını güçlü bir şekilde stimüle ettiği gösterilmiştir ve çok çeşitli farmakolojik etkileri de bu mekanizmayla yönlendiriliyor olabilir. Glutamat reseptör sistemleri özellikle de NMDAR subtipinin hafıza fonksiyonu üzerinde çok önemli olduğu gösterilmiştir. Özellikle kognitif fonksiyonla ilgili olarak , hipokampüste nikotin ile indüklenen glutamat salınımı çok önemlidir (7).

Greenamyre ve arkadaşları (1987), Alzheimer hastalarının post mortem hipokampus dokularında NMDAR bağlanmasında anlamlı bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir (59). Başka bir çalışmada AH ile spesifik NMDAR subünitlerinin ekspresyonunda ve kodlamasındaki azalma durumu arasında bir ilişki olduğuna işaret edilmiştir (60). Normal kontrollere göre Alzheimer hastalarının beyinlerinde NR2 mRNA ekspresyonunda azalma rapor edilmiştir. NR1 mRNA ekspresyonuyla ilgili herhangi bir değişiklik rapor edilmemiştir. Bu da AH ile ilişkili NMDAR değişikliklerinin NR2 subünitine spesifik olduğunu desteklemektedir. Ancak Hynd ve arkadaşları (2001) sonuçları yorumu komplike hale getirmiştir. Çünkü Hynd ve arkadaşları iki farklı NMDAR1 mRNA izoformunun kodlamasında anlamlı bir düşüş saptamışlardır. Sze ve arkadaşları da NR2 reseptör subünitlerinde olduğu gibi NR1 subünitlerinde de değişiklik saptamışlar.

NMDAR ekspresyonuyla AH arasındaki çelişkili ilişki deneysel metodun farklılığı veya patolojinin progresyonundaki heterojeniteden kaynaklanıyor olabileceği ileri sürülmüştür (61).

Biz de subkronik nikotin enjeksiyonu sonrasında kontrol ve nikotin grubundaki rat hipokampuslerinde NR2A ve NR2B reseptörler konsantrasyonlarını ölçtük. NR2A reseptöründe genç nikotin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış saptadık. Yaşlı nikotin grubunda kontrol grubuna göre %28'lik bir artış olmuş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmamıştır. NR2B reseptöründe genç nikotin grubu, genç kontrol grubuna göre ve yaşlı nikotin grubuna göre anlamlı bir artış saptadık. Yaşlı nikotin grubunda yaşlı kontrol grubuna göre %22'lik artış olmuş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir artış

olmamıştır. Bunun nedeni yaşla beraber nAChR'leri ve NMDAR'lerinin sayısının azalması ve bu nedenle nikotine cevabın az olması olabilir. Nörodejeneratif hastalıkların yaş grubu ve yaşlı nikotin grubundaki verimiz göz önüne alınacak olursa, nikotin ve glutamaterjik sistem etkileşimini daha net ortaya koymak için nikotin uygulama süresi ve nikotin dozu üzerinde tekrar durup bu faktörleri değiştirerek daha kapsamlı bir çalışma yapmak gereklidir.

Bu veriler nikotinin presinaptik nAChR'leri aracılığıyla glutamat salınımını arttırdığını ve NMDAR subtipi NR2A ve NR2B'de up-regülasyon ile sonuçlanan bir kaskadı başlattığını desteklemektedir. Glutamat-NMDA reseptör sisteminin öğrenme ve bellek üzerindeki bilinen pozitif etkileri de göz önüne alınacak olursa nikotin-nikotinik sistem ve glutamaterjik sistem etkileşimi, nikotinin hafıza gelişimi üzerine etkilerinde aracı mekanizma olabilir.

Nikotinin kognitif performans ve öğrenme süreci üzerine yararlı etkilerinin birçok hayvan ve insan deneyi ile ortaya konmuştur. Linert ve arkadaşları doğal ve sentetik antioksidanlarla yaptıkları deneysel çalışmada yaşlı ratlarda antioksidanların kognitif performansı arttırdığını saptamışlar. Buradan yola çıkarak nikotinin kognitif performansı artırıcı etkisinin antioksidan mekanizmalar üzerinden olabileceğini düşünmüşlerdir. Ancak yürüttükleri deneysel çalışma sonucunda yetişkin ratlarda hafıza performansında gelişme sağlarken aynı ratların beyin dokularında ROS veya TBARS oluşumunda bir azalma olmamıştır. Kognitif performansta gelişme gösteren hayvanların, kognitif fonksiyon açısından önemli beyin bölgelerinde (neokorteks, hipokampus, ve neostriatum) nikotinin lipid peroksidasyonu ve ROS üretimini etkilemediği gözlenmiştir. Linert ve arkadaşları benzer şekilde bir yaklaşımla in vitro bir deney yapmışlardır. Çeşitli konsantrasyonda nikotinin neokortikal homojenatlara uygulanmasıyla TBAR oluşumunda bir supresyon olmadığını saptamışlar. Bu çalışmalar beyin dokusunda nikotinin hiçbir antioksidan etkisinin olmadığına dair kanıtlar sunmuştur (1).

Başka bir çalışmada nikotinin MSS ile birlikte akciğer ve karaciğer dokularında oksidatif stres üzerine etkisine bakılmış. 1.6 mg/kg dozda 10 gün boyunca kronik nikotin uygulanmış rat beyin, akciğer ve karaciğer homojenatlarında çalışılmış. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TBARS düzeylerinin tüm dokularda artmış olduğu saptanmıştır. Bu çalışma nikotinin beyinde oksidatif stres ürünleri üretebileceğini desteklemektedir (2).

Başka bir çalışmada nikotinin lökositler üzerinde antioksidan aktivitesi olduğuna dair kanıtlar vardır.

Biz 0,45 mg/kg 18 gün nikotin enjeksiyonu yapılan ve kontrol amaçlı serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan ratların hipokampuslarında oksidatif stresi değerlendirmek üzere MDA

baktık. Gruplar arasında hiçbir fark saptamadık. Bulgularımız nikotinin hipokampus düzeyinde herhangi bir oksidan ya da antioksidan etkisi olmadığına işaret ediyor.

Nikotinin antioksidan aktivitesi dokuya ve doza spesifik olabilir.

Sonuçta şunu belirtmek gerekir ki nikotinin kognitif performans üzerine yararlı ve koruyucu etkilerini anti-oksidan mekanizmalar dışında daha çok nikotinin presinaptik ve postsinaptik nikotinic ACh reseptörlerden non-kolinerjik (glutamat, dopamin, adrenalin, noradrenalin ve serotonin) nörotransmitterlerin salınımını sağlayarak tetiklediği kaskadlar yoluyla sağlayabileceği düşünülmüştür.

Nikotinin hipokampus $\alpha 7$ nAChR konsantrasyonlarında belirgin bir değişikliğe yol açmamış, ancak NR2A ve NR2B konsantrasyonlarını özellikle genç nikotin grubunda arttırmıştır. NMDAR'lerinin kognitif fonksiyonlarda önemli roller oynadıkları bilinmektedir. Nikotin her ne kadar $\alpha 7$ nAChR konsantrasyonunu etkilemese de $\alpha 7$ nAChR aktivasyonu ile etkilerini göstererek NMDAR'leri üzerinden etkili olmuş olabilir. Bu çalışma nikotinin NMDAR tipleri olan NR subünit konsantrasyonlarını etkilediğini ve nikotinin kognitif fonksiyonlara olan etkisine NR değişikliklerinin aracılık edebileceğini düşündürmüştür. NR'ler ile AChR'leri arasındaki etkileşimin nasıl olduğu ise aydınlatılmaya muhtaç görünmektedir. Aynı zamanda MDA düzeylerinde artış olmaması oksidatif bir hasarı tetiklemediğinin de bir göstergesidir. Bu sonuçlara göre nikotin doz ve süre ayarlaması iyi yapıldığında kognitif fonksiyonları düzenlemede iyi bir aday olabilecektir.

ÖZET

Nikotin piridin ve piroolidin halkasından oluşan ve tobacco bitkisinin yapraklarından izole edilen alkaloid bir bileşiktir. Sigara dumanının önemli bir bileşenidir. Endojen nörotransmitter ACh gibi davranır ve beyinde birden çok reseptör subtipiyle etkileşime girer. Nikotinik Sistem kognitif fonksiyonun nöral temelinde hayati rol oynar. Nikotin bazı terapötik yaklaşımların, AH, Şizofreni, Dikkat Bozukluğu ve Hiperaktivite Hastalığı gibi çeşitli kognitif hastalıkların tedavisinde yararlı olabilir. AH insidansı ile sigara kullanımı arasındaki negatif korelasyon birçok epidemiyolojik araştırmacı tarafından bulunmuştur

Bu tez çalışmasında genç ve yaşlı ratlara kronik nikotin enjeksiyonuyla NMDAR subtipleri NR2A ve NR2B reseptörleri ve nAChR $\alpha 7$ tipinin konsantrasyonlarının nasıl değiştiğini, bununla beraber MDA ve NO düzeylerini de saptayarak oksidan aktiviteyi değerlendirmeyi amaçladık.

Bu amaçla genç nikotin, genç kontrol, yaşlı nikotin, yaşlı kontrol olmak üzere 4 grup oluşturduk. Her grup 10 erkek sprague dawley rattan oluşuyordu. Ratlar 18 gün boyunca (-)-nicotine hidrojen tartarat tuzu (0.45 mg /kg), and serum fizyolojik ile ciltaltı enjeksiyon yapıldı.

Western blot analizi ile NR2A, NR2B ve nAChR $\alpha 7$ reseptör ekspresyonları çalışıldı. Genç nikotin grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında NR2A ve NR2B reseptör düzeylerinin anlamlı olarak arttığını saptadık. Yaşlı nikotin grubu kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermedi. $\alpha 7$ reseptör düzeyinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. MDA ve NO düzeyleri açısından da gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

Sonuçta yeterli sayıda ve sağlam nAChR'ü olan genç grupta nAChR'lerinde anlamlı bir artış saptandı. Nikotinin etkili olduğunu ve kognitif performansta sağladığı gelişmeyi glutamat salınımını artırarak glutamat- NMDAR sistemi ile etkileşim yoluyla sağladığını destekleyen veriler elde ettik. Bunun yanında, nikotin, kognitif performans gelişimindeki rolünün antioksidan mekanizmalarla olmadığını veya hipokampus düzeyinde lipid peroksidasyonunu etkilemediğini gözlemledik.

Anahtar kelimeler: Nikotin, nAChR, NMDAR, hipokampus, kısa süreli hafıza, LTP

SUMMARY

Nicotine is an alkaloid composed of pyridine and a pyrrolidine ring found in the plant kingdom and an important component of cigarette smoke. Nicotine acts like endogenous neurotransmitter ACh and interacts with a variety of receptor subtypes. Nicotinic system plays a pivotal role in the neural basis of cognitive function. Nicotine based therapeutic approach would be useful for the treatment of a variety of cognitive impairments including Alzheimer's disease, schizophrenia, attention deficit hyperactivity disorder. In addition, a negative correlation between smoking and incidence of Alzheimer's disease has been suggested by many epidemiological researchers.

In this study we administered chronic nicotine to find out the alterations of NR2A and NR2B; the subtypes of NMDARs and the alterations of nAChR $\alpha 7$ receptor. In addition our purpose was to evaluate the oxidative activity by determining MDA and NO. For this purpose we arranged 4 groups as; young nicotine, aged nicotine, young control and aged control. Each group include 10 male sprague dawley rats. Rats were injected s.c. with (-)-nicotine hydrogen tartrate salt (0.5 mg free base/kg b.w.), and with saline for 18 days.

NR2A, NR2B and nAChR receptor expressions were studied by employing Western blotting. Expression of NR2A and NR2B in young nicotine group was significantly increased when they were compared with the young control group. In the aged nicotine group, compared with the aged control group, there is no significant increase. There was no significant difference between groups about the expression of $\alpha 7$ receptors. In addition there was no significant difference between groups about MDA and NO values.

In conclusion, in the young nicotine group the number and function of nAChRs have to be intact and significantly increased levels were determined here. We find out the effectivity of nicotine and our data supports that nicotine stimulates the release of glutamate and improves the cognitive performance through the interactions with glutamate-NMDA system. Besides, the role of nicotine in the cognitive improvement wasn't supported by the antioxidative mechanisms or we observed no effect of nicotine on lipid peroxidation at the hippocampus.

Key words: Nicotine, nAChR, NMDAR, hippocampi, working memory, LTP

KAYNAKLAR

1. Zhi-Zhong G., Wen-Feng Y., Agneta N. Dual effects of nicotine on oxidative stress and neuroprotection in PC12 cells. *Neurochemistry International* 43:243-249,2003
2. Newman MB, Arendash GW, Shytle RD, Brickford PC, Tighe T, Sanberg PS. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sciences* 71,2002
3. Rezvani AH, Levin ED. Cognitive Effects of Nicotine. *Biol Psychiatry* 49: 258-267,2001
4. Bettany J., Levin ED. Ventral hippocampal $\alpha 7$ nicotinic receptor blockade and chronic nicotine effects on memory performance in the radial arm maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 70:467-474,2001
5. Levin ED. Nicotinic Receptor Subtypes and Cognitive Function. *J Neurobiol.* 53:633-40, 2002
6. Nahamura S, Tahahashi T, Yamashita H, Kawakami, H. Nicotinic Acetylcholine Receptors and Neurodegenerative disease. *Alcohol* 24:79-86,2001
7. Levin ED., Jedge D., Baruah A., Addy N. A. Ventral Hippocampal NMDA blockade and nicotinic effects on memory function. *Brain Research Bulletin* 61:489-495,2003
8. Gray R., Rajan AS., Radcliffe KA., Yakehiro M., Dani JA. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine, *Nature* 383,713-716,1996
9. Fedele E., Varniev G., Ansaldo M.A., Raiteri M., Nicotine administration stimulates the *in vivo* N-methyl-D-aspartate receptor/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat hippocampus through glutamate release. *British Journal of Pharmacology* 125:1042-1048,1998
10. Pogun S., Demirgoren S., Taskiran D., Kanit L., Yilmaz O., Koylu EO., Balkan B., London ED. Nicotine modulates nitric oxide in rat brain. *European neuro psychopharmacology* 10:463-472,2000
11. Pryor WA. Free Radical Biology: Xenobiotics, cancer and aging. *Annals New York Academy of Sciences*: 1-22,1982
12. Cross CE., Halliwell B., Borish E., Pryor W., Ames B.N., Saul R., McCord JM., Harman DJ. Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine* 107:526-545,1987
13. Linert W., Bridge MH., Huber M., Bjugstad KB., Grossman S., Arendash GW. *In vitro* and *in vivo* studies investigating possible antioxidant actions of nicotine: relevance to Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1454:143-152,1999
14. Candace Hsieh Mezzasalma. The Role of Nicotinic Acetylcholine Receptors in NMDA Receptor Development in Rat Auditory Cortex. 2003
15. Dani, JA, Heinemann S. Molecular and Cellular Aspects of Nicotine Abuse. *Neuron* 16:905 1996
16. Henningfield JE., Koene ZM. and Clarke PBS. Pharmacological aspects of drug dependence chapter 8 (Charles, R., Schuster and Michael J. Kuhareds), Springer Verlag Berlin Heidelberg. 271, 1996

17. Pomerleau OF., Rosecrans JI. Neuroregulatory effects of nicotine, *Psychoneuroendocrinology*. 92:135,1989
18. Barras BC., Blackburn JW., Brimlrombe RW., Rich P. Modifications of nicotine toxicity by pretreatment with different drugs. *Biochem. Pharmacol.* 18:2145,1989
19. Jennifer A., Court and Ekine K., Perry. CNS Nicotine receptors. *Pharmacol Pathophysiol* 2: 216,1994
20. Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji*, 9. baskı 2000. Bölüm 6; Santral sinir sisteminin farmakolojisinin temelleri, bölüm 7 Kolinerjik Sistem.
21. *Principles of Medicinal Chemistry* by Foye WO., Lemke TL. and Williams DA., Williams and Wilkins. 4th ed., 1995
22. Siegel GJ. *Basic Neurochemistry* 6th ed.,1999. Chapter 11 (213-242), chapter 15 (315-334).
23. Neuronal nicotinic receptors, *Tocris Reviews* No:19, October 2001
24. *The RBI Handbook of Receptor Classification and signal Transduction*, K.J. Watling. RBI. 3rd ed., 1998
25. Susan Wonnacott. Presynaptic nicotinic Ach Receptors, *Trends Neurosci.* 20:92-8,1997
26. Levin ED. Nicotinic systems and cognitive function. *Psychopharmacol* 108:417,1997
27. Summers KL., Glacabini E. Effects of local and repeated systemic administration of (-) nicotine of extracellular levels of acetylcholine, norepinephrine, dopamin and serotonin in rat cortex. *Neurochem. Res.* 20:753,1995
28. Barret JE: Interrelationships between behaviour and pharmacology as factors determining the effects of nicotine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 19:1027,1993
29. Collins AC., Marks MJ. Chronic nicotine exposure and brain nicotinic receptors influence of genetic factors. *Prog. in Brain Res.* 79:137,1989
30. Ozawa S., Haruyuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology.* 54: 581-618,1987.
31. Candy S., Brickley SG. NMDA receptors. *Encyclopedia of Life Sciences/2001*
32. Goebel DJ., Pooch MS. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Molecular Brain Research* 69:164-170,1999
33. Cull-Candy S., Brickley SG. NMDA receptors. *Encyclopedia of Life Sciences/2001*
34. Carroll RC., Zukin RS. NMDA-receptor trafficking and targeting: Implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in Neuroscience* 25:571-577,2002
35. Petrie RXA., Reid IC., Stewart CA. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity and depressive disorder. *Pharmacology and therapeutics* 87:11-25,2000
36. Wittenberg GM., Tsien JZ. An emerging molecular and cellular framework for memory processing by the hippocampus. *Trends in Neurosciences* 25:571-77,2002

37. Yakamura T., Shimoji K. Subunit and site specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Progress in Neurobiology* 59:279-298,1999
38. Simonian NA., Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 36,83-106,1996
39. Reiter RJ.: Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Progress in Neurobiology* 56:359-384,1998
40. Contestabile A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Research Reviews* 32:476-509,2000
41. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* 215:213-219, 1993
42. Sies H., Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition* 62:13155-13215,1995
43. Bourg, EL. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster* *FEBS Letters* 498:183-186,2001
44. Atlante A., Calssano P., Bobba A., Giannattasio S., Marra E., Passarella S. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Letters* 497:1-5,2001
45. Touitou Y. Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Experimental Gerontology* 36: 1083-1100,2001
46. Floyd RA. Role of oxygen radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB Journal* 4: 2587-2597,1990
47. Zhang X., Gong ZH., Nordberg A. Effects of chronic treatment with (+)- and (-)-nicotine on nicotinic acetylcholine receptors and N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain. *Brain Research* 644:32-39,1994
48. Drapper HH., Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186:421-431,1990
49. Cortas NK., Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin. Chem.* 36:1440-1443,1990
50. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* 227:680-689,1970.
51. Benwell ME., Balfour DJ., Anderson JM. Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)-[³H]nicotine binding sites in human brain. *J. Neurochemistry* 50:1243-1247, 1988
52. Breese CR., Marks MJ., Logel J., Adams CE., Sullivan EB., Collins AC., Leonard S. Effects of smoking history on [³H]nicotine binding in human post mortem brain. *J Pharmacol Exp Ther* 282:7-13,1997
53. Court J., Martin-Ruiz C., Piggot M., Spurden D., Griffiths M, Perry E. Nicotinic receptor abnormalities in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 49:175-184,2001

54. Perry DC., Davilla-Garcia MI., Stockmeier CA., Kellar KJ. Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 289:1545-1552,1999
55. Flores CM., Rogers SW., Pabreza LA., Wolfe BB., Kellar KJ. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol* 41:31-37,1992
56. Rowell PP., Li M. Dose response relationship for nicotine induced up-regulation of rat brain nicotinic receptors. *J. Neurochem* 68:1982-1989,1997
57. Mousavi M., Hellstrom-Lindahl E., Guan ZZ., Bednar I., Nordberg A. Expression of nicotinic acetylcholine receptors in human and rat adrenal medulla. *Life Sci* 70:577-590,2001
58. Mousavi M., Hellström-Lindahl E., Guan ZZ., Shan KR., Ravid R., Nordberg A. Protein and mRNA Levels Of Nicotinic Receptors In Brain Of Tobacco Using Controls And Patients With Alzheimer's Disease: *Neuroscience* 122:515-525,2003
59. Greenamyre JT., Penney JB., D'Amato CJ., Young AB. Dementia of the Alzheimer's type: changes in hippocampal L-[3H] glutamate binding. *J. Neurochem.* 48: 543–551,1987
60. Bi H., Sze CI. N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messenger RNA levels are altered in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *J. Neurol Sci.*, 200:11–18,2002
61. Popke EJ. From Anticholinesterase Toxicity to Alzheimer's Disease: Important Interactions of Cholinergic and NMDA Receptor Systems. *Toxicological Sciences* 72,185-187,2003
62. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folinphenol reagents. *J Biol Chem.* 193:265-275,1951.