

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KORTİKAL YAYILAN DEPRESYONUN TETİKLEDİĞİ
TRİGEMİNAL AKTİVASYONUN MOLEKÜLER
YOLAKLARI**

Dr. Hülya KARATAŞ KURŞUN

**Temel Nörolojik Bilimler Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2011**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KORTİKAL YAYILAN DEPRESYONUN TETİKLEDİĞİ
TRİGEMİNAL AKTİVASYONUN MOLEKÜLER
YOLAKLARI**

Dr. Hülya KARATAŞ KURŞUN

**Temel Nörolojik Bilimler Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yasemin GÜRSOY-ÖZDEMİR**

ANKARA

2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼'ne,

Bu alışma j¼rim¼z tarafından Temel N¼rolojik Bilimler Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

J¼ri Bařkanı: Prof. Dr. Turgay Dalkara
Hacettepe Üniversitesi

Danıřman: Prof. Dr. Yasemin G¼rsoy-zdemir
Hacettepe niversitesi

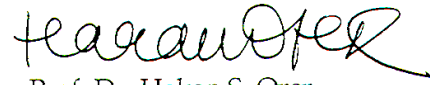
ye: Prof. Dr. R¼řt¼ Onur
Hacettepe niversitesi

ye: Prof. Dr. Alp Can
Ankara niversitesi

ye: Doç. Dr. M¼ge Yemişçi-zkan
Hacettepe Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisans¼st¼ Eęitim-ęretim ve Sınav Yönetmelięi'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun gr¼lm¼ř ve Enstit¼ Yönetim Kurulu kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstit¼ M¼d¼r¼

TEŞEKKÜR

Hentüz bir tıp fakültesi öğrencisiyken nörolojik hastalıklara farklı bakışı vurgulayan, nöroloji asistanlığı eğitimimde değerli bilgi ve deneyimleriyle iyi bir nörolog olarak yetişmeme katkıda bulunan, uzmanlık tezimin tasarlanmasında ve sonuçlanmasında yol gösteren, zihnimizdeki sınırları aşarak evrensel ve her alanda bilimsel düşünme yeteneğini aşılayan ve iyi bir bilim insanı olarak yetişmemiz için büyük çaba sarfeden çok değerli bilim adamı sayın Prof. Dr. Turgay Dalkara'ya nöroloji doktora eğitimimin ve tezimin her aşamasında kıymetli yönlendirmelerini ve katkılarını esirgemediği için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Daha uzmanlık tezimin hazırlanması sırasında beni destekleyen ve emeğini esirgemeyen, sonrasında doktora tez danışmanım olan sayın Prof. Dr. Yasemin Gürsoy-Özdemir'e bana sadece nöroloji alanında değil hayatın her alanında yapıcı ve problem çözücü kişiliğiyle örnek olduğu için, tezimin her aşamasında yol gösterdiği ve özveriyle desteği ile yanımda olduğu için en derin minnetlerimi sunarım.

Nöroloji asistanı olmamda ve nöroloji eğitimime başlamamda çok büyük etkisi olan ve beni destekleyen, daima örnek aldığım ancak aramızdan zamansız ayrılan sayın Uz. Dr. Güner Gürer Aydın'ı sevgiyle anmak isterim.

Nöroloji eğitimimde ve nöroloji doktora çalışmalarım sırasında beraber çalışma olanağı bulduğum, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım, sık sık yol göstericiliğine başvurduğum sayın Doç. Dr. Müge Yemişçi-Özkan'a teşekkürü borç bilirim.

Daima büyük bir keyif ve özveriyle çalıştığımız, sık sık bilgi ve yardımlarını istediğim, desteklerini benden hiç esirgemeyen çok değerli laboratuvar arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Emine Eren Koçak'a, Uz. Sevdâ Lüle'ye, Dr. Zümrüt Duygu Şen'e, Dr. Evren Erdener'e ve teknisyen Mesut Fırat'a, ayrıca enstitü çalışanlarımıza içtenlikle teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca sonsuz sevgileriyle beni destekleyen ve bana zorluklarla mücadele etme yeteneğini aşılayan çok sevgili anne ve babama, asistanlık ve doktora eğitimimde beni yürüttüğüm yolda yalnız bırakmayan ve tökezlediğimde elimden tutan sevgili eşim Uz. Dr. Oğuzhan Kurşun'a ve henüz çok farkında olmasalar da aslında varlıkları ve sevgileriyle çalışmalarına destek veren çok sevgili oğullarım Alp ve Mert'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın yapılabilmesine verdikleri proje destekleriyle katkıda bulunan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne (Proje no: 08-D07-101-011) ve Beyin Araştırmaları Derneği'ne teşekkür ederim.

ÖZET

Karataş-Kurşun, H. Kortikal yayılan depresyonun tetiklediği trigeminal aktivasyonun moleküler yolları. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Nörolojik Bilimler (Neuroscience) Programı Doktora Tezi, Ankara, 2011. Migren toplumda sık görülen bir hastalık olmasına rağmen migren ağrısını tetikleyen parankimal mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Kortikal yayılan depresyon (KYD) dalgası migren aurasında rol almaktadır. KYD ile nöronal membranlarda iletkenlik artışı olmaktadır. Bu çalışmada, fare beyininde KYD'nin mega kanal açılmasına neden olup olmadığı in vivo incelenmiştir. KYD ile propidyum iyodür (PI) nöronlara kısa süreli ve geri dönüşümlü mega kanal açılması sonucu girmektedir. Bu kanalların panneksin-1 (Pannx-1) kanalları olduğu, geçici açılmanın karbenoksolon (CBX) ve ¹⁰Pannx gibi Pannx-1 kanal inhibitörleri ile tam inhibe edilerek gösterilebilmiştir. Aynı zamanda nöronlardaki bu megakanalların açılmasının inflamatuvar bir sitokin olan HMGB1'in saliverilmesine neden olduğu görülmüştür. KYD sırasında nöronlardan saliverilen HMGB1'in astrositlerin sitoplazmasında bulunan NF-κB'nin nükleusa yer değiştirmesini sağladığı saptanmıştır. Glia limitansı oluşturan astrosit uzantılarında da aktive olan NF-κB, inflamatuvar mediyatörlerin subaraknoid boşluğa saliverilmesine yol açarak trigeminal sinir uçlarını uyarabilir. Trigeminovasküler aktivasyonun bir göstergesi olarak KYD sonrası artmış dural mast hücre degranülasyonu saptanmış ve CBX ile tam olarak inhibe edilmiştir. Bu çalışmadaki diğer bir bulgu ise KYD'nin subkortikal dokulara yayılmasıdır. Bu yayılım nöronlara PI girişi ve elektrofizyolojik kayıtlama ile gösterilmiştir. KYD'nin tetiklediği subkortikal mekanizmalar migrende görülen prodromal belirtilerle ilişkili olabilir. Tüm bu bulgular KYD gibi nöronları strese sokan bir durumda Pannx-1 kanallarının açılması ile inflamatuvar bir sinyalizasyon yolağının aktive olabildiğini göstermektedir. Glia limitanstan inflamatuvar araçların saliverilmesi ile uzamış trigeminovasküler aktivasyon ve sonuçta migren ağrısı başlıyor olabilir.

Anahtar kelimeler: Migren, kortikal yayılan depresyon, panneksin-1 kanalları, propidyum iyodür, HMGB1, NF-κB, trigeminovasküler sistem.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje no: 08-D07-101-011) ve Beyin Araştırmaları Derneği tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Karatas-Kursun, H. Molecular pathways of the cortical spreading depression-induced trigeminal activation. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Basic Neurological Sciences (Neuroscience), Ankara, 2011. Migraine is a common medical disorder, however, the parenchymal mechanisms initiating migraine headache is unclear. Cortical spreading depression (CSD) is thought to play a role in migraine aura. CSD was known to induce a large neuronal membrane conductance. In this in vivo study, we investigated in the mouse brain whether or not pannexin-1 (Panx-1) channels expressed on neurons opened during CSD. The mega channel opening was monitored by propidium iodide (PI) influx to neurons. CSD induced and brief opening of megachannel which was abolished by Panx-1 inhibitors, carbenoxolone (CBX) and ¹⁰Panx during CSD. The opening of neuronal mega channels induced release of HMGB1, an inflammatory cytokine. HMGB1 released from neurons during CSD lead to translocation of NF-κB from cytoplasm to nucleus in astrocytes. NF-κB translocation in the astrocytic processes forming the glia limitans may result in release of inflammatory mediators to the subarachnoid space and, hence, stimulate the trigeminal nerve endings. CBX administration suppressed CSD-induced dural mast cell degranulation, which is a manifestation of the trigeminovascular activation. Another finding of this study was the extensive spread of the CSD to subcortical areas. This was demonstrated by PI influx to subcortical neurons and electrophysiological recordings. Subcortical spread triggered by CSD may cause several prodromal manifestations of migraine. These findings altogether suggest that neuronal Panx-1 channels are opened under stress conditions like CSD and this may lead activation of inflammatory signaling pathway. As a result inflammatory mediators released from glia limitans may cause sustained trigeminovascular activation and migraine headache.

Key words: Migraine, cortical spreading depression, pannexin-1 channels, propidium iodide, HMGB1, NF-κB, trigeminovascular system.

This study was supported by Hacettepe University, Research Fund 08-D07-101-011 and Brain Research Association.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No:
ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER ve TABLOLAR.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Migren.....	4
2.1.1. Nörojenik İnflamasyon ve Mast Hücreleri.....	6
2.1.2. Migren Patogenezi ile KYD Arasındaki İlişki.....	7
2.2. Kortikal Yayılan Depresyon.....	9
2.2.1. Kortikal Yayılan Depresyonun Trigemino-vasküler Sistem Aktivasyonundaki Rolü.....	9
2.2.2. Kortikal Yayılan Depresyonun Subkortikal Dokularda Yayılımı.....	11
2.3. Panneksin Kanalları.....	12
2.3.1. Panneksin Ailesinin Üyeleri.....	13
2.3.2. Panneksin Kanallarının Fizyolojik Rolü.....	15
2.4. Propidyum İyodid.....	17
2.5. “High Mobility Group Box 1” (HMGB1)	18
2.5.1. HMGB1’in Beyindeki Rolü.....	25
2.6. Nükleer Faktör-κB.....	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	29
3.1. Hayvanlar ve Cerrahi.....	29
3.2. Propidyum İyodür Enjeksiyonu.....	30
3.3. Elektrofizyoloji Deneyleri.....	31
3.4. Farmakolojik Ajanların Uygulanması.....	32

3.5. İmmünohistokimyasal Boyamalar.....	34
3.6. Mast Hücrelerinin Boyanması ve Sayımı.....	35
3.7. Hücre Altı Bölümleme ve Western Blotlama.....	36
3.8. İstatistiksel Yöntemler.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Kortikal Yayılan Depresyon Panneksin-1 Kanallarının Açılmasını Tetikler.....	38
4.2. Kortikal Yayılan Depresyona Bağlı Propidyum İyodid İşaretlenmesinin Saptandığı Anatomik Bölgeler.....	47
4.3. Kortikal Yayılan Depresyon Nöronlardan HMGB1 Salıverilmesini Tetikler.....	50
4.4. Kortikal Yayılan Depresyon Astrositlerde NF-κB Göçüne Neden Olur.....	52
4.5. Panneksin-1 Aktivasyonunun ve HMGB1 Salınımının İnhibisyonu Trigeminoasküler Aktivasyonu Önler.....	55
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	Adenozin trifosfat
CBX	Karbenoksolon
CGRP	Kalsitonin geni ile ilişkili peptid
DNA	Deoksiribonükleik asit
FITC	Floresan izotiyosiyanat
HMGB1	“High mobility group box 1”
IFN- γ	İnterferon- γ
IL-1	İnterlökin-1
i.s.v.	İntraserebroventriküler
KCl	Potasyum klorür
kD	Kilodalton
KYD	Kortikal yayılan depresyon
MMA	Orta meningeal arter
MMP	Matriks metalloproteinaz
MRG	Magnetik rezonans görüntüleme
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NF- κ B	Nükleer faktör- κ B
NMDA	N-metil D-aspartat
NO	Nitrik oksit
PAG	Periaquaduktal gri
Panx	Panneksin
PFA	Paraformaldehit
PI	Propidyum iyodür
RAGE	“Receptor for advanced glycation end-products”
SSS	Santral sinir sistemi
TGSK	Trigeminoservikal kompleks
TGVS	Trigeminovasküler sistem
TLR	“Toll like receptor”
TNF- α	Tümör nekrozis faktör- α

ŞEKİLLER ve TABLO

Sayfa No:

Şekil 2.1.	Migren ağrısının oluşumunda rol aldığı düşünölen patofizyolojik mekanizmalar.....	8
Şekil 2.2.	Panx-1 kanallarının yapısı.....	14
Şekil 2.3.	Panx-1 kanallarının sinaptik ve sinaptik olmayan bağlantılardaki olası rolü.....	16
Şekil 2.4.	Propidyum iyodürün moleküler yapısı.....	17
Şekil 2.5.	HMGB1 yapısı.....	19
Şekil 2.6.	HMGB1'in nükleus içindeki ve dışındaki etkileri.....	21
Şekil 2.7.	Ekstrasellöler ortama HMGB1 salıverilmesi.....	23
Şekil 2.8.	NF-κB'nin etki mekanizması.....	28
Şekil 4.1.	Deney düzeneğinin şematik görünümü ve KYD dalgası örneğı.....	39
Şekil 4.2.	KYD'den 5 dk sonra ipsilateral korteks ve dentat girusta (DG) PI pozitifliğı.....	40
Şekil 4.3.	PI pozitif hücrelerin karakterizasyonu-1.....	40
Şekil 4.4.	PI pozitif hücrelerin karakterizasyonu-2.....	41
Şekil 4.5.	Kortekste PI pozitif hücre sayısı.....	42
Şekil 4.6.	Dentat girusta PI pozitif hücre sayısı.....	43
Şekil 4.7.	MK-801 ile elektrofizyolojik kayıt örneğı.....	44
Şekil 4.8.	MK-801 uygulamasının PI pozitifliğine etkisi.....	44
Şekil 4.9.	CBX ve ¹⁰ Panx'in PI pozitifliğı üzerine olan etkisi.....	46
Şekil 4.10.	Subkortikal dokularda PI pozitif hücre sayısı.....	48
Şekil 4.11.	Subkortikal dokularda görölen PI pozitifliğı ve elektrofizyolojik kayıt örnekleri.....	49
Şekil 4.12.	PI pozitif hücrelerde HMGB1 boyaması.....	51
Şekil 4.13.	HMGB1 immünopozitif hücrelerin karakterizasyonu.....	51
Şekil 4.14.	CBX uygulaması ve HMGB1 salıverilmesi.....	52
Şekil 4.15.	NF-κB'nin sitoplazmadan nükleusa yer değıştirmesi.....	53
Şekil 4.16.	CBX uygulaması ve NF-κB aktivasyonu.....	53

Şekil 4.17.	Western blotlama ile NF- κ B aktivasyonu.....	54
Şekil 4.18.	Glia limitansın işaretlenmesi.....	55
Şekil 4.19.	Dura materde mast hücrelerinin boyanması.....	56
Şekil 4.20.	Dura materdeki degranüle mast hücrelerinin sayımı.....	57
Tablo.	Memelilerde NF- κ B ailesinin üyeleri.....	27

1. GİRİŞ

Migren toplumun %13'ünde görülen, sık rastlanan bir hastalıktır (1). Tipik migren ağrısı tek taraflı ve nabız atar tarzda, 4-72 saat süren, beraberinde bulantı, kusma, fotofobi ve fonofobinin eşlik edebildiği, aktivite ile şiddeti artan bir ağrıdır (2). Migrenlilerin üçte birinde tipik ağrıdan önce geçici görsel, duyuşsal ve motor işlev bozukluğu ile karakterize aura fazı olur ve bu grup auralı migren olarak sınıflandırılır (2). Daha sık karşılaşılan aurasız migren veya basit migrende ise aura olmaksızın tipik baş ağrısı olur (2). Son yıllarda önemli çalışmalar yapılmakla birlikte migren patofizyolojisi halen tam olarak anlaşılamamıştır. Trigeminoservikal kompleksin (TGSK) aktivasyonu migren ağrısına neden olur görüşü literatürde genel olarak kabul görmektedir. Ancak migreni tetikleyen asıl mekanizmanın ne olduğu bilinmemektedir (3, 4). Şu ana kadar olan bilgiler kortikal yayılan depresyonun (KYD) görsel auraya neden olabileceğini göstermektedir. KYD ilk kez Leão tarafından tanımlanmıştır. Bu tarife göre KYD kısa süreli bir depolarizasyon dalgasını takiben serebral kortekste elektriksel aktivitenin yavaşça yayılan (2-5 mm/dk) uzamış depresyonudur (5). KYD'nin TGSK'yi aktive edebileceği ileri sürülmüş ve bu mekanizmanın baş ağrısının ortaya çıkmasından sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Ancak yapılan çalışmalarda net bir ilişki ortaya konamamıştır (6-10). KYD'nin migren aurası dışında serebral iskemi, subaraknoid kanama ve travmatik beyin hasarının patofizyolojisinde rol aldığı düşünülmektedir (11). Ancak KYD mekanizmasına yönelik bilgilerimiz başarılı bir tedavi yaklaşımı oluşturmaya yetmemektedir.

KYD sırasında hücre dışı ortamda yüksek konsantrasyonlara ulaşan potasyum, protonlar, nitrik oksit, araşidonik asit ve ATP'nin perivasküler trigeminal sinir uçlarını aktive ettiği öne sürülmektedir (8, 12). Ancak bu hücre dışı araçlar, perivasküler trigeminal sinir uçlarında sensitizasyonun oluşması için gerekli güçlü bir depolarizasyona yetecek ve saatler süren migren ağrısına neden olacak konsantrasyonlara ulaşmamaktadır. Bunun nedeni büyük ihtimalle glia limitansın bariyer etkisi ve beyin omurilik sıvısının hızlı

devinimidir (10, 13). Bunu destekleyen yakın zamanlı bir çalışmada, meningeal trigeminal nosiseptörlerin KYD dalgasından 14 dk sonra ateşlemeye başladığı gösterilmiştir (10, 13). Bu bulgular migren hastalarında gözlenen ve migren aurası ile baş ağrısının başlangıcı arasındaki 20-40 dk süren zaman aralığını açıklayabilir (12). Aura sonrası ağrının ortaya çıkmasındaki bu zamansal gecikme, inflamatuvar mediatör basamaklar aracılığıyla, meningeal nosiseptörlerin uzamış aktivasyonunu tetikleyen bazı ağrı uyarılarının iletilmesi için gerekli zaman olabilir. Ancak migren aurası olarak kabul edilen KYD'yi takiben ortaya çıkan inflamatuvar yolak henüz çalışılmamıştır.

Son yıllarda "high mobility group box 1" (HMGB1) proteininin, inme ve multipl skleroz gibi nörolojik hastalıklar da dahil olmak üzere birçok hastalıkta güçlü bir inflamatuvar mediatör olduğu gösterilmiştir (14). HMGB1 iki farklı şekilde hücreden salıverilir. Membran bütünlüğü bozulmuş olan nekrotik hücrelerden çözünür bir molekül olarak salıverilir ve inflamatuvar cevabı tetikler (15). Aktif veya kolaylaştırılmış salıverilmede ise mikrobiyal veya proinflamatuvar bir uyarının ardından HMGB1 özgül lizin rezidülerinden asetillenir ve sitoplazmaya geçer, burada sekretuar veziküllerde depolanır ardından intersitisyuma salınır (15). KYD sonrası ortaya çıkan nörojenik inflamasyonun tetiklenmesinde HMGB1'in salıverilmesinin rolü olabilir.

KYD yoğun transmembran iyon akımları ve nöron ve astrositlerin depolarizasyonu ile ortaya çıkar (11). KYD sırasında nöronal membran iletkenliği önemli oranda artar (16). Bu iletkenlik artışından sorumlu birçok iyon kanalı çalışılmış olmasına rağmen, halihazırda tanımlanmamış kanallar da olabileceğine dair deliller bulunmaktadır (11). Panneksinler (Panx) büyük-gözenekli, iletkenliği fazla olan iyon kanallarıdır (17). Bu kanallar 1 kD'dan küçük molekülleri geçirebilir (18). Bu nedenle Panx kanalları iyonlara, ikincil mesajcılara, ATP, inozitol trifosfat gibi nörotansmitterlere, amino asitlere ve bazı boyalara geçirgen olabilir. Panx-1 santral sinir sisteminde yaygın olarak ancak özellikle piramidal nöronların dendritik dikensi çıkıntılarında ifade olan bir mega kanal grubunun alt tipidir (17, 19). Panx-1 yoğun NMDA reseptör uyarımı ve depolarizasyon sonucu ve aynı zamanda iskemi ve aberan

patlamalar (bursting) gibi patolojik durumlarda aktive olur (17, 20, 21). Bu çalışmada öne sürdüğümüz hipotez; nöronların depolarize olduğu ve NMDA reseptörlerinin aşırı aktif olduğu KYD sırasında, Panx-1 kanallarının açılıp nörojenik inflamatuvar yanıtın tetiklenmesidir. Bu da nöronların metabolik yükünü artırıp sitokinler ve HMGB1 gibi stress sinyallerinin salıverilmesine neden olabilir. KYD sırasında metabolik olarak sıkıntıda olan nöronlardan bu stress sinyalleri salıverilir ve astrosit son ayaklarında (glia limitansta da dahil olmak üzere) inflamatuvar sinyalizasyon yollarını aktive edebilir. Böylece pial damarlar etrafındaki trigeminal sinir uçları uyarılır. Sonuç olarak inflamatuvar bir beyin aktivitesi ile trigeminal ağrı liflerinin aktivasyonu arasında yeni tanımlanan bir yolak olduğunu ileri sürmekteyiz. Bu yolak stres altındaki nöronlarda bulunan Panx-1 megakanallarının açılması ile başlayıp inflamatuvar yolların aktivasyonu ve bu sinyalin pial damarların etrafındaki trigeminal sinir uçlarına iletilmesini kapsamaktadır.

Bu çalışmada fare beyinde kortikal yayılan depresyon sonucunda oluşan nörojenik inflamasyon ve buna aracılık eden moleküler yolların astrosit, nöronlar ve hücre altı seviyede (nükleus, sitoplazma) incelenmesi amaçlanmıştır. KYD'nin tetiklediği nörojenik inflamasyona aracılık eden inflamatuvar belirteçlerin araştırılması ve belirlenmesi migren patofizyolojisine ışık tutabilir ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine imkan verebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Migren

Migren auralı ve aurasız olmak üzere iki ana gruba ayrılan, sık rastlanan bir epizodik baş ağrısıdır. Batı ülkelerinde toplam prevalansı erkeklerde %6-8, kadınlarda %15-25 olarak bildirilmektedir (1). Genel popülasyonda yaklaşık %5'lik bir grubun her yıl en az 18 gün, %1'lik bir grubun ise her hafta en az 1 gün migren ağrısı çektiği belirtilmektedir (22, 23). Migren ağrısı visseral ağrı özelliklerine sahiptir (24); tipik bir migren ağrısı tek taraflı, ağrı bölgesinde nabız atar gibi hissedilen, orta veya çok şiddetli ve fiziksel aktivite ile artış gösteren tarzdadır. Diğer organlar gibi beyin parankimi de ağrıyı hissetmez; ancak onu saran zarlar ve kan damarları ağrıya duyarlıdır. Bu konu ile ilgili bilgiler 1930'larda Wolff, Ray ve Penfield'in yaptığı çalışmalara dayanmaktadır. Bu araştırmacılar kraniyotomi sırasında uyanık halde olan hastalarda beyin parankiminin uyarılmasının ağrıya neden olmadığını gözlemlemişlerdir (25, 26). Oysa ki aynı şiddette uyarının meninkslere, serebral ve meningeal damarlara uygulandığında, aynı tarafta şiddetli ağrıya yol açtığı saptanmıştır (25, 26). İntrakraniyal ağrıya duyarlı yapılar şunlardır: meninkslerle çevrili bazal dura, venöz sinüsler; nöral yapılardan glossofaringeal sinir, vagus ve trigeminal sinir; üst servikal spinal sinirler; vasküler yapılardan dural arterler, karotid, vertebral ve baziller arter, Willis poligonu, serebral, vertebral ve baziller dalların proksimal kısımları. Dura matere ve meninkslere kan akımını sağlayan damarlar yoğun miktarda duyuşal ve otonomik inervasyon alır. Meninkslerin inervasyonunu trigeminoservikal sinirler sağlar. Bu yapılardan gelen uyarılar alın, ense ve oksipital sinir alanlarında yoğunlaşır.

Bu kadar sık rastlanan ve önemli iş gücü kaybına yol açan migrenin patofizyolojisine yönelik teorilere 1930'lu yıllardan itibaren rastlanmaktadır. Bunlardan Graham ve Wolff'un migren patofizyolojisine yönelik vasküler teorisine göre, migren ağrısının intrakraniyal damarların anormal dilatasyonu ve bu damarları inerve eden duyuşal liflerin mekanik uyarımı sonucu olduğu

öne sürülmüştür (27). Ancak bu teori başağrısı sırasında hangi damarlarda önemli oranda vazodilatasyon olduğunun gösterilememesi nedeniyle kanıtlanamamıştır (28, 29). 1990'lı yıllarda yapılan çalışmalarda dura materi inerve eden primer aferent liflerin mekanik, termal ve kimyasal uyarılarla aktive olabileceği gösterilmiştir (13, 30). Bu primer afferent nöronlar trigeminal gangliyondan ve üst servikal spinal sinirlerin dorsal kök gangliyonundan köken alır. Migrenle ilgili güncel teorilere göre meningeal nosiseptörlerin başlangıçtaki aktivasyonu ile trigeminovasküler sinir sonlanmalarından kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) ve P maddesi salınır, bu da dura materde vazodilatasyon ve plazma protein ekstrasvazasyonunu başlatır. Sonuçta sessiz durumda olan makrofaj ve mast hücrelerinin de katılımıyla "nörojenik" inflamasyon meydana gelir (31, 32). Migren hastalarının atakları sırasında jügüler venlerinde CGRP seviyelerinin artmış bulunması bu hipotezi desteklemektedir (33). Migren atağı sırasında trigeminovasküler sistemin aktivasyonuna dair deliller migren ağrısının klinik özellikleri ile kemirgenlerdeki sensitizasyon modellerinin benzerliğinden gelmektedir. Nosiseptif primer afferent liflerin aktivasyonu trigeminal nükleus kaudalisteki nöronların uyarılabilirliğini artırır (34). Trigeminal kaynaklı olmayan ağrı modellerinde kimyasal ve inflamatuvar uyarılarla C liflerinin sensitizasyonu birçok değişikliğe neden olur. Bunlar arasında ağrı algısının alanında genişleme, dorsal kökteki ikinci sıra nöronların aktivasyon eşiğinde düşme, normalde ağrı lifi olmayan liflerin ağrı iletmesi ve eşik altı uyarılara artmış cevap yer alır. Tüm bu değişikliklere santral sensitizasyon denir ve klinikte cilt hassasiyeti, hiperaljezi (ağrı eşiğinde düşme) ve kutanöz allodini (normalde ağrı oluşturmeyen bir uyarılarla ağrı ortaya çıkması) ile karakterizedir. Santral sensitizasyon başağrısı sendromlarında da görülür ve muhtemelen ağrının şiddetlenmesine ve süresinin uzamasına neden olur. Örneğin migrende ağrı başlar, daha sonra başta tek veya iki taraflı olarak yayılır. Ayrıca küçük baş hareketleri veya öksürük, gerilme gibi hareketler atak geçtikten sonra bile ağrılı olabilir. Bunun nedeni meninkslerdeki nosiseptörlerin uyarılması ile trigeminal nükleus kaudalisteki ikinci sıra nöronların aktivasyon eşiklerinin düşmesidir

(34). Periferik duyusal sinir uçlarının sensitizasyonunu santral trigeminoservikal nöronların sensitizasyonu izler, bu da nosiseptif liflerin arter nabızı ve baş hareketlerine hassasiyetini sağlar (35).

2.1.1. Nörojenik İnflamasyon ve Mast Hücreleri

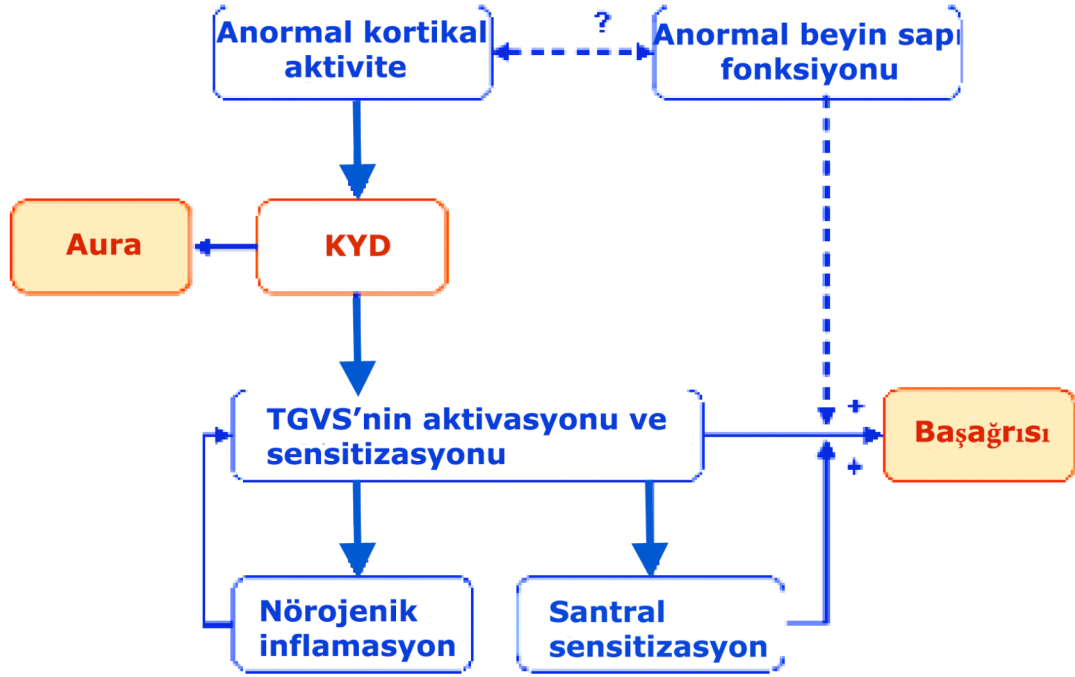
Migren ataklarını başlatan nedenin ne olduğu tam olarak anlaşılamasa da dura materi yani meningeal nosiseptörleri inerve eden ağrı liflerinin aktivasyonunun ağrının başlamasında çok önemli olduğu düşünülmektedir (36, 37). Dura materde ağrı liflerinin yoğun inervasyonunun olmasının yanında çok miktarda immün hücre de bulunmaktadır. Bu hücreler arasında granüllü immün hücrelerden olan ve inflamasyonda kritik önemi olan mast hücreleri yer almaktadır. Mast hücrelerinin, insanlarda ve kemirgenlerde dura materde olduğu ve kan damarları ile primer aferent nosiseptif nöronların hemen yanında yer aldığı bilinmektedir (38, 39). İn vivo çalışmalarda trigeminal gangliyonun uyarılması ile meningeal nosiseptörlerin aktive oldukları ve dura materdeki mast hücrelerinin granüllerini salıverildikleri gösterilmiştir (40). Meningeal nosiseptörlerin aktivasyonunun KYD'nin neden olduğu lokal proton, potasyum ve glutamat salıverilmesine bağlı olabileceği düşünülmektedir (8, 36). Aktive meningeal nosiseptörlerden P maddesi ve CGRP gibi nöropeptidler salıverilir, bu da normalde dura materde sessiz halde bulunan mast hücrelerinin aktivasyonuna ve degranülasyonuna neden olur (41). Degranüle mast hücrelerinden lokal olarak inflamatuvar moleküller salıverilir, bu moleküllerin meningeal nosiseptörleri daha da uyarak migren ağrısının uzamasına neden olabileceği düşünülmektedir. Levy ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada mast hücre degranülasyonunun meningeal nosiseptörleri aktive edebildiği elektrofizyolojik olarak gösterilmiştir (42). Bu çalışmada mast hücrelerinin degranülasyonu metilen mavisi ile yapılan histokimyasal boyamalarla saptanmıştır. Aynı zamanda c-fos boyaması yapılmış ve dural mast hücre degranülasyonunun spinal trigeminal nükleustaki nosiseptif nöronlarda da aktivasyona yol açtığı belirtilmiştir (42).

2.1.2. Migren Patogenezi ile KYD Arasındaki İlişki

Migren patogenezi ve KYD arasında bir ilişki olduğuna dair hipotez 50 yıl önce ortaya atılmıştır (6, 43). Meningeal perivasküler duyuşal liflerin kimyasal uyaranlara olan yanıtıllığı (44) teorisine göre; KYD oluştuktan sonra veya nörojenik inflamasyonda, dura materi inerve eden duyuşal liflerin etrafına iyonlar, protonlar ve inflamatuvar ajanlar salınır (6, 45, 46). Bu ajanlar periferel nosiseptörleri aktive ve sensitize eder. Bütün bunları başlatan asıl uyarının ne olduğü bilinmemekle birlikte, kabul edilen görüş kimyasal etkenlere kısa süreli maruz kalan perivasküler liflerin mekanik uyarıya olan hassasiyetinin değışmesi ve bunun sonucunda baş ağrısının hissedilmesi görüşüdür (34).

Elektriksel uyarı veya iğne batırılması ("pinprick") ile tetiklenen KYD'nin meningeal trigeminovasküler aferentleri aktive edebileceğı, bunun da trigeminal nosiseptif yolakların aktivasyonu ve meninkslerdeki değışiklikler aracılığı ile başağrısını başlatabileceğı bildirilmiştir (8). Ancak kortikal gri cevherde oluşan KYD'nin meningeal nosiseptörleri nasıl aktive ettiğı tam olarak bilinmemektedir. Deneysel modellerde, sıçan korteksinde KYD'nin ekstrasellüler sıvı kompozisyonunda değışikliklere yol açtığı gösterilmiştir. Örneğın ekstrasellüler ortamda glutamat, K^+ , H^+ iyon konsantrasyonları, NO, araşidonik asit ve prostaglandin düzeylerinde önemli artışlar olur (11). Bu maddelerden çoğı doğrudan veya perivasküler inflamasyon yoluyla meningeal trigeminovasküler aferentleri aktive ve/veya sensitize edebilir (13). Ancak ağrıya neden olan asıl aracı molekül veya moleküller hala bilinmemektedir.

Migren ağrısının oluşması ve devamında duradaki nörojenik inflamasyonun, vazodilatasyonun ve nosiseptif trigeminovasküler yolakların periferel ve santral sensitizasyonunun önemi hala tartışmalıdır ve migren alanında önemli bir araştırma konusudur. Trigeminoasküler sistemin sensitizasyonunun altında yatan moleküler mekanizmalar büyük oranda bilinmemektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Migren ağrısının oluşumunda rol aldığı düşünülen patofizyolojik mekanizmalar. Anormal kortikal aktivite ve anormal beyin sapı fonksiyonu arasındaki ilişki hala açık değildir (? ile belirtilmiştir). Aynı şekilde santral trigeminal hipereksitabilitede beyin sapı nükleuslarındaki fonksiyon bozukluğunun rolü de açık değildir (KYD: Kortikal yayılan depresyon, TGVS: trigeminovasküler sistem). Kaynak: Pietrobon D (2005) Neuroscientist (47).

Ancak migren aurası ile ilişkilendirilen KYD'nin mekanizmasına yönelik bilgilerimiz başarılı bir tedavi yaklaşımı oluşturmaya yetmemektedir. Nöronlar, glial hücreler ve vasküler hücreler gibi birçok hücre topluluğu KYD'nin başlaması, yayılımı ve sonlanmasında rol alır. KYD'nin tetiklenmesi ile nöronlardan bir habercinin çıkıp steril nöroinflamasyonu başlattığını düşünmekteyiz. Bu habercilerden biri HMGB1 proteini olabilir (14, 15, 48-50). KYD'nin tetiklediği nörojenik inflamasyona aracılık eden inflamatuvar belirteçlerin araştırılması ve belirlenmesi migren patofizyolojisine ışık tutabilir ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine imkan verebilir.

2.2. Kortikal Yayılan Depresyon

Kortikal yayılan depresyon ilk kez 1940 yılında bir Brezilya'lı fizyolog olan Aristides Leao tarafından tanımlanmıştır (5). Deneylerinde tavşan beyinde kortekse iğne batırarak ("pinprick") eksitasyon dalgalarının başladığını ve bunu nöronal suskunluğun izlediğini saptamıştır (5). Böylece KYD'yi kısa süreli bir depolarizasyon dalgasını takiben elektriksel aktivitenin serebral kortekste yavaşça yayılan (2-5 mm/dk) uzamış depresyonu olarak tanımlamıştır (5). KYD nöronların ve glial hücrelerin kendiliğinden yayılan, yoğun bir depolarizasyonu ile buna eşlik eden iyon dengelerindeki bozukluk ile karakterizedir (5). KYD nöronal elektriksel aktivitede geçici bir baskılanmaya ve iyonik gradientlerin geçici bir süre ile kaybına, sonuç olarak intrasellüler potasyumun aşırı miktarda saliverilmesine, sodyumun hücre içine girişine ve nörotransmitter saliverilmesine yol açar (11). Deneysel olarak birçok farklı uyaranla KYD tetiklenebilir. Bunlar arasında direkt kortikal travma, yüksek konsantrasyonda eksitator amino asit veya K^+ uygulanması, direkt elektriksel uyarı, Na^+/K^+ -ATPaz'ın inhibisyonu ve enerji yetersizliği yer alır (11). Leao'nun gözlemine göre KYD pial arterlerde geçici bir dilatasyona neden olur (5). Migrenli hastaların %20-30'unda baş ağrısından önce oluşan aura fazı ile KYD'nin yakından ilişkili olduğuna dair bilgiler 1990'larda tekrar gündeme gelmeye başlamıştır (6, 9, 51). KYD'nin migren (52), serebral iskemi (32, 53, 54), subaraknoid kanama (55) ve travmatik beyin hasarının (54) patofizyolojisinde rol aldığı düşünülmektedir. KYD'nin durdurulması bu tür hastalıkların tedavisinde temel bir hedef olmuştur. Ancak KYD mekanizmasına yönelik bilgilerimiz başarılı bir tedavi yaklaşımı oluşturmaya yetmemektedir.

2.2.1. Kortikal Yayılan Depresyonun Trigeminoasküler Sistem Aktivasyonundaki Rolü

Migren ataklarını tetikleyen mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır. Migren patogenezi ve KYD arasında bir ilişki olduğuna dair hipotez 50 yıldan daha önce ortaya atılmıştır (6, 43). Son zamanlarda yapılan

deneysel çalışmalarda ise sıçanda KYD'nin trigeminovasküler aferentleri aktive edebileceği ve orta meningeal arterde uzun süreli kan akımı artışı ile dura materde plazma protein sızmasına neden olduğu gösterilmiştir (8, 56). KYD'nin oluşturduğu kan akımı artışı trigeminoparasempatik refleks sonucudur. Dura materdeki protein ekstrasvazasyonuna pia-araknoid ve dura materi inerve eden trigeminal akson kollaterallerinden salınan proinflamatuvar peptidler aracılık eder. Nörokinin-1 reseptör inhibitörü meningeal plazma protein değişikliklerini azaltır, bu da bu reseptörlerin steril bir inflamatuvar yanıtta rol aldığını destekler. Meninkslerdeki steril inflamasyon KYD sonlandıktan belli bir süre sonra (yaklaşık 20 dk) ortaya çıkar, yani geçici bir beyin aktivitesi meninkslerde oluşan uzun süreli cevapların kaynağı olabilir. Ayrıca KYD ipsilateral trigeminal nükleus kaudalinde c-fos immünoreaktivitesini tetikler (56). Bu nükleer proteinin ekspresyonu için, zararlı bir uyarı ile küçük miyelinsiz C liflerinden bir girdi olması gereklidir. C-fos ekspresyonunun KYD ile olan ilişkisini tespit etmek amacı ile KYD öncesinde trigeminal sinir kesisi yapıldığında c-fos ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (57). Bu bilgiler beyinde başlayan nöral olayların trigeminovasküler aktivasyon aracılığı ile ağrıyı tetikleyebildiğini göstermektedir.

Son dönemde yapılan çalışmalarda KYD'nin MMP'leri aktive ettiği, vasküler geçirgenlikte uzun süreli bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Damarlardaki MMP aktivite değişiklikleri in situ zimografi tekniği ile 15 dk'da saptanmıştır (58). Gürsoy-Özdemir ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada, artmış MMP-9 seviyelerinin 3-6. saatte KYD ile aynı tarafta jel zimografi tekniği ile ölçülebilir olduğu ve aynı tarafta bu artışın en az 48 saat kaldığı belirtilmiştir (58). Laminin, endotelial bariyer antijeni ve zona okludens-1 immünoreaktivitesi ipsilateral kortekste bozulmakta, bu da KYD-aracılı MMP aktivasyonunun kan beyin bariyerinin devamlılığı için gerekli olan proteinleri etkilediğini düşündürmektedir (58). Bu tür bir kan beyin bariyeri bozukluğu KYD sırasında salınan inflamatuvar maddelerin damar etrafında yer alan trigeminal sinir uçlarını uyarmasına ve sensitizasyona yol açıyor olabilir.

2.2.2. Kortikal Yayılan Depresyonun Subkortikal Dokularda Yayılımı

KYD ile ilgili çalışmalar genellikle deney hayvanlarında ve özellikle fare, sıçan, tavşan gibi lizensefalik türlerde yapılmaktadır. Bu türlerde KYD yayılımının daha kolay olduğu oysa ki kedi, maymun gibi girenssefalik türlerde bunun daha zor olduğu düşünülmektedir (11). Ancak KYD dalgasının kortikal ve subkortikal yapılarda olduğuna dair bilgiler sıçan, kobay, kedi ve hatta maymunda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (59-61). Korteksten tetiklenen KYD'nin subkortikal dokularda yayılımı ile ilgili literatür 1960'lı yıllara dayanmaktadır. 1964 yılında Fifkova'nın yaptığı çalışmada korteksten tetiklenen KYD'nin %60 oranında striatuma geçtiği ve striatumdan tetiklenen KYD'nin de %42 oranında kortekse geçtiği gösterilmiştir (60). Benzer çalışmalarda KYD'nin retrosplenial ve entorinal bölgelerde yayılımı olduğu, ancak hipokampusta olmadığı da belirtilmiştir (60, 61). KYD'nin yayılımıyla ilgili elektrofizyolojik deneyleri doğrulamak üzere elektriksel olmayan sinyaller üzerinde de durulmuştur. Biyokimyasal çalışmalarda KYD'nin negatif yavaş potansiyelinin kortekste %100 oranında laktik asit artışı ile birlikte olduğu gösterilmiştir (62). Buradan yola çıkarak KCl ile oluşturulan KYD sonrası korteks, striatum ve amigdalada laktik asit artışı saptanırken, hipokampusta saptanmamıştır (62). Bundan 30 yıl sonra yapılan ve yine KYD'nin biyokimyasal olarak etkilediği bölgeleri bulmayı amaçlayan bir çalışmada, Caggiano ve arkadaşları eikozanoidlerin ifadesinde KYD ile değişiklik olup olmadığını ve değişiklik varsa bunun hangi beyin bölgelerinde olduğunu incelemişlerdir (63). Bu çalışmada sıçan korteksine KCl (0.5 M) uygulaması sonrası 0, 3 veya 6 saat ile 28 güne kadar olan zaman dilimlerinde sakrifiye edilen sıçan beyinlerinde immünohistokimyasal olarak siklooksijenaz ve lipoksijenaz immünoreaktivitesi ölçülmüştür (63). Siklooksijenaz immünoreaktivitesinin sadece KYD'nin indüklendiği sol parietal kortekste değil aynı zamanda ipsilateral hipokampusta da (ekspresyondaki azalma sıralamasına göre: dentat girus>CA3>CA1) arttığını saptamışlardır (63). Korteksten tetiklenen KYD ile proenkefalin mRNA'sının artışı inceleyen başka bir çalışmada ise proenkefalin mRNA'sının ipsilateral piriform korteks,

kaudoputamen ve olfaktor tüberkülde arttığı gösterilmiştir (64). KYD'nin neokorteks dışında subkortikal bölgelerde de etkilerinin olduğunu gösteren bu elektrofizyolojik ve biyokimyasal analiz çalışmalarındakine benzer etkinin magnetik rezonans görüntüleme (MRG) ile de gösterilmesi mümkün olmuştur. Henning ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sıçanda topikal KCl uygulaması ile oluşturulan KYD, manganez işaretli MRG (MEMRI=manganeze-enhanced MRI) ile görünür hale getirilmiştir (65). İpsilateral kortekste karşı kortekse göre MEMRI sinyal artışı %60 oranında fazla saptanmış ve bu tutulumun korteksin sadece yüzeyel tabakaları ve uygulanan bölge ile sınırlı olmadığı tespit edilmiştir (65). Retrosplenial granüler korteks, frontal korteks, piriform korteks ve peririnal kortekste de MEMRI sinyal artışı saptanmıştır. Ek olarak bu sinyal artışının sadece korteksi değil subkortikal yapıları da etkilediği saptanmıştır. Bu yapılar arasında hipokampusun CA 1-3. segmenti, subikulum, dentat girus, talamik nukleus, superior ve inferior kollikulus ve genikülat nukleus yer almaktadır. Sinyal artışının altında yatan mekanizma olarak hipokampus ile korteks arasındaki bağlantılarla, kortikotalamik bağlantılar öne sürülmüştür (65).

2.3. Panx Kanalları

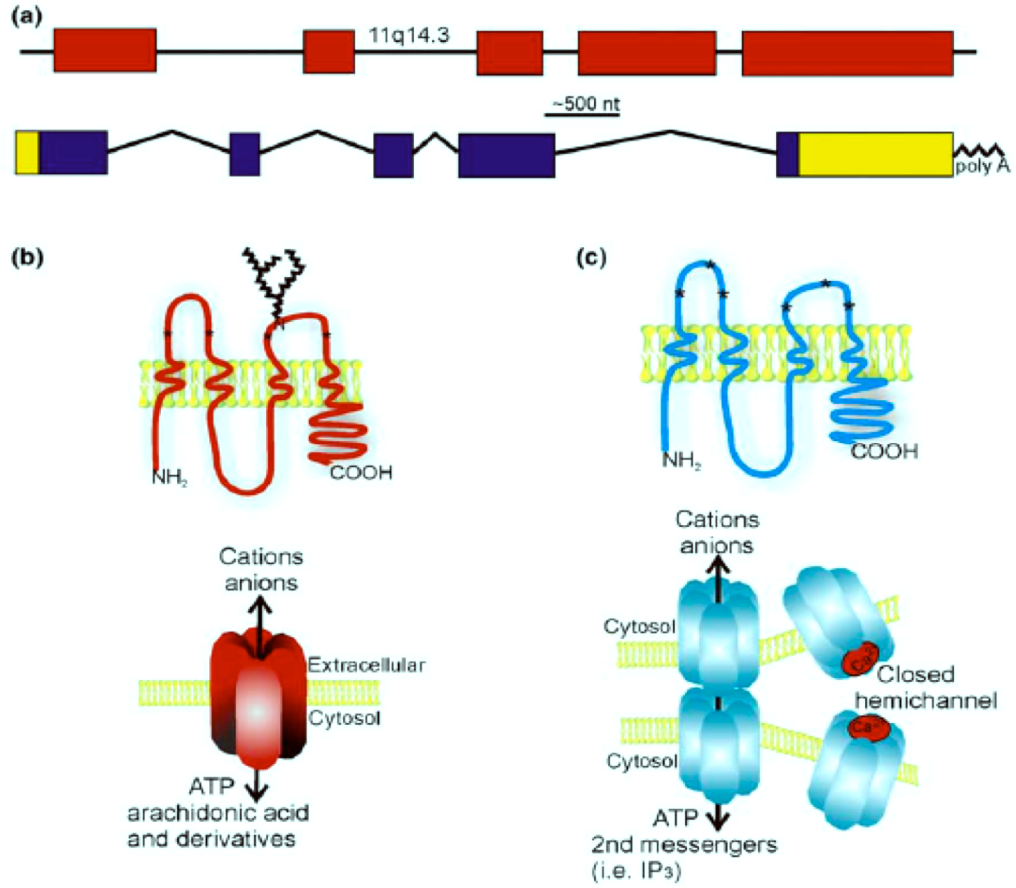
Panx gen ailesi, ilk kez 2003 yılında klonlanmıştır ve omurgasızların oluklu bağlantıları (gap junction) oluşturan proteinleri olan inneksinlerle homologdur (17). Panx ve inneksinler %46 oranında benzer olsalar da aralarında ve hatta konneksinlerle Panx arasında sekans homolojisi saptanmamıştır. Yine de bu gen aileleri arasında yapısal benzerlikler bulunmaktadır. Buradan yola çıkarak Panx ilk tanımlandığında hücreler arası oluklu bağlantıları oluşturdıkları düşünülmüştür. Ancak deneysel çalışmalar Panx'in nadiren oluklu bağlantı oluşturduğunu göstermiştir (66, 67). Aslında Panx plazma membranında büyük gözenekli kanallar oluşturur. Oluklu bağlantıların oluşumu için tek bir konneksin kanalının kavşak dışındaki membrana dahil olması gerekir. Böyle tek tek yerleşmiş olan konneksinlere

(konnekson) hemikanal denir, çünkü fonksiyonel oluklu bağlantının sadece yarısını temsil ederler. Fonksiyonel komplekse her bir hücre bir hemikanal ile katılır. Panx ailesi ilk kez keşfedildiğinde hemikanal olarak adlandırılmış, ancak günümüzde bu tür büyük-gözenekli, seçici olmayan kanallara mega kanallar denilmiştir. Ancak MacVicar ve arkadaşlarına göre Panx kanalları aslında kendileri plazma membran kanallarıdır (17) ve nöronal fizyoloji ve patofizyoloji açısından önemli rolleri vardır. Panx kanallarının fizyolojik rollerinin olması, daha önce kabul edilen görüşün aksine Panx gibi geniş kanalların açılmasının hücre ölümüne neden olmaksızın mümkün olabileceğini göstermektedir.

Panx'ler büyük-gözenekli, iletkenliği oldukça fazla olan plazma membran kanallarıdır (17). Panx-1 santral sinir sisteminde yaygın olarak ancak özellikle piramidal nöronların dendritik dikensi çıkıntılarında (spine) ifade olan bir alt tipidir (17, 19). Panx-1 yoğun NMDA reseptör uyarımı ve depolarizasyon sonucu, aynı zamanda iskemi ve aberan patlamalar (bursting) gibi patolojik durumlarda aktive olur (17, 20, 21).

2.3.1. Panx Ailesinin Üyeleri

Panx-1 kanalları en çok çalışılan Panx aile üyesidir. Panx-1 geni 11q14.3 geninde kodlanır ve beş ekzonu vardır (Şekil 2.2a), en az iki alternatif eklenmiş mRNA'sı vardır. Tahmin edilen sekonder yapısı konneksin ve inneksinlere benzer ve dört transmembran bölge ile intrasellüler C ve N terminalinden oluşur (Şekil 2.2b). Birçok yapısal ayrıntı Panx'leri oluklu bağlantıları oluşturan konneksinlerden ayırır. Örneğin konneksin hemikanalları kavşağın dışındaki plazma membranında oturur ve ekstrasellüler divalan katyonlarla (Ca^{2+} ve Mg^{2+}) birlikte bulunur (68). Komşu hücreden bir konnekson ile yakınlaştığında katyon bloğu kalkar ve hücreler arası kavşak açılır. Fonksiyonel çalışmalara göre ise Panx-1'in ekstrasellüler Ca^{2+} hassasiyeti bulunmaz (69). Bu önemli özellik sayesinde Panx, konneksinlerin aksine, divalan katyonlara hassas olmayıp, komşu hücrede yer alan Panx-1 ile de kavşak oluşturmaz. Esas olarak Panx-1 kanalları tek başlarına fonksiyon görür, başka bir etkileşim gerektirmez.



Şekil 2.2. Panx-1 kanallarının yapısı. a) Panx-1'i kodlayan gen 11q14.3'de yerleşiktir ve beş eksonu vardır. b) Panx-1'in önerilen sekonder yapısında ise her döngüde iki ekstrasellüler sistein (*) ve N-bağlı glikozilasyon kısmı vardır. Glikozilasyonun Panx kanallarını oluklu bağlantı oluşturmak üzere komşu hücreye yaklaşmasını önleyen önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle Panx'ler tek başlarına plazma membran iyon kanallarıdır. c) Panx-1 ile karşılaştırma yapmak üzere tipik bir konneksin kanalının sekonder yapısı görülmektedir. Konneksinlerin her döngüsünde üç ekstrasellüler sistein varken glikozilasyon kısmı yoktur. Konneksin kanalları kavşağın dışında oturur, bu yarı kanallar ekstrasellüler divalana katyonlara çok yakın dururlar ve bu blok komşu hücreden hemikanal gelip bir oluklu bağlantı oluştuğunda ortadan kalkar. Kaynak: MacVicar BA & Thompson RJ (2009) Trends Neurosci (17).

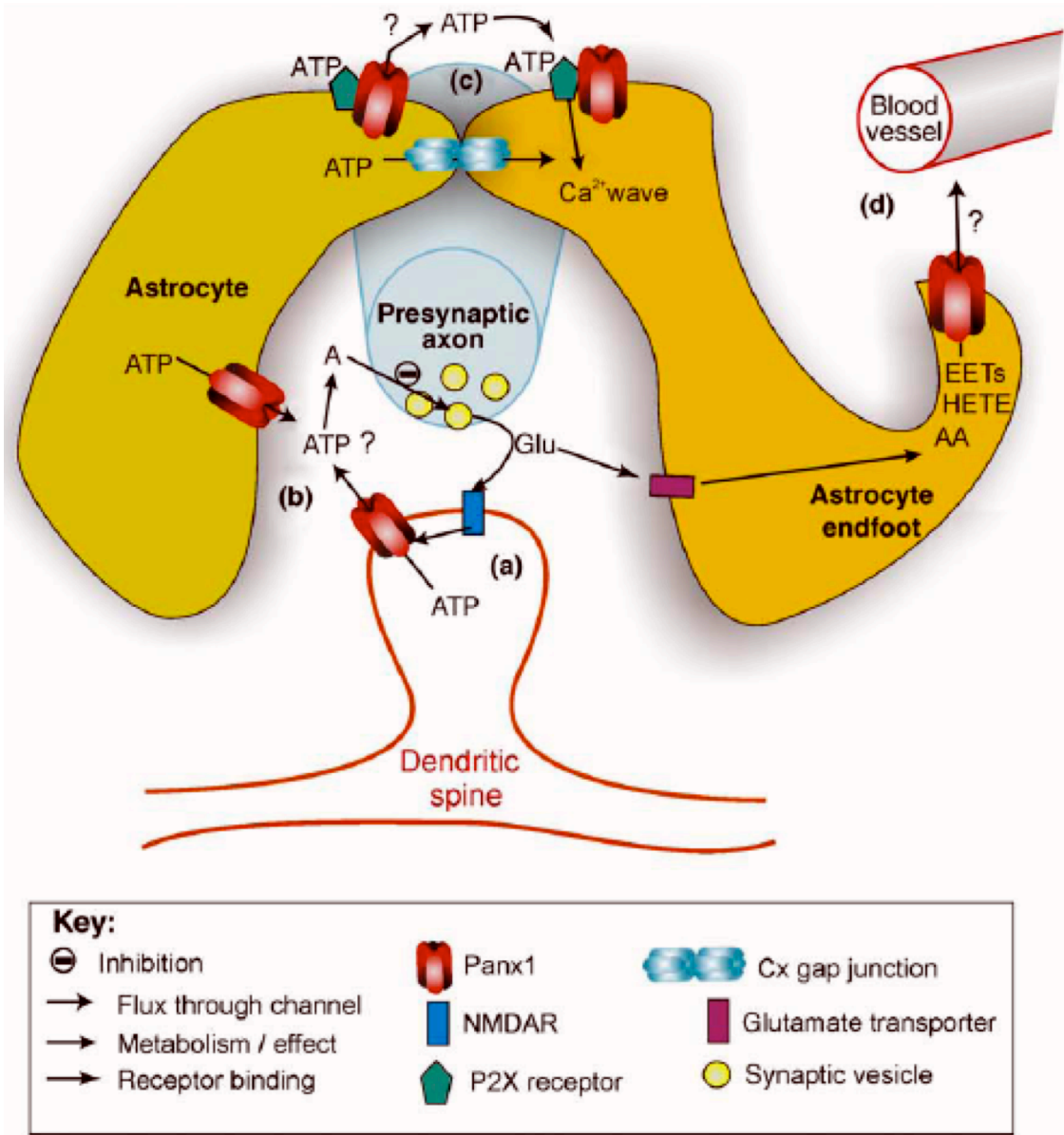
Panx'te konneksinden farklı olarak amino asit diziliminde üçüncü ekstrasellüler sistein yoktur (Şekil 2.2b). Bu özellik Panx'lerin, konneksinden farklı olarak fonksiyonel oluklu bağlantı oluşturmamasını açıklayabilir. Buna karşın inneksinlerde de üçüncü sistein olmamasına rağmen oluklu bağlantı oluşturabilmektedirler. Tek farklılık Panx'deki sisteinlerin C terminaline daha yakın olmasıdır. Panx'lerde sisteinden başka bir yapısal farklılık daha vardır. Bu da Panx'lerin aşırı glikozilasyona uğramasıdır. Panx-1, hücre yüzeyindeki trafiğini etkileyen, önemli bir rezüdüğü olan ekstrasellüler arjininden glikozillenmiştir. Büyük ekstrasellüler arjinine bağlı şeker dalları, Panx'lerin birbirine yaklaşması ve üst üste gelmesini önleyen fiziksel bir bariyer oluşturuyor olabilir.

2.3.2. Panx kanallarının fizyolojik rolü

Hem konneksin hem de Panx gibi büyük gözenekli kanallar 1kD'dan küçük molekülleri geçirebilir (18). Bu nedenle Panx kanalları iyonlara, ikincil mesajcılara, ATP, intozitol trifosfat gibi nörotansmitterlere, amino asitlere ve bazı boyalara geçirgen olabilir (Şekil 2.3). Örneğin eritrosit ve astrosit kültüründe Panx direkt ATP salıverilmesine aracılık eder.

İn vivo nöron, astrosit ve oligodendrosit transkriptom çalışmasında Panx-1 ifadesinin sadece nöronlarda olduğu saptanmıştır (70). Astrositlerde bulunduğu dair in vivo güçlü deliller olmasa da in vitro deneylerde astrositik Panx varlığı da gösterilmiştir (17).

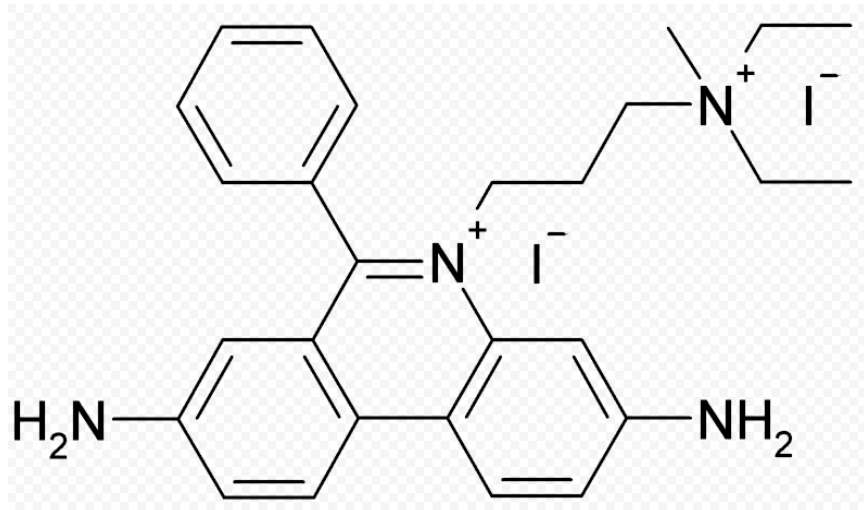
Hücre ölümünün klasik göstergesi olan plazma membranından boya geçişi ve hücrede boya tutulumunun, Panx-1'in keşfinden sonra nörodejenerasyonun kesin bir göstergesi olmayabileceği akılda tutulmalıdır. Propidyum iyodür (PI) gibi birçok boya Panx-1 gibi geniş gözenekli kanallardan geçebilecek moleküler ağırlığa sahiptir. Bu nedenle, PI pozitifliği her zaman hücre ölümünü göstermeyebilir.



Şekil 2.3. Panx-1 kanallarının sinaptik ve sinaptik olmayan bağlantılardaki olası rolü. Panx-1 postsinaptik bölgede bulunur ve NMDA reseptör sinyallerinin başlatılması ve ATP salıverilmesinde görev alır (a). Astrositte bulunan Panx-1, sinapsa ATP salıverilmesinde (b) veya pürinerjik reseptör aktivasyonu üzerinden kalsiyum dalgasının yayılmasında rol alır (c). Panx-1'in araşidonik asite geçirgen olması bu kanalların vasküler tonusun ayarlanmasında rolü olduğunu da düşündürür (d). Kaynak: MacVicar BA & Thompson RJ (2009) Trends Neurosci (17).

2.4. Propidylum İyodür

Propidium İyodür (PI) 668.4 Da ağırlığında floresan bir moleküldür ve DNA işaretlenmesinde kullanılır (Şekil 2.4). 488 nm lazer ışığı ile uyarıldığında 562-588 nm bant emisyon aralığında saptanabilir. Nekrotik, apoptotik ve normal hücrelerin ayrımında kullanılır (71). PI DNA'nın kantitatif olarak analizinde çok sık kullanılan bir boyadır (72). PI sekans tercihi yapmaksızın bazlar arasında interşelasyon yaparak DNA'ya bağlanır. Bu molekül 4-5 DNA baz çiftine bağlanabilir. Boya bir kez nükleik asitlere bağlanınca floresansı 20-30 kat artar. Eğer uygun optik filtreler kullanılırsa nükleer DNA ve floresan işaretli antikorların aynı anda saptanabilmesine imkan verir. PI floresan mikroskopi, konfokal lazer taramalı mikroskopi, akım sitometresi ve florometri için uygun bir boyadır. PI sıklıkla ölü hücreleri saptamak için ve çok renkli floresan boyama tekniklerinde karşıt boyamada kullanılır (73). Direkt veya indirekt antikor temelli boyama metodları, mRNA in situ hibridizasyon veya floresan ajanlarla spesifik hücresel yapıların boyanması gibi birçok sitolojik işaretleme tekniğinin karşıt boyaması için PI uygun bir boyadır.

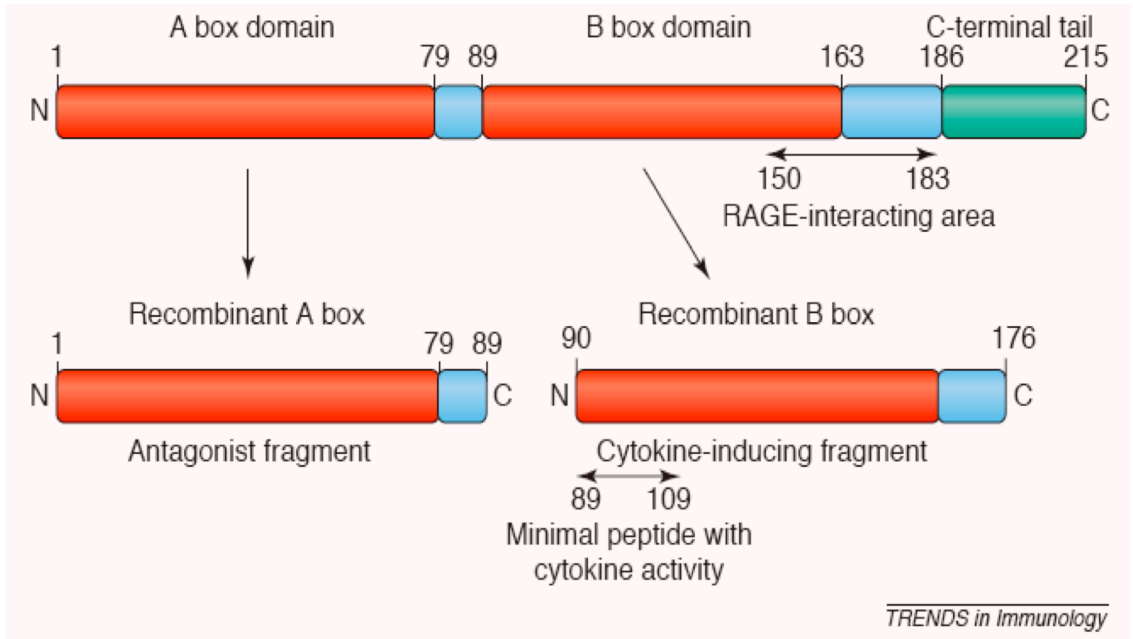


Şekil 2.4. Propidylum iyodürün moleküler yapısı. PI 668,4 Da ağırlığındadır. Moleküler formülü: $C_{27}H_{34}I_2N_4$

2.5. “High Mobility Group Box 1” (HMGB1)

Kortikal yayılan depresyonun mekanizmasına yönelik bilgilerimiz başarılı bir tedavi yaklaşımı oluşturmaya yetmemektedir. Nöronlar, glial hücreler ve vasküler hücreler gibi birçok hücre topluluğu KYD’nin başlaması, yayılımı ve sonlanmasında rol alır. KYD’nin tetiklenmesi ile nöronlardan bir haberci çıkıp steril nöroinflamasyonu başlatıyor olabilir. Bu habercilerden biri “high mobility group box 1” (HMGB1) proteini olabilir. Bu proteinle ilgili immünoloji literatüründe 25 yıldır ve nörolojilerde literatüründe son yıllarda yapılan çalışmaların sayısı artmaktadır.

HMGB1 muhtemelen 500 milyon yıl önce bitki ve hayvanlar ayrılmadan önce ortaya çıkmıştır. HMGB1 30 kD ağırlığında, organizmada yaygın olarak ifade edilen, histon olmayan bir nükleer proteindir (74). Tüm ökaryotik hücrelerde ifade edilir ve evrim boyunca yapısı çok iyi korunmuştur (memelilerde %99 özdeşdir) (14). Tüm hücrelerde üretilir ama çekirdekteki ifadesi büyüme ve yaşla değişir (74). Yapısal olarak 215 rezidüel DNA-bağlayan iki bölge, her birine HMG kutusu denir, ve negatif yüklü C-terminalinden oluşur. DNA-bağlayan bölgeler (A kutusu ve B kutusu) aminoasit dizisinin sadece %20’lik kısmı aynı olmasına rağmen şekil olarak benzerler (Şekil 2.5) (48).

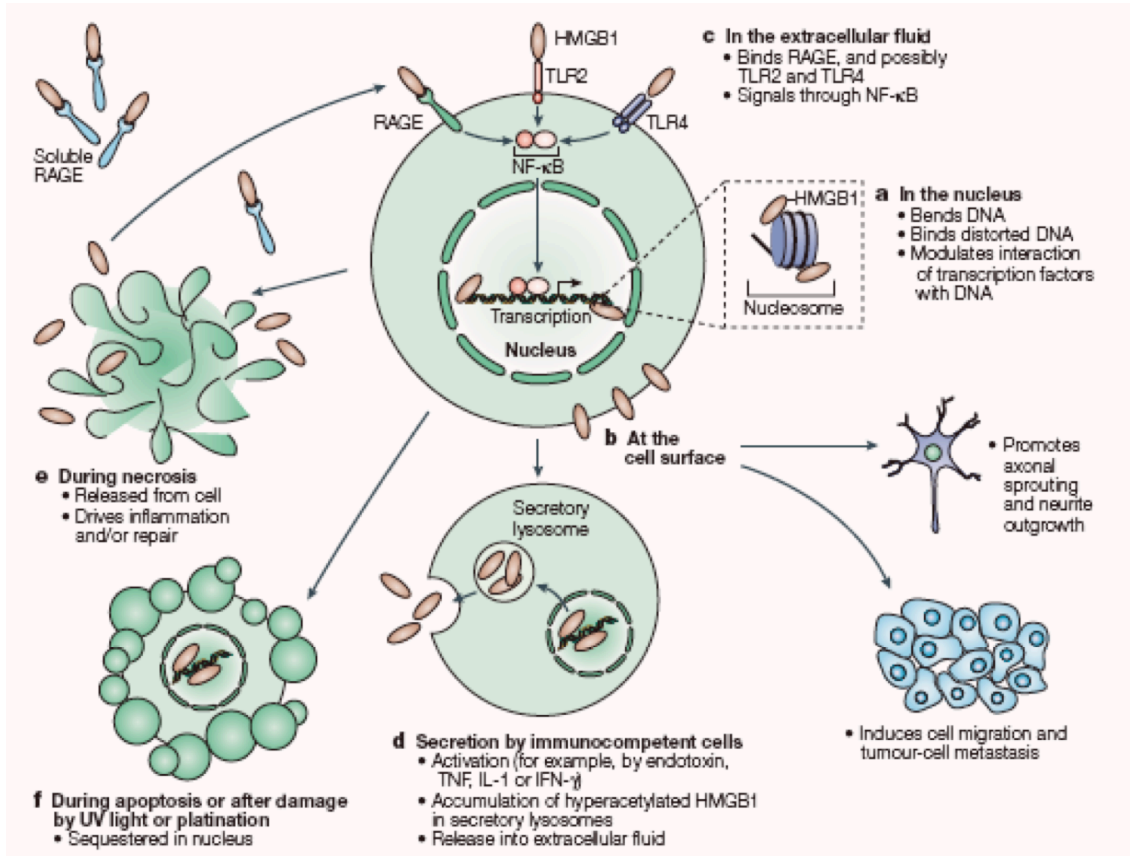


Şekil 2.5. HMGB1'in yapısı. HMGB1 30 kD ağırlığında 215 amino asitten oluşan nükleer bir proteindir. İki tane DNA bağlayan kısmı (kırmızı) vardır: A kutusu ve B kutusu, ayrıca negatif yüklü C-terminali (yeşil) bulunur. Mavi kutular fonksiyonel değildir. HMGB1'in kesilmesi sonucu rekombinant A kutusunun (1-89) özgül bir antagonist olarak çalıştığı, rekombinant B kutusunun (90-176) ise HMGB1'in sitokin aktivitesinden sorumlu olduğu ortaya çıkmıştır. Rekombinant B kutusunun ilk 20 amino asitlik kısmı sitokin aktivitesini sağlayan minimal peptid kısmıdır. HMGB1'in bir reseptörü olan "receptor for advanced glycation end-products" (RAGE) ile bağlanmasını sağlayan bölge ise 150-183. amino asitler arasındaki bölgedir. Kaynak: Dumitriu IE, (2005) *TRENDS in Immunology* (15).

Yapı-fonksiyon analizi çalışmaları HMGB1'in sitokin aktivitesinin B kutusu tarafından gerçekleştirildiğini, A kutusunun ise HMGB1 aracılı proinflatuar sitokinlerin makrofaj sekresyonunu azaltan spesifik bir antagonist olarak görev yaptığını göstermiştir (49).

HMGB1'in nükleus içinde önemli görevleri vardır ve hücrelerin çoğunda bu proteinden yüksek miktarlarda bulunur (Şekil 2.6) (75). HMGB1 nükleus içinde sıkı bağlı kromatin ve DNA'dan oluşan nükleozomlarla geçici ve gevşek bir bağ kurar. Burada HMGB1 DNA'nın üçboyutlu yapısının sağlanması ve transkripsiyonun kontrolü ve nükleer matriks ile iletişim için önemlidir. Nükleer HMGB1 DNA'nın minor oluşuna bağlanır ve helikal yapıda büküntü oluşmasını tetikler (75). Böylece DNA ile p53, NF-κB, benzer kutu-içeren proteinler, rekombinasyonu aktive eden gen ½ (RAG1/2) proteinleri ve steroid hormon reseptörleri gibi çeşitli faktörlerin fiziksel teması sağlanır (Şekil 2.6) (14, 48).

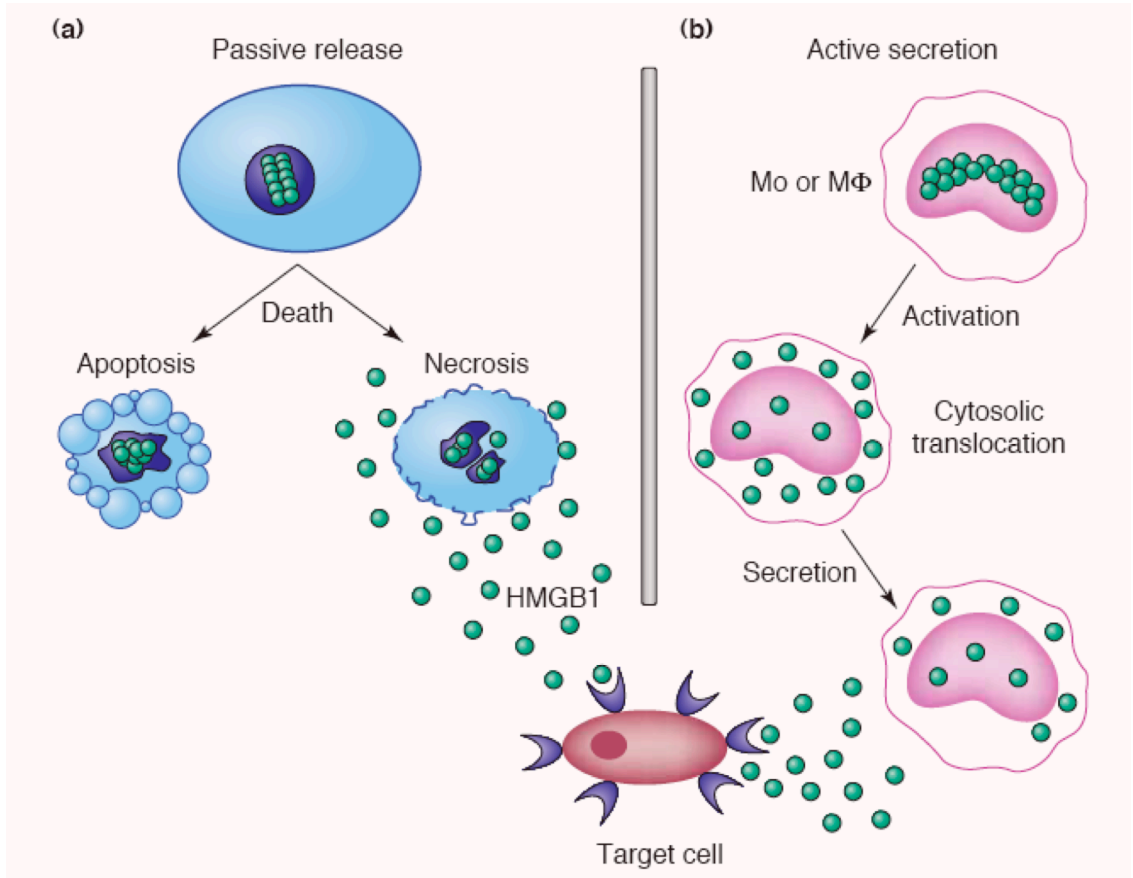
HMGB1'in nükleer fonksiyonu yaşam için elzemdir. HMGB1 geni silinmiş fare fenotipik açıdan da bozuktur ve doğumdan hemen sonra ölür (76). Nükleer lokalizasyonunun yanında HMGB1, bazı hücrelerde plazma membranında da bulunur. Membrana bağlı HMGB1'e aynı zamanda amfoterin de denir. Amfoterin nörit büyümesine ve düz kas hücre kemotaksisine aracılık eder (77-79). HMGB1 çok hareketli bir proteindir. Nükleusta dolaşır, spesifik bir DNA bölgesinde sadece saniyeden kısa bir süre boyunca kalır (80). Kromatine geçici olarak bağlanması HMGB1'in transkripsiyon ve diğer nükleer aktiviteleri yapmasını sağlar (48).



Şekil 2.6. HMGB1'in nükleus içindeki ve dışındaki etkileri. a) HMGB1 nükleus içinde sıkı bağlı kromatin ve DNA'dan oluşan nükleozomlarla geçici ve gevşek bir bağ kurar. Burada HMGB1 DNA'nın üçboyutlu yapısının sağlanması ve transkripsiyonun kontrolü ve nükleer matriks ile iletişim için önemlidir. b) İn vitro çalışma sonuçlarına dayanarak, gelişmekte olan sinir sisteminde ve aksonal hasar sonrası hücre yüzeyinde bulunan HMGB1 aksonal dallanma ve nörit büyümesinde görev alır. Membrana bağlı HMGB1 aynı zamanda hücre göçü ve tümör metastazında etkilidir. c) Ekstrasellüler ortamda bulunduğu anda ise RAGE, TLR2 ve TLR4 reseptörlerine bağlanarak NF- κ B ve mitojenle aktive olan protein kinaz p38 üzerinden hayatta kalım ve aktivasyon yollarını başlatır. d) HMGB1 endotoksin gibi bakteriyel ürünlerle veya tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) ve IFN- γ gibi proinflatuar sitokinlerle aktive olmuş olan makrofaj ve dendritik hücrelerden salıverilir. Bu salıverilme yolağında HMGB1 hiperasetillenir ve sekretuar lizozomlarda birikir, hücre

membranı ile birleşir ve ekstrasellüler ortama salıverilir. e) Nekrotik hücre ölümü sırasında ise HMGB1 hücreden salıverilir ve inflamasyon ve/veya onarım süreçlerini başlatır. f) Apoptoz sırasında veya ultraviyole ışın hasarında HMGB1 nükleusta birikir ve salıverilmesi önlenir. Kaynak: Lotze MT&Tracey KJ. (2005) Nat Rev Immunol (14).

HMGB1'in çekirdekten ve sitoplazmadan salıverilmesi tam olarak anlaşılamamıştır. Normal koşullarda HMGB1 hücre çekirdeğinde yerleşir, çekirdekte DNA'ya bağlıdır (81) ancak çok hareketli bir proteindir. HMGB1'in çekirdekten sitoplazmaya yer değiştirmesi çekirdeğin lokalizasyon sinyal sekansları ile kontrol altındadır. Herhangi bir uyarı sırasında HMGB1 çekirdeğin lokalizasyon sinyal sekanslarında bulunan lizin rezidülerinden asetillenir. HMGB1 birkez hiperasetillendiğinde çekirdeğin lokalizasyon sinyalleri maskelenir ve HMGB1'in çekirdekte kalması önlenir, böylece protein sitoplazmada birikir. Ardından sitoplazmada bulunan ve hiperasetillenmiş olan HMGB1 sekretuar lizozomlara yüklenir. Bu sekretuar lizozomların plazma membranı ile birleşmesi sonucu HMGB1 hücre dışı ortama salınır (Şekil 2.7) (81). HMGB1 proinflamatuvar bir sitokin olarak tanımlanır. İnflamatuvar bir uyarı sonucu aktive olmuş makrofaj, doğal öldürücü hücreler ve myeloid dendritik hücrelerden salınır. HMGB1 ekstrasellüler bölgeye nekrotik hücrelerden pasif olarak veya doğal immün sistem hücrelerinden aktif olarak salıverilir (15). Nekrotik hücrelerden çözünür bir molekül olarak salıverilir ve inflamatuvar cevabı tetikler (81). HMGB1 içeren nekrotik hücreler monositlerde TNF- α üretimini başlatır.



Şekil 2.7. Ekstrasellüler ortama HMGB1 saliverilmesi. Çoğu hücrede HMGB1 (yeşil) hareketli bir nükleer protein olarak bulunur, nükleus ve sitoplazma arasında gider gelir. HMGB1 iki şekilde ekstrasellüler ortama salınır: a) Nekrotik hücrelerden pasif salınım. Nekrotik hücrelerin plazma membran bütünlüğü bozulmuştur ve HMGB1 çevreye sızar. b) İmmün sistem hücrelerinden aktif salınım. Mikrobiyal veya proinflatuar bir uyararla monosit (Mo) ve makrofajlar (MΦ) uyarıldığında HMGB1 aktif sekresyonla nükleustan sitoplazmaya saliverilir. Burada spesifik lizin rezidüleri asetillenir ve HMGB1'in nükleusa girmesi önlenir. Sitozolde biriken HMGB1 daha sonra sekretuar veziküllerde depolanır ve ardından çevreye salınır. Ekstrasellüler HMGB1'in etkileri hedef hücreye ve bağlandığı membran reseptörüne göre değişir. Kaynak: Dumitriu IE, (2005) *TRENDS in Immunology* (15).

Bir hücreden HMGB1 saliverilmesi çevre doku için bir uyarı sinyali oluşturur (81). Apoptotik hücreler sekonder nekroz ve kısmi otolize uğrasa bile HMGB1 salıvermez ve bu nedenle inflamasyonu tetikleyemez (81). Akut hepatik nekroz modelinde HMGB1'in bloke edilmesinin lökosit cevabını azalttığı gösterilmiştir, yani HMGB1 nekroz aracılı inflamasyonda rol alır (15, 81).

Evrimsel süreçte HMGB1 genomda yoğun gen duplikasyonu olmadan önce, muhtemelen sitokin benzeri role sahipti. Gen duplikasyonu sitokin çiftleri ve sitokin reseptörlerinin oluşmasına yol açmıştır. HMGB1, hasar-aracılı moleküler patern (DAMP) moleküllerinin ana prototipidir. Bu molekül grubu normalde nükleus veya sitozolde bulunur. s100 proteinleri, heat-shock proteinleri, HMGB1 vb'den oluşur ve bunlar ekstrasellüler olarak salındıklarında konağa doku hasarı olduğu sinyalini verirler.

Tracey ve arkadaşları, aktive makrofajların inflamasyonun geç döneminde HMGB1 salıverdiğini göstermişlerdir (82). Bu salıverilme, klasik erken proinflamatuvar mediatörlerin (TNF- α ve IL-1) salıverilmesinden daha geç bir dönemde olur. Lipopolisakkarit verilerek endotoksemi oluşturulan standart fare modelinde serum HMGB1 seviyesi 1-18 saatte artmaya başlarken, TNF- α 2 saat ve IL-1 4-6 saatte tepe noktasına ulaşır. HMGB1 sistemik inflamatuvar cevaba aracılık ettiği için artık bir sitokin olarak kabul edilmektedir ve aktive immün hücrelerden salgılanır, immün ve endotelial hücrelerde prototipik inflamatuvar cevabı tetikler ve RAGE (receptor for advanced glycation end products) ve muhtemelen "Toll-like" reseptör 2 (TLR2) ve TLR4 gibi diğer reseptörler üzerinden hücresel cevapları değiştirir. HMGB1, reseptörüne bağlandıktan sonra sitoplazmada bulunan NF- κ B kompleksini aktive eder ve böylece NF- κ B'nin nükleusa yer değiştirmesini sağlar. HMGB1'in yeni reseptörlerine ve HMGB1 reseptörü-ligand ilişkisinin altında yatan sinyal transdüksiyon mekanizmalarına yönelik çalışmalar yoğun ilgi görmektedir.

2.5.1. HMGB1'in Beyindeki Rolü

Son yıllarda HMGB1'in santral sinir sisteminde (SSS) proinflamatuvar özellikleri üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. HMGB1'in farede intraserebroventriküler yolla uygulanması beyinde TNF- α , interlökin-1 β (IL-1 β), IL-6 seviyelerinde artış ile ateş, iştahsızlık ve kilo kaybına neden olur. Aslında HMGB1 beyinde nöron, astrosit ve pitüisitlerin çekirdeklerinde bulunur. İskemik hasar sırasında HMGB1 salıverilmesinin temel kaynağı nöronlardır (83). Kemirgen beyinlerinde yapılan gelişimle ilgili çalışmalarda HMGB1'in nöronal göç ve dallanmayı düzenlediği saptanmıştır (84). Gelişmekte olan sıçan beyinde HMGB1 hareketli hücrelerin kenarındaki filopodianın plazma membranında bulunur, böylece nörit büyümesini başlatır. HMGB1 fare beyinde gelişimin değişik basamaklarında farklı ifade şekillerine sahiptir ve erişkin dönemde baskılanma eğilimindedir. Bu bilgiler HMGB1'in SSS fonksiyonları açısından önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir.

HMGB1 RAGE, TLR2, TLR4 ve muhtemelen bilinmeyen başka reseptörler üzerinden işlev yapar (85). TLR4 ise HMGB1'in birçok fonksiyonuna aracılık eder (85, 86). Beyinde TLR4 ifadesi konusu hala tartışmalıdır. Birçok çalışmaya göre TLR4 asıl olarak mikrogliya, astrositler ve oligodendrositler gibi glial hücrelerde ifade edilir, ancak nöronlarda ifade edilmez (87). Son yıllarda yapılan çalışmalara göre ise viral RNA veya bakteriyel proteinlere yanıt veren en azından bazı TLR'ler nöronlarda ifade edilir (88, 89). TLR'lerin nöronal ifadesi ile ilgili artan sayıdaki çalışma, bu reseptör ailesinin nöronlarda hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda etkili olduğunu göstermiştir (90). Gen ifade çalışmalarında farede serebral iskemi sırasında nöronal TLR2, TLR4 ve TLR9 mRNA ifadesinin arttığı saptanmıştır (90, 91).

TLR4 esas olarak gram-negatif bakterilerden gelen lipopolisakkaritleri tanır (92). Aynı zamanda HMGB1, ısı şoku proteinlerinden 60 ve 70 (HSP 60, 70), okside düşük dansiteli lipoprotein, sürfaktan protein A, fibronektin ve defensin gibi endojen proteinler de TLR4'ü uyarabilir (93). İskemik hasarda TLR4 sinyalizasyonunu başlattığı bilinen tek molekül HMGB1'dir (93). TLR4 HMGB1'in birçok ekstrasellüler fonksiyonuna aracılık eden bir reseptördür (92-

94). Aslında TLR4 sistemik bakteriyel enfeksiyon ve serebral hasara immün sistemin verdiği cevabı aktive eder (95). Son yıllarda TLR4'ün iskemik beyin hasarında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (96, 97). TLR4 geni silinmiş farede serebral enfarktın daha küçük olduğu ve inme sonrası inflamatuvar cevabın daha az olduğu saptanmıştır (98). Yani TLR4 sinyalizasyonu beyin hasarında önemlidir. Beyin iskemisi sonrası izole edilen endojen TLR4 ligandları içinde HMGB1 yer alır (99). Bu da serebral iskemide oluşan nöronal hasara TLR4-HMGB1 etkileşiminin yol açtığını düşündürür.

2.6. Nükleer Faktör- κ B

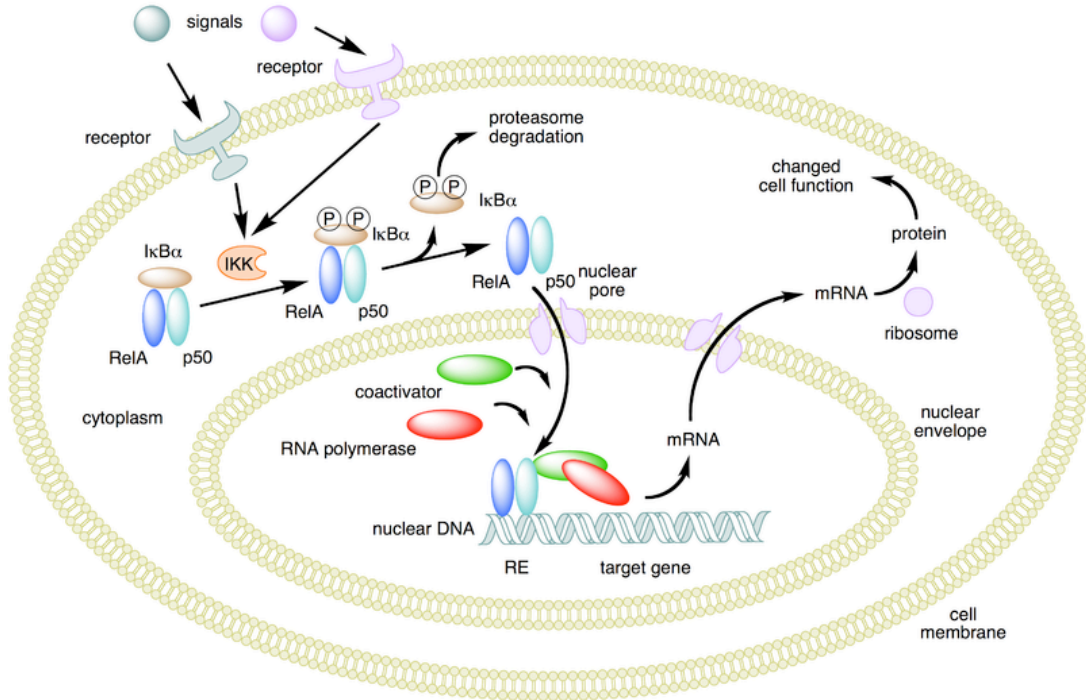
Nükleer faktör kappa-hafif zincir-aktive B hücrelerinin güçlendiricisi (NF- κ B) DNA transkripsiyonunu kontrol eden bir protein kompleksidir. Tüm hücre tiplerinde bulunur ve stres, sitokinler, serbest radikaller, ultraviyole ışıması, okside LDL ve bakteriyel veya viral antijenler gibi uyarılara karşı oluşan hücresel yanıtta görev alır (100). NF- κ B enfeksiyona karşı oluşan immün yanıtın düzenlenmesinde önemlidir (kappa hafif zinciri immünoglobulinlerin temel bir bileşenidir). NF- κ B'nin düzenlenmesindeki bozukluk kanser, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar, septik şok, viral enfeksiyon ve immün gelişim bozukluğuna yol açar. Ayrıca NF- κ B sinaptik plastisite ve hafıza oluşumunda da görev alır (101).

NF- κ B ailesi homo- veya heterodimerik olarak bulunan bir komplekstir. Bu protein kompleksi RELA/p65, RELB, NFKB1/p105, NFKB1/p50, REL ve NFKB2/p52 gibi Rel-benzeri domain-içeren proteinlerden oluşur, en çok bulunanı ise heterodimerik p65-p50 kompleksidir. Memelilerde NF- κ B ailesinin 5 üyesi vardır (Tablo) (102).

Tablo: Memelilerde NF- κ B ailesinin üyeleri.

Sınıf	Protein	Diğer adı	Gen
I	NF- κ B1	p105 $\rightarrow$ p50	NFKB1
	NF- κ B2	p100 $\rightarrow$ p52	NFKB2
II	RelA	p65	RELA
	RelB		RELB
	c-Rel		REL

Birçok çalışmada bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin sinir sistemi ve diğer sistemler için önemli bir inflamatuvar gen ifadesi düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir (103, 104). Normal şartlarda NF- κ B endojen inhibitörü olan I κ B- α 'ya bağlı olarak sitoplazmada latent halde bulunur. Lezyonla tetiklenen oksidatif stres, nörotrofinler, glutamat, depolarizasyon, bakteriyel endotoksin veya sitokinlerle aktive olduğunda ise I κ B- α fosforlanır, übikütinlenir ve ardından proteazom sistemi ile degrade edilir (Şekil 2.8). Serbest kalan NF- κ B ise nükleusa transloke olur ve κ B ile ilişkili sekanslara bağlanarak NF- κ B tarafından düzenlenen genlerin ifadesini başlatır. Bu genlerin aktivasyonu ile inflamatuvar veya immün cevap, hayatta kalım cevabı ve hücrel proliferasyon gibi fizyolojik cevaplar düzenlenir. Nöronlarda NF- κ B aktivasyonu genellikle sinaptik plastisite, nöronal fonksiyon, büyüme ve yaşam için gerekli iken glial hücrelerde TNF- α , IL-1 β , IL-6, siklooksijenaz-2, indüklenebilir Nitrik oksit sentaz ve adezyon molekülleri gibi proinflamatuvar genlerin ifadesini artırarak inflamatuvar cevabı düzenler (104, 105). Aynı zamanda NF- κ B kendi baskılayıcısı olan I κ B- α 'nın sentezini de başlatır. Yeni sentezlenen I κ B- α negatif oto "feedback" devre ile NF- κ B'yi yeniden inhibe eder. I κ B- α 'nın hem nükleer lokalizasyon dizileri hem de dışarı gönderme dizileri vardır, bu sayede nükleus sitoplazma arasındaki döngüsünü sağlar. Yeni sentezlenen serbest I κ B- α nükleer NF- κ B'ye bağlanır ve bu kompleksin sitoplazmaya atılmasına neden olur. NF- κ B ve I κ B- α kompleksi hücre dışından bir uyarı gelinceye ve I κ B kinaz tarafından fosforlanıncaya kadar sitoplazmada tutulur (106).



Şekil 2.8. NF-κB'nin etki mekanizması. Bu şekilde Rel ve p50 proteinlerinden oluşan NF-κB heterodimeri örnek olarak verilmiştir. NF-κB inaktif durumda iken sitoplazmada inhibitör protein IκB-α ile kompleks yapmış halde bulunur. Hücre dışından gelen bir uyarı ile IκB-α, IκB kinaz tarafından fosforillenir, ardından NF-κB'den ayrılır ve übiqütinasyona uğrar, daha sonra da proteazom ile degrade edilir. Aktive hale geçen NF-κB ise nükleusa yer değiştirir ve DNA'daki yanıt elemanları ("response elements") denilen özel sekanslara bağlanır. DNA/ NF-κB kompleksi koaktivatörler ve RNA polimeraz gibi diğer proteinlerle de etkileşerek mRNA transkripsiyonuna ve devamında protein translasyonu sonucu hücre fonksiyonunda değişikliğe neden olur. Kaynak: Perkins ND (2007) Nat. Rev. Mol. Cell Biol (10).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvanlar ve Cerrahi

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi, Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü, Beyin Araştırmaları Laboratuvarında yapılmıştır ve deneysel işlemler Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 2008/55 kayıt numarası ile onaylanmıştır.

Deneyler için 98 adet Swiss albino (25-35 g), 2 adet C57/Bl6 (24 ve 28 g) ve 2 adet SV129 (24 ve 25 g) fare kullanılmıştır. 18–21°C oda sıcaklığında, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortamda tutulan fareler deneyden bir gece önce aç bırakılmıştır. Farelere intraperitoneal ürethan (%25'lik ürethan 0.12 mg/kg anesteziyi başlatmak için, 0.02 mg/kg ise idame olacak şekilde) ve xylazin (5 mg/kg) anestezisi uygulanmıştır. Deney süresince fareler, 2 litre/dk oksijen desteğinde kendi solunumlarına bırakılarak izlenmiştir. Rektal sıcaklık takip edilerek homeotermik battaniye kontrol ünitesi (Harvard Apparatus Limited, İngiltere) ile vücut ısısı $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ arasında tutulmuştur. Deney süresince noninvazif olarak alt ekstremiteden nabız ve oksijen saturasyonu (V3304 Digital Table-Top Pulse Oximeter, SurgiVet, Amerika Birleşik Devletleri) takipleri yapılmıştır. Elde edilen veriler veri kazanım sistemi (Powerlab 8/30, ADInstruments) vasıtasıyla bilgisayara kaydedilmiştir.

Deney hayvanlarına anestezi uygulandıktan ve derin anestezi sağlandığı kuyruk sıkıştırmasına verdiği yanıtla test edildikten sonra, yüz üstü pozisyonda dış kulak yollarından ve burundan sabitlenecek şekilde stereotaksi çerçevesine (Digital Lab Standard Stereotaxic Frame, Stoelting, Amerika Birleşik Devletleri) yerleştirilmiştir. Stereomikroskop (Zeiss, SV6) altında bregma ve sağ parietal, frontal kemikler görülecek şekilde cilt kesisi yapılmıştır. İğne batırılması yöntemi ile KYD tetiklemek üzere, yüksek hızlı drill yardımı ile, bregmanın 1.3 mm anterioru ve 1 mm lateralindeki sağ frontal kemik bölgesi inceltip, inceltiren kemik forsepsi yardımı ile kaldırılmıştır. Bu işlem esnasında dura parçasının hasar görmemesine dikkat edilmiştir. Açılan kranial pencere KYD oluşturmak üzere iğne batırılması veya korteks yüzeyine 1 M KCl

emdirilmiş pamuk uygulanması için kullanılmıştır. Drill kullanırken soğuk serum fizyolojik infüzyonları ile kemik soğutulmuştur.

3.2. Propidyum İyodür Enjeksiyonu

Propidyum iyodür membranları geçemeyen bir boyadır, ancak mega kanallardan geçebilir ve hücreye girdikten sonra nükleik asitlerle etkileşerek kırmızı renkli floresans verir. KYD tetiklenmeden 2 dk önce, 25 gauge Hamilton iğnesi yardımıyla PI (1 mg/ml distile su, Molecular Probes, Amerika Birleşik Devletleri) intraserebroventriküler (i.s.v.) yoldan enjekte edilmiştir. Bunun için için bregamın 0,1 mm posterioru, 0,9 mm lateralindeki sağ pariyetal kemikte yuvarlak bir kemik parçası kaldırılmıştır ve enjeksiyon bu bölgeden fare stereotaksik atlasındaki verilere uygun olarak 3,1 mm derine enjekte edilmiştir. Sağ frontal bölgeden kemik parçası kaldırılmış ve buradan iğne batırılması ile KYD tetiklendikten 5, 30 veya 60 dk sonra fareler kardiyak yolla, % 0,4 heparin ve ardından % 4 paraformaldehit (PFA) ile perfüze edilmiştir. Her bir zaman noktası için 6 fare kullanılmıştır. Kontrol grupları için ise KYD oluşturulmaksızın i.s.v. yolla PI enjekte edilmiş ve aynı zaman noktalarında sakrifiye edilen fareler perfüze edilerek beyinleri çıkarılmıştır (n=6 fare/ zaman noktası). Çıkarılan beyinler 24 saat süre ile % 4'lük PFA ve ardından 48 saat boyunca % 30'luk sukroz solüsyonunda bekletilmiştir. Daha sonra beyinlerden kriyomikrotomda 20 μ m'lik koronal kesitler frontal bölgeden başlanıp beyin sapı da dahil olmak üzere alınmıştır. Bir çekirdek boyası olan Hoechst-33258 ile boyanan kesitler, PI floresansı açısından floresan mikroskopta (Nikon Eclipse E600) uygun filtreler yardımıyla değerlendirilmiştir. Hoechst-33258 floresansı için eksitasyon 330-380 nm, emisyon 420 nm ve PI floresansı için eksitasyon 510-560 nm, emisyon 590 nm olan filtreler kullanılmıştır. Her bir zaman noktası için KYD ve kontrol gruplarında, 40'luk büyütmede, her anatomik bölge için ikişer alanda PI floresansı gösteren hücreler sayılarak mm²'deki PI pozitif hücre sayısı saptanmıştır.

Bir başka deney düzeneğinde ise i.s.v. yoldan direkt uygulanan PI enjeksiyonunun yapabileceği olası bir travmanın PI pozitifliği üzerine

olabilecek etkisini ayırt etmek üzere, KYD tetiklenecek olan hemisferin karşı tarafındaki lateral ventriküle kanül yerleştirilmiş ve KYD öncesi PI bu yolla verilmiştir. Bu amaçla deneyden 1 gün önce dış çapı 1 mm olan bir polietilen kanül bregmanın 0,15 mm posterioru ve 0,7 mm lateralinde açılan küçük bir kemik pencereden 2,1 mm derine yerleştirilmiştir. Ertesi gün stereotaksik çerçeveye yerleştirilen fareye mikromanipülatör yardımıyla ve Hamilton iğnesi ile PI yavaşça enjekte edilmiş ve bundan 2 dk sonra iğne batırılması ile frontalden KYD tetiklenmiştir. Beş dk sonra ise kardiyak yolla % 0,4 heparin ve % 4 paraformaldehit ile perfüze edilmiştir. Kontrol grubunda ise kanülden PI enjekte edilmiş ancak KYD oluşturulmamıştır. Kardiyak yolla perfüzyon sonrası çıkarılan beyinler yukarıda bahsedildiği şekilde muamele edilmiş ve PI pozitif hücreler sayılmıştır. KYD ve deney grubunda 6'şar fare kullanılmıştır.

PI pozitifliğinin plazma membran geçirgenliğinde seçici olmayan bir artışa bağlı olup olmadığını test etmek üzere, molekül ağırlığı 77000 Dalton olan floresan izotiyosiyanat-dekstran-70S (FITC-dekstran-70S, Sigma, ABD) ile 3 deney yapılmıştır. Bunlardan ikisinde FITC-dekstran-70S (0.5 μ L, 5 mg/mL serum fizyolojik içinde) i.s.v. kanül yoluyla enjekte edilmiş, üçüncüsünde ise beraberinde PI da verilmiştir. Enjeksiyonlardan 2 dk sonra iğne batırılması ile KYD tetiklenmiş ve 5 dk sonra fareler kardiyak perfüzyonla sakrifiye edilmiş ve yukarıda bahsedildiği şekilde takiplerden geçirilen beyinlerden 20 μ m kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler çekirdek işaretleyicisi olan Hoechst-33258 ile boyandıktan sonra uygun filtreler kullanılarak floresan mikroskopta değerlendirilmiştir.

3.3. Elektrofizyoloji Deneyleri

İğne batırılması veya topikal 1 M KCl uygulaması ile tetiklenen KYD'ler elektrofizyolojik yolla kaydedilmiştir. Bunun için bregma ile lambda arasındaki kemik bölge tek hemisferde inceltilmiştir. İnceltilmiş kemik üzerine iki adet Ag-AgCl kaplı, 1 mm çaplı pelet elektrot yerleştirilmiş ve direkt akım (DA) potansiyelleri kaydedilmiştir. Elektriksel iletkenliğin yeterli olması için elektrotların uçlarına EEG jeli sürülmüştür. Topraklama için bir adet Ag-AgCl

kaplı disk elektrodu boyun kaslarının arasına yerleştirilmiştir. Kayıtlar alt ve üst sınırlar ± 100 mV ve örnekleme hızı 1 Hz olacak şekilde ayarlanmıştır. Sinyaller veri kazanım ve analiz sistemi (PowerLab 8/30, ADInstruments) ile depolanmıştır.

Başka bir deney düzeneğinde ise KYD'nin subkortikal dokulardaki yayılımı incelenmiştir. Bunun için 6 farede korteks ve derin yapılardan aynı anda DA potansiyelleri kaydedilmiştir. Uç kalınlığı 1 μ m olan bir tungsten unipolar elektrot frontal kortekse (bregmanın 0,5 mm anterioru, 1 mm laterali ve 0,5 mm derine) indirilmiştir. Bir başka tungsten unipolar elektrot ise subkortikal yapılara indirilmiştir. Kayıt yapılan bölgeler ve koordinatları şu şekildedir: Dentat girus için bregmanın 2 mm posterioru, 1,5 mm laterali ve 1,8 mm derine; talamusun ventral posterolateral nükleusu için bregmanın 1,6 mm posterioru, 1,75 mm laterali ve 3,25 mm derine; kaudoputamen için bregmanın 0,86 mm anterioru, 1,5 mm laterali ve 3 mm derine; hipotalamus için ise anterior hipotalamik bölge hedeflenerek bregmanın 1,22 mm posterioru, 0,5 mm laterali ve 4,75 mm derine inilmiştir.

KYD'nin etkilerinin soy farkı ile ilişkili olup olmadığını test etmek üzere Swiss Albino farelerin yanında C57 ve SV129 fare soylarında da deneyler yapılmıştır. Her grupta ikişer fare kullanılmıştır. Üretan ve ksilazin anestezisi verilen fareler yukarıda anlatıldığı şekilde stereotaksi çerçevesine yerleştirilmiş ve sağ i.s.v. kanülden PI enjekte edilip, 2 dk sonra iğne batırılması ile KYD tetiklenmiş, bu sırada elektrofizyolojik olarak DA potansiyel kaydı yapılmıştır. 5 dk sonra fareler kurban edilmektedir. Kardiyak yolla % 0,4'lük heparin ve % 4'lük PFA ile perfüze edilerek çıkarılan beyinler yukarıda bahsedildiği şekilde muamele edilmiş ve PI pozitif hücreler sayılmıştır.

3.4. Farmakolojik Ajanların Uygulanması

Seçici olmayan bir NMDA reseptör antagonisti olan MK-801, KYD dalgasının oluşumunu baskılamak üzere kullanılmıştır. Bu deneylerde 4 fare kullanılmış ve (+)-MK-801 (Tocris, ABD) topikal yolla sağ frontalde açılan kemik pencereye uygulanmıştır. Bunun için 10 mM (+)-MK-801 emdirilmiş

pamuk 10 dk boyunca burada tutulmuş, ardından kaldırılmış ve karşı lateral ventriküle yerleştirilmiş olan kanülden PI enjekte edilmiştir. 2 dk sonra iğne batırılarak KYD tetiklenmiş ve bu sırada elektrofizyolojik kayıt alınmıştır. 5 dk sonra ise kardiyak yolla perfüze edilen farenin beyni çıkarılarak daha önce tariflendiği şekilde (bakınız Bölüm 3.2) işlemlerden geçirilip PI pozitifliği incelenmiştir.

Panx kanallarını bloke etmek üzere ise iki ajan kullanılmıştır. İlk olarak seçici olmayan bir konneksin blokörü olan karbenoksolon (CBX, Sigma, ABD) ile deneyler yapılmıştır. Bu deneylerde birgün önce sağ lateral ventriküle yerleştirilen polietilen kanülden 400 ng CBX (2 μ L distile su içinde) enjekte edilmiş, 10 dk sonra ise PI enjeksiyonu yapılmıştır. Bundan 2 dk sonra iğne batırılarak KYD tetiklenmiş, bu sırada elektrofizyolojik kayıt alınmış ve 5 dk sonra fare sakrifiye edilmiştir. Kontrol grubunda ise CBX yerine çözücüsü olan distile su (2 μ L) verilmiş, geri kalan işlemler aynen uygulanmıştır. Her bir grupta 3 fare kullanılmıştır.

İkinci olarak ise Panx kanallarının seçici bir peptid inhibitörü olan 10 Panx kullanılmıştır. 10 Panx (Tocris, ABD) yapay beyin omurilik sıvısı içinde çözülmüş ve 1 μ L yapay BOS içindeki 100 μ M 10 Panx intrakortikal yolla sağ frontal ve parietal kortekse uygulanmıştır. Bunun için pH=7.4, sıcaklığı 37 $^{\circ}$ C olan ve içinde mM cinsinden 124 NaCl, 5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 2.4 CaCl₂, 25 NaHCO₃ ve 10 glukoz bulunan yapay beyin omurilik sıvısı hazırlanmıştır. Önce sağ frontalde bregmanın 1 mm anterioru, 2 mm lateralinde 1 mm derine ve ardından sağ parietal bölgede bregmanın 2 mm posterioru, 2 mm lateralinde 1 mm derine, 25 gauge Hamilton iğnesi kullanılarak, 10 dk süresince yavaş enjeksiyonla 10 Panx verilmiştir. Geriye sıvı çıkışını önlemek üzere enjeksiyon bitiminden sonra 5 dk boyunca Hamilton iğnesi bekletilmiştir. Kontrol deneylerinde sadece 1 μ L yapay beyin omurilik sıvısı aynı bölgelere aynı yöntemle enjekte edilmiştir. Her grupta üçer fare kullanılmıştır. Enjeksiyondan 5 dk sonra i.s.v. kanülden PI verilmiş ve bundan 2 dk sonra iğne batırılarak KYD tetiklenmiştir. Yine elektrofizyolojik kayıt alınmış ve 5 dk sonra fareler perfüze edilerek sakrifiye edilmiş ve beyinleri

çıkarılmıştır. Beyinler daha önce tariflendiği şekilde (bakınız Bölüm 3.2) işlemlerden geçirilip, PI pozitifliği incelenmiştir.

Ayrıca hem nöronal uyarılabilirliği üretandan daha çok baskılayan hem de oluklu bağlantı inhibitörü olduğu bilinen (107) izofloran anestezisi kullanılarak da deneyler de yapılmıştır (n=2). Bunun için % 2'lik izofloran anestezisi altında fareler stereotaksi çerçevesine yerleştirilerek sağ i.s.v. kanülden PI enjekte edilip, 2 dk sonra iğne batırılması ile KYD tetiklenmiş, bu sırada elektrofizyolojik olarak DA potansiyel kaydı yapılmıştır. 5 dk sonra fareler sakrifiye edilmiştir. Kardiyak yolla % 0,4'lük heparin ve % 4'lük PFA ile perfüze edilerek çıkarılan beyinler yukarıda bahsedildiği şekilde muamele edilmiş ve PI pozitif hücreler sayılmıştır.

3.5. İmmünohistokimyasal Boyamalar

KYD'nin tetiklediği moleküler yolları incelemek üzere ayrı bir deney grubunda PI verilmeksizin KYD oluşturulmuş ve çıkarılan beyinler gerekli işlemlerden geçirilip çeşitli immünohistokimyasal işaretlemeler kullanılmıştır (n=4). Bunun için bazı kesitlerde nöron ve astrositlerde nükleer HMGB1'in sitoplazmaya ve NF- κ B'nin sitoplazmadan nükleusa translokasyonu incelenmiştir. Farede iğne batırılarak KYD tetiklenmiş, 5 dk ve 30 dk sonra kardiyak yolla % 0,4 heparin ve % 4 paraformaldehit ile perfüze edilmiştir. Çıkarılan beyinler 24 saat süre ile oda sıcaklığında % 4'lük paraformaldehit ve ardından 48 saat boyunca % 30'luk sukroz solüsyonunda +4 °C'de bekletilerek kriyoproteksiyon sağlanmıştır. Daha sonra kriyomikrotomda (Leica CM 1100) beyin dokularından korpus kallozumdan geçen 20 μ m'lik koronal kesitler alınmıştır. Kesitler önce fosfat tamponlu salinde (PBS, pH=7,4), oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiş, ardından PBS ile % 10 sulandırılmış normal keçi serumunda oda sıcaklığında 10 dk bloke edilmiştir. Ardından kesitler tavşan poliklonal HMGB1 (1:200, Abcam, İngiltere) veya tavşan poliklonal NF- κ B (1:200, Abcam, İngiltere) primer antikoları ile bir gece, +4 °C'de muamele edilmiştir. Ertesi gün 3 kez 5'er dk PBS'de bekletilip, keçi anti-tavşan Cy2 antikoru (1:200, Jackson ImmunoResearch, ABD) ile oda sıcaklığında, 90 dk inkübe edilmiş, böylece

sekonder işaretleme yapılmıştır. Kesitler PBS ile 3 kez 5'er dk yıkanmış ve Hoechst-33258 ve 25 mg/ml sodyum azid içeren gliserol/PBS solüsyonu ile kapatılmıştır.

Bazı kesitlerde NeuN (1:200, Chemicon, ABD) ve ALDH1L1 (1:150, Abcam, İngiltere) ile ikili boyamalar yapılmıştır. Kısaca HMGB1 veya NF- κ B primer antikorları ile işaretlenen kesitler PBS ile 3 kez 5'er dk yıkandıktan sonra fare monoklonal NeuN veya ALDH1L1 antikorları ile bir gece +4 °C'de bekletilmiştir. Ertesi gün PBS ile 3 kez 5'er dk yıkanan kesitler keçi anti-tavşan Cy3 (1:200, Jackson Immunoresearch, ABD) antikoru ile oda sıcaklığında 90 dk inkübe edilmiş böylece ikinci sekonder işaretleme yapılmıştır. İmmünoreaktivitenin özgüllüğünü test etmek üzere primer antikör devre dışı bırakılarak blokaj solüsyonu veya PBS uygulanmıştır. Daha sonra kesitler uygun filtreler kullanılarak floresan mikroskopta (Nikon Eclipse E600) değerlendirilmiştir. Yeşil floresan için eksitasyon 450-490 nm, emisyon 520 nm; kırmızı floresan için eksitasyon 510-560 nm, emisyon 590 nm; mavi floresan için eksitasyon 330-380 nm, emisyon 420 nm olan filtreler kullanılmıştır.

3.6. Mast Hücrelerinin Boyanması ve Sayımı

KYD'nin dura materdeki etkilerini incelemek üzere ayrı bir grup deneyde, iğne batırılması ile KYD oluşturulmuş ve 30 dk sonra fare kurbanı edilmiştir. Ayrıca CBX (400 ng, i.s.v.) uygulaması sonrasında da mast hücrelerinin durumu incelenmiştir. Bu deney düzeninde KYD grubu, KYD oluşturulmayan yalancı uygulama grubu ve CBX verilen grup çalışılmıştır. Her grupta üçer fare kullanılmıştır. Deney sonunda kardiyak yoldan % 0,4'lük heparin ve % 4'lük paraformaldehit solüsyonları ile perfüze edilen farenin kafatası kesilip % 4'lük paraformaldehit solüsyonunda bir gece +4 °C'de bekletilmiştir. Ertesi gün hem KYD tarafı ve hem de karşı taraftaki dura mater ayrı ayrı diseke edilmiş ve 3 kez 10'ar dk PBS'te (pH=7.4) yıkanmıştır. Ardından metilen mavisi (1g/mL distile suda) ile oda sıcaklığında 1-2 dk inkübe edilmiş ve dura mater parçaları distile suda yıkanmıştır. Lam üzerine alınan kesitler daha sonra her birinde 10'ar dk kalmak üzere % 70, % 96, %

100'lük alkol gradiyentinden geçirilerek dehidrate edilmiş ve ksilende 10 dk bekletildikten sonra Entellan (Merck, Almanya) ile kapatılmıştır. Mast hücreleri metilen mavisi ile mavi veya mora çalan renkte boyanmaktadır. Işık mikroskobunda X1000'lük büyütmede KYD tarafındaki ve karşı taraftaki dura materde 100'er adet mast hücresi sayılmıştır. Granülleri sitoplazmada olan ancak saçılmış halde ve soluk mavi renkte görünen veya granülleri hücre membranının dışına taşmış olan mast hücrelerinin degranüle olduğu kabul edilmiştir.

3.7. Hücre Altı Bölümleme ve Western Blotlama

NF- κ B'nin sitoplazmadan nükleusa geçişi, immünohistokimyasal boyamaların yanında, hücre altı bölümleme sonrası yani nükleus sitoplazma ayırımı yapılarak Western blotlama yöntemi ile incelenmiştir. Bunun için, her grupta 3'er hayvan olmak üzere, üç grup çalışılmıştır: hiç işlem yapılmamış grup, karbenoksolon grubu ve yalancı uygulama grubu (karbenoksolonun çözücüsü olan distile su enjekte edilmiştir).

Fareler iğne batırılması ile KYD tetiklendikten 30 dk sonra kardiyak yolla % 0.4'lük heparin içeren solüsyon ile perfüze edilmiş ve beyin hızla çıkarılarak kuru buz üzerinde KYD tarafındaki korteks ayrılmış ve Western blotlama yapılana kadar -80°C 'de saklanmıştır. Hücre altı bölümleme Schreiber ve arkadaşlarının tanımladıkları yöntemle yapılmıştır (108). Sitoplazmik ve nükleer bölümler iki farklı tampon solüsyonu kullanılarak ayrılmıştır. Tampon A: 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, % 0.05 NP40, pH 7.9; Tampon B: 5 mM HEPES, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, % 26 gliserol, pH 7.9. Dokular buz üzerinde proteaz ve fosfataz inhibitörleri eklenmiş olan 500 μL tampon A solusyonu içinde sonikatör ile homojenize edilmiştir (Ultrasonic cell disrupter; Bandelin sonopuls, HD2070). Elde edilen karışım $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 1000 X g hızda 10 dk santrifüj edilmiş ve sitoplazmik bölümü içeren üst faz ayrılmıştır. Nükleer bölümleme için, kalan çökelek buz üzerinde proteaz ve fosfataz inhibitörleri eklenmiş olan 374 μL tampon B ve 26 μL , 4,6 M NaCl çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Tekrar homojenize edilmiş olan çökelek 30

dk süresince buz üzerinde tutulmuş ve 4°C’de 24000 X g hızda 20 dk santrifüj edilmiştir. Sitoplazmik ve nükleer protein konsantrasyonları BCA protein tahlil kiti (Pierce, ABD) ile saptanmıştır. Eşit miktarda protein % 4-12 sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jele (% 4-12 SDS-PAGE) (Invitrogen, ABD) yüklenmiş ve ardından “Polyvinylidene fluoride” (PVDF) membranlara (Invitrogen, ABD) yarı kuru transfer metodu ile nakledilmiştir. Özgül olmayan protein bağlanmasını önlemek üzere PVDF membranlar 1 saat boyunca %3’lük TBS-T içindeki sığır serum albümin (BSA) solüsyonunda bekletilmiştir. Daha sonra membranlar tavşan poliklonal NF-κB antikoru (1:200, Santa Cruz, ABD) ile gece boyu 4°C’de inkübe edilmiştir. % 0.1’lik Tris tamponlu serum fizyolojik-Twin 20 (TBS-T) solüsyonu ile üç kez 10’ar dk yıkanan membranlar “horseradish” peroksidaz (HRP)-bağlı anti-tavşan IgG sekonder antikoru (1:3000, Cell Signaling, ABD) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Protein bantları kemilüminesan (Super Signal West-Femto; Pierce, ABD) kullanılarak görünür hale getirilmiştir. Sitoplazmik bölüm bantları beta-aktin (Sigma, ABD) ile ve nükleer bölüm bantları ise histon 3 (Cell Signaling, ABD) ile normalize edilmiştir. Görüntüler Kodak 4000 MM görüntü istasyonunda alınmıştır. Sinyallerin analizi için yine aynı cihazın Moleküler Görüntüleme Yazılımı (Carestream Molecular Imaging Software, Standard Edition, ABD) kullanılmıştır.

3.8. İstatistiksel Yöntemler

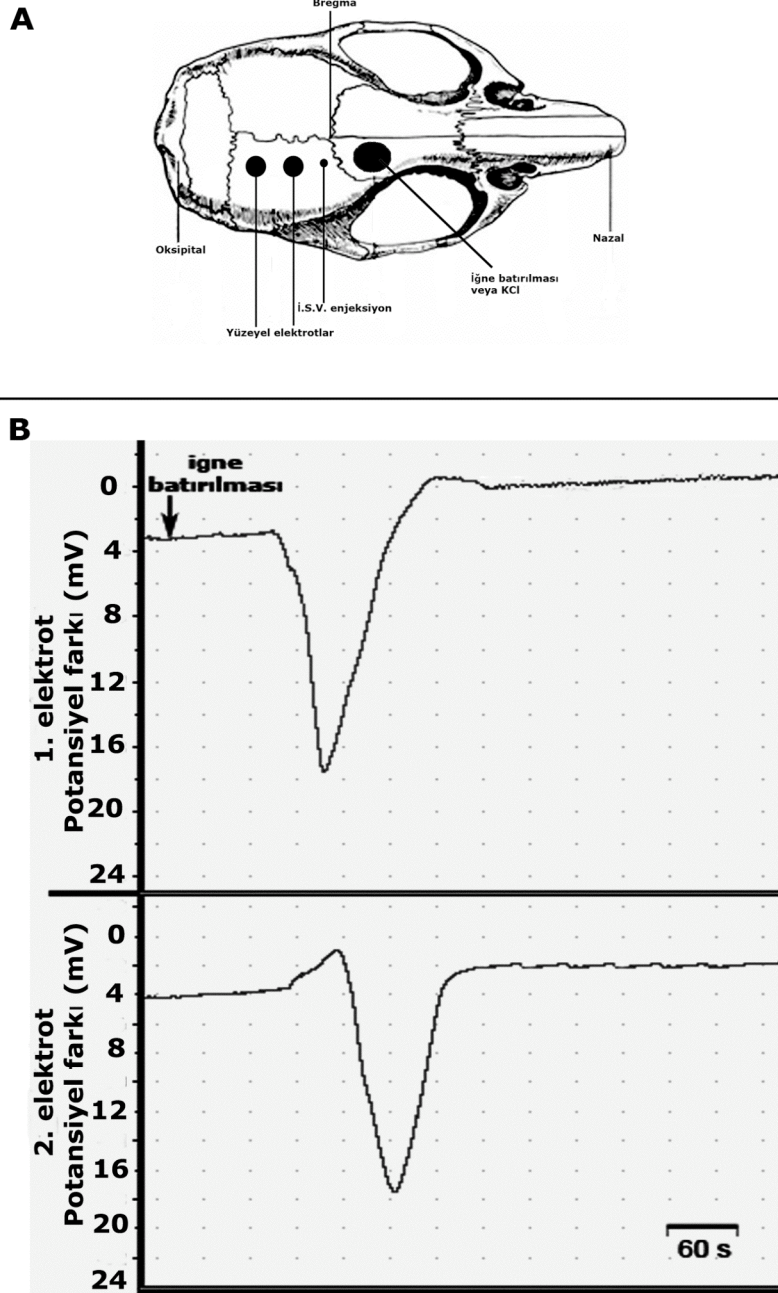
Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir (ort $\pm$ sh). PI pozitif hücre sayıları, degranüle mast hücre oranları ve Western blotlama ölçümleri Kruskall-Wallis testi ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel anlamlılık varsa gruplar daha sonra Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

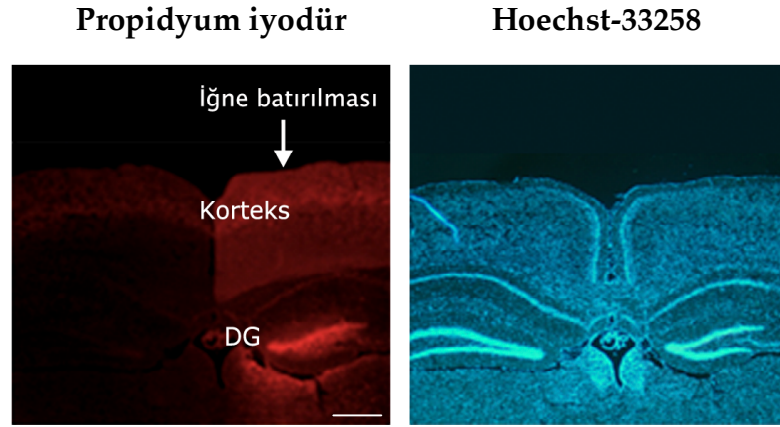
4.1. Kortikal Yayılan Depresyon Panx-1 Kanallarının Açılmasını Tetikler

Propidium iyodür hücre membranından geçemeyen floresan bir boyadır ancak düşük moleküler ağırlığı olması nedeniyle Panx-1 gibi mega kanallardan hücre içine girebilir (21). Buradan yola çıkarak KYD'nin nöronal veya glial mega kanalların açılmasına neden olup olmadığını test etmek için KYD tetiklenmesinden 2 dk önce i.s.v. yolla PI enjeksiyonu yapıldı. KYD'ler ekstrakraniyal elektrofizyolojik kayıtlama ile kaydedildi. Şekil 4.1'de deney düzeneğinin şematik görünümü ve elektrofizyolojik kayıtlama örneği yer almaktadır. KYD tetiklenmeyen grupta ventriküler boyanma dışında hücrelere PI girişi saptanmamıştır (n=6 fare) (109).

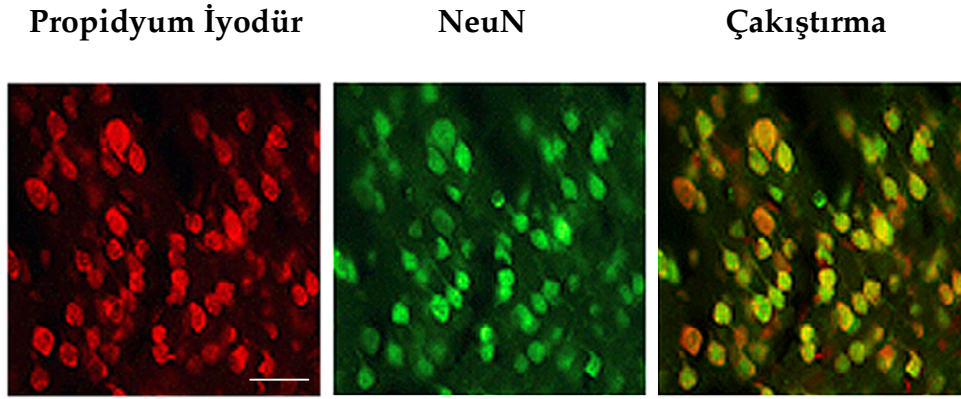
İğne batırılması ile oluşturulan tek KYD veya topikal KCl uygulaması ile oluşan çoklu KYD dalgaları kortekste yaygın PI pozitifliğine neden olurken kontrol beyinlerinde ve KYD'nin karşı hemisferinde hücrelere minimal PI girişi saptanmıştır (n=12 fare) (Şekil 4.2). PI pozitif hücreleri karakterize etmek üzere NeuN boyaması yapılmış ve PI pozitif hücrelerin % 95 ± 3 'ünün NeuN ile boyandığı görülmüştür (Şekil 4.3). Beraberinde astrosit işaretleyicisi olarak kullanılan Aldh1L1 (70) ile de immünfloresan boyama yapılmış ve PI pozitifliğinin komşu fibriler veya protoplazmik astrositlerde olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.1. Deney düzeneğinin şematik görünümü (A) ve KYD dalgası örneği (B). B. Ekstrakraniyal iki elektrot ile yapılan kayıtlamada KYD oluşumunun elektrofizyolojik olarak potansiyel farkı (mV) ile gösterilmesi. Anestezi altında ve stereotaksi çerçevesine yerleştirilmiş olan farede intraserebroventriküler PI enjeksiyonu yapıldıktan 2 dk sonra iğne batırılması (ok) ile KYD dalgası tetiklenmiştir.

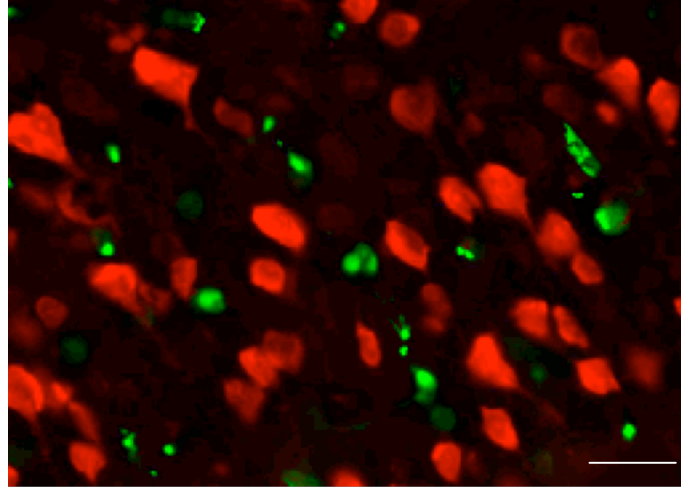


Şekil 4.2. KYD'den 5 dk sonra ipsilateral korteks ve dentat girusta (DG) PI pozitifliği. Hoechst-33258 boyaması ile kortikal ve hipokampal tabakalar görülmektedir. Görüntü 40'lık büyütmede alınmıştır. Skala 500 μm .



Şekil 4.3. PI pozitif hücrelerin karakterizasyonu-1. PI pozitif hücreleri karakterize etmek üzere NeuN boyaması yapılmış ve bu hücrelerin % 95 ± 3 'ünün NeuN ile boyandığı görülmüştür. Skala 100 μm .

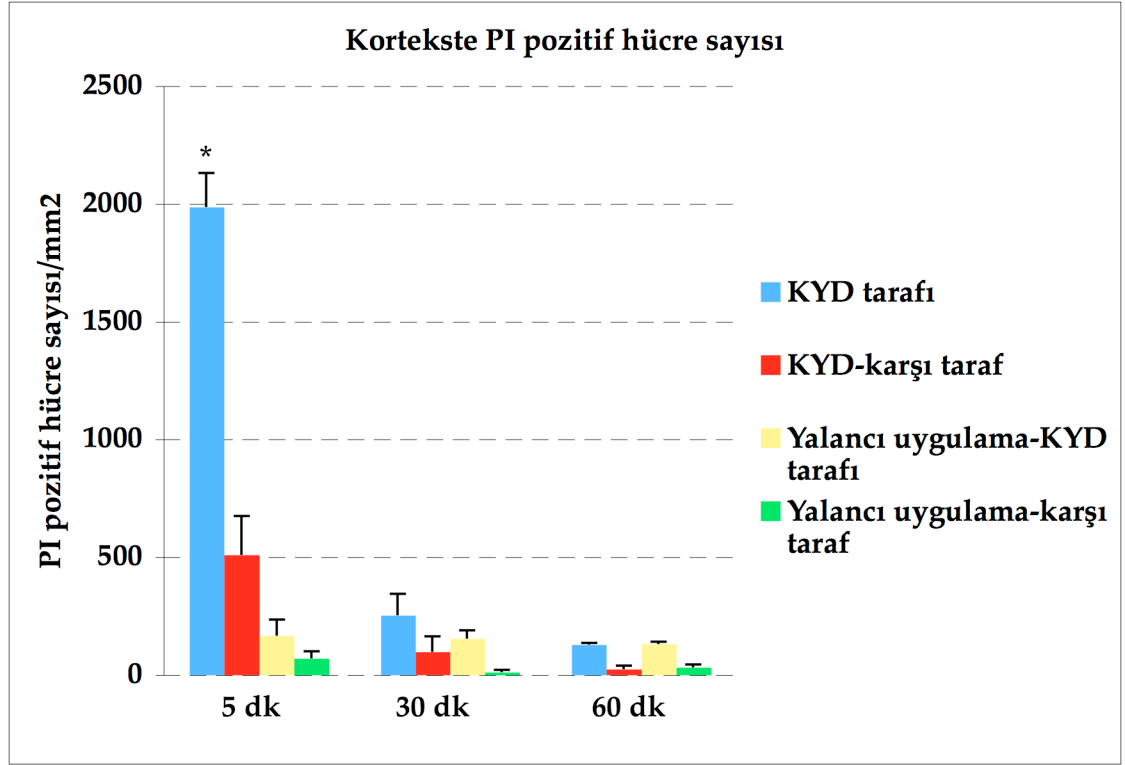
Propidyum iyodür+Aldh1L1



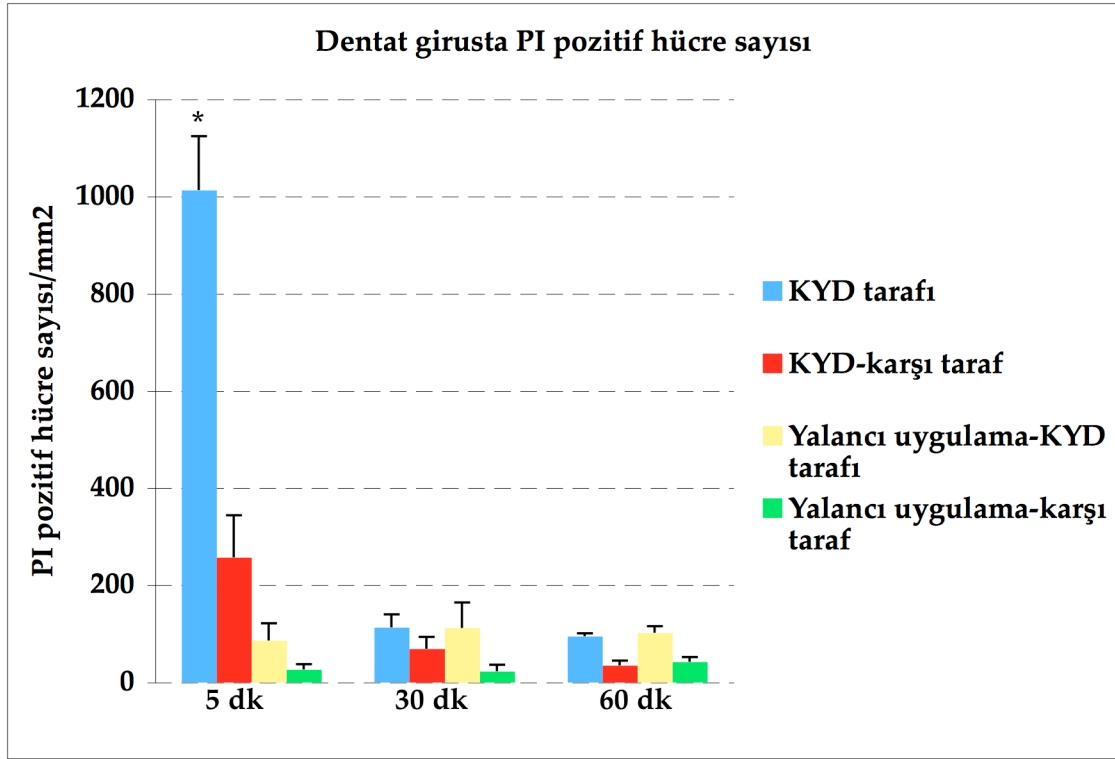
Şekil 4.4. PI pozitif hücrelerin karakterizasyonu-2. Protoplazmik ve fibriler astrosit işaretleyicisi olarak kullanılan Aldh1L1 (yeşil) ile yapılan immünofloresan boyama. Bu boyamada PI (kırmızı) ile işaretlenen hücrelerin astrositlerle örtüşmediği görülmektedir. Skala 100 μm .

Nöronlara PI girişinin zamansal değişimi de incelenmiş ve KYD tetiklenmesinden 5, 30 ve 60 dk sonra fareler sakrifiye edilmiştir. Her grupta 6'şar Swiss albino fare kullanılmıştır. Bu deneyler sonucunda, KYD'den 5 dk sonra PI işaretlenmesinin en fazla olduğu, 30. dk'da belirgin olarak azaldığı ve 1 saat içinde ise büyük oranda kaybolduğu görülmüştür (Şekil 4.5). PI pozitifliğinin sadece korteksle sınırlı olmadığı aynı zamanda dentat girusta da benzer şekilde işaretlenme olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6).

Bu çalışmada Swiss albino fare soyu kullanılmıştır. Nöronlara PI girişinin fare soyları arasında farkedip etmediğini incelemek üzere C57/Bl6 ve SV129 farelerinde de iğne batırılarak KYD tetiklenmiş ve PI pozitifliği incelenmiştir (n=4 fare). C57/Bl6 farelerinde kortekste PI pozitif hücre sayısının $1033 \pm 108 / \text{mm}^2$ ve SV129 farelerinde $1260 \pm 120 / \text{mm}^2$ olduğu ve Swiss albino fare grubundan farklı olmadığı saptanmıştır.

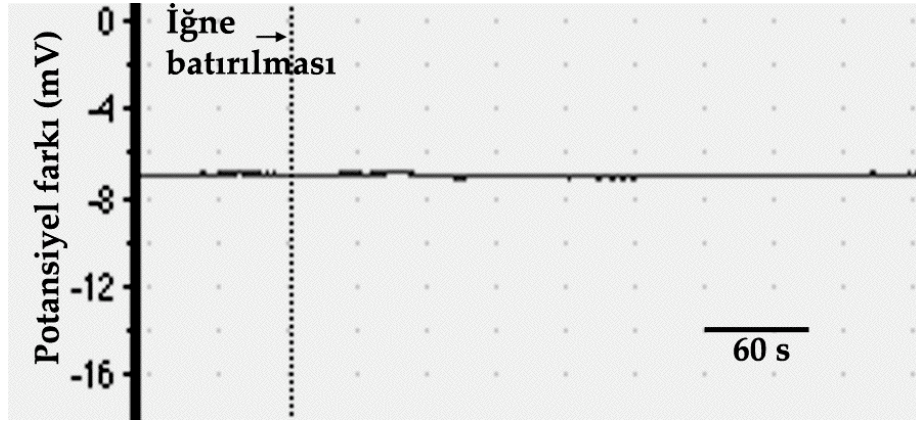


Şekil 4.5. Kortekste PI pozitif hücre sayısı. İntraserebroventriküler PI enjekte edildikten sonra iğne batırılması ile KYD indüklenen deney grupları ve indüklenmeyen kontrol gruplarında PI pozitifliği. KYD indüklenen gruplarda PI pozitifliğinin 5. dk'da maksimum olduğu, 30. dk'da istatistiksel olarak anlamlı biçimde azaldığı ve 60.dk'da neredeyse kaybolduğu görülmektedir ($p<0.05$). * 5 dk'da KYD tarafındaki PI pozitifliğinin karşı taraftan, yalancı uygulama grubundan ve 30 dk ile 60 dk gruplarından istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir. Değerler $\text{ort} \pm \text{sh}$ olarak verilmiştir.

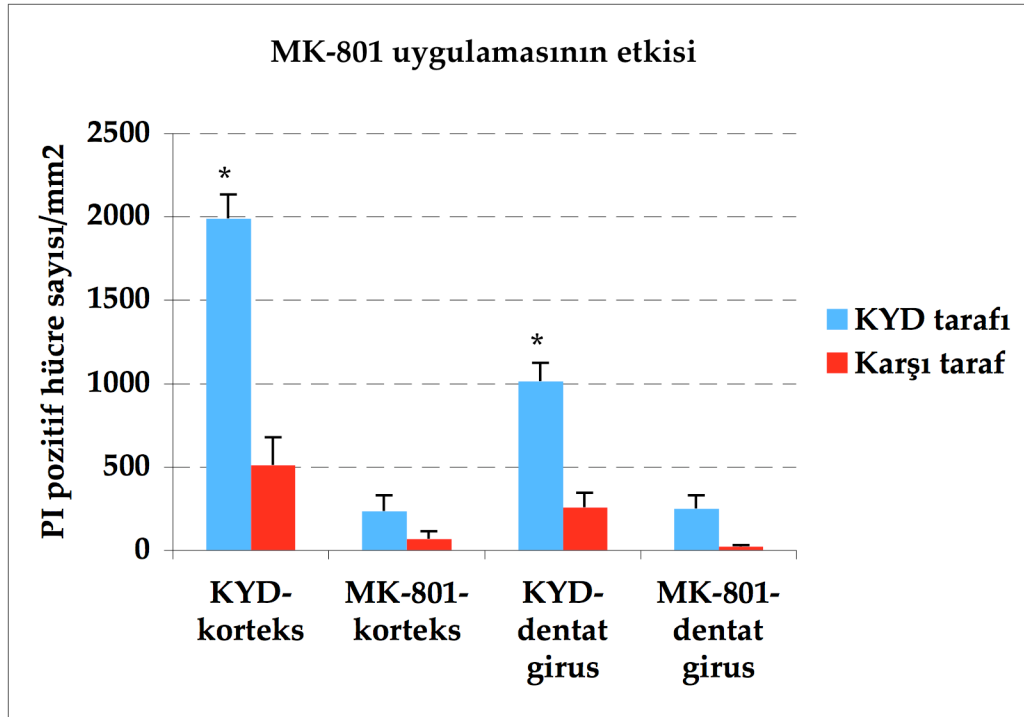


Şekil 4.6. Dentat girusta PI pozitif hücre sayısı. PI pozitifliğinin dentat girusta kortekse paralel biçimde, hem karşı taraf ve hem de yalancı uygulama grubuna göre belirgin olarak arttığı ve bu etkinin 5. dk'da en fazla olduğu, zamanla da azaldığı görülmüştür ($p < 0.05$). * 5 dk'da KYD tarafındaki PI pozitifliğinin karşı taraftan, yalancı uygulama grubundan ve 30 dk ile 60 dk gruplarından istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir. (ort $\pm$ sh).

PI ile işaretlenmenin en fazla olduğu zaman noktasının 5 dk olduğu bulgusundan yola çıkarak, bundan sonra farmakolojik ajan verilerek yapılan deneylerde sadece 5. dk'da PI sayımları yapılmıştır. Nöronal PI pozitifliğinin PI enjeksiyonuna veya iğne batırılmasına bağlı bir travmadan kaynaklanmadığını, KYD'ye bağlı olduğunu test etmek üzere seçici olmayan bir NMDA reseptör antagonisti olan MK-801'nin topikal olarak uygulandığı 4 farede deney yapılmıştır. MK-801 uygulaması sonrası KYD'nin oluşmadığı (Şekil 4.7) ve nöronlara PI girişinin de anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. MK-801 ile elektrofizyolojik kayıt örneği. Topikal MK-801 uygulamasının ardından yapılan iğne batırılması ile ekstrakraniyal DA kayıtlamada KYD oluşmadığı görülmektedir.



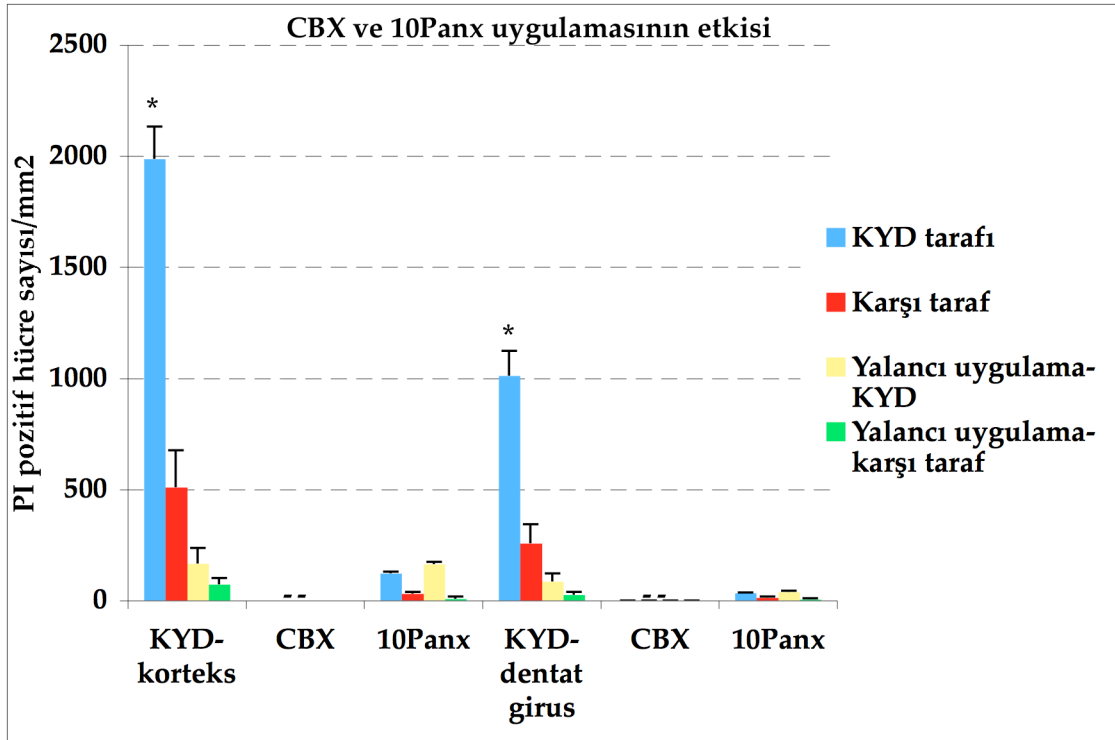
Şekil 4.8. MK-801 uygulamasının PI pozitifliğine etkisi. MK-801 uygulaması sonrası hücrelere PI girişinin sadece KYD uygulanan gruba göre hem kortekste ve hem de dentat girusta istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (n=4) ($p < 0.05$) * KYD ile MK-801 gruplarının istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir (ort $\pm$ sh).

PI pozitifliğinin plazmalemma yırtılması nedeniyle oluşan membran geçirgenliğinde seçici olmayan bir artış sonucu olup olmadığını incelemek üzere FITC-dekstran-70S kullanılmıştır. FITC-dekstran-70S yüksek moleküler ağırlıklı (77 kDa) bir floroprobudur. Deneyden bir gün önce lateral ventriküle yerleştirilen polietilen kanülden FITC-dekstran-70S (0.5 μ L, 5 mg/mL serum fizyolojik içinde) enjekte edilmiştir. Bunun için 3 fare kullanılmış, ikisine sadece FITC-dekstran-70S, birisine ise hem FITC-dekstran-70S hem de PI enjekte edildikten sonra iğne batırılması ile KYD indüklenmiştir. 5 dk sonra fareler sakrifiye edilip beyinleri çıkarılmış, alınan koronal kesitler Hoechst-33258 ile kapatılıp floresan mikroskopta değerlendirilmiştir. Kesitlerde KYD sonrası yüksek moleküler ağırlıklı FITC-dekstran-70S işaretlenmesinin olmadığı ancak PI verilen farelerde PI pozitifliği görülmüştür. Bu da bize nöronlara PI girişinin plazma membranındaki ozmotik yırtılma sonucu olmadığını göstermiştir.

KYD indüklenmesi ile PI pozitifliğinin nasıl oluştuğunu ise şöyle açıklayabiliriz: Küçük moleküler ağırlığı olan PI'nın floresan mikroskopta ışıması için hem hücre membranından ve hem de nükleer membrandan geçip nükleik asitlere bağlanması gerekmektedir. Öyle ise KYD plazma membran bütünlüğünü bozmadan, mega kanalların geçirgenliğini artırarak PI pozitifliğine yol açıyor olabilir. Bu öngörümüzü test etmek üzere plazma membranında bulunan Panx-1 isimli oluklu bağlantı proteini hedef olarak seçilmiştir. Panx kanalları mega gözenekli iyon kanallarıdır ve iletkenlikleri oldukça fazladır. Bu kanalların fonksiyonlarını incelemek üzere inhibitörleri kullanılmıştır. Bunun için Panx kanal blokörü olan CBX ile deneyler yapılmıştır. Yalancı uygulama olarak CBX'in çözücüsü yani distile su verilmiştir. Deney sırasında elektrofizyolojik kayıt da alınmıştır. Fare beyninden alınan koronal kesitler Hoechst-33258 ile boyanıp PI pozitif hücreler sayılmıştır. Karbenoksolon uygulanan deneylerde elektrofizyolojik olarak KYD kaydedilmiş, ancak sonrasında doku kesitleri incelendiğinde PI pozitifliğinin tamamen baskılandığı görülmüştür (Şekil 4.9). PI enjeksiyonunun doğruluğu ventrikül içindeki PI boyanması ile doğrulanmıştır. Çözücü verilen grupta ise

yaygın PI pozitifliği saptanmıştır. Bu veriler PI'nın pannexin kanallarından hücre içine girdiğini desteklemektedir.

Ancak CBX sadece Panx-1 kanallarına özgül olmayan bir blokördür. Bunu bertaraf etmek üzere Panx-1 kanalının seçici inhibitörü olan $^{10}\text{Panx}$ kullanılmıştır. $^{10}\text{Panx}$, Panx-1 kanalını seçici olarak inhibe eden bir peptittir. Peptid olması nedeniyle $^{10}\text{Panx}$ doğrudan kortekse enjekte edilmiştir. $^{10}\text{Panx}$ 'in intrakortikal enjeksiyonu sonrası bir önceki bölümde anlatıldığı gibi yapılan deneyler sonucunda KYD'nin oluştuğu ancak PI pozitifliğinin önemli oranda baskılandığı görülmüştür. Aynı miktarda çözücü enjeksiyonu ise nöronlara PI girişini değiştirmemiştir (n=3 fare/grup) (Şekil 4.9).



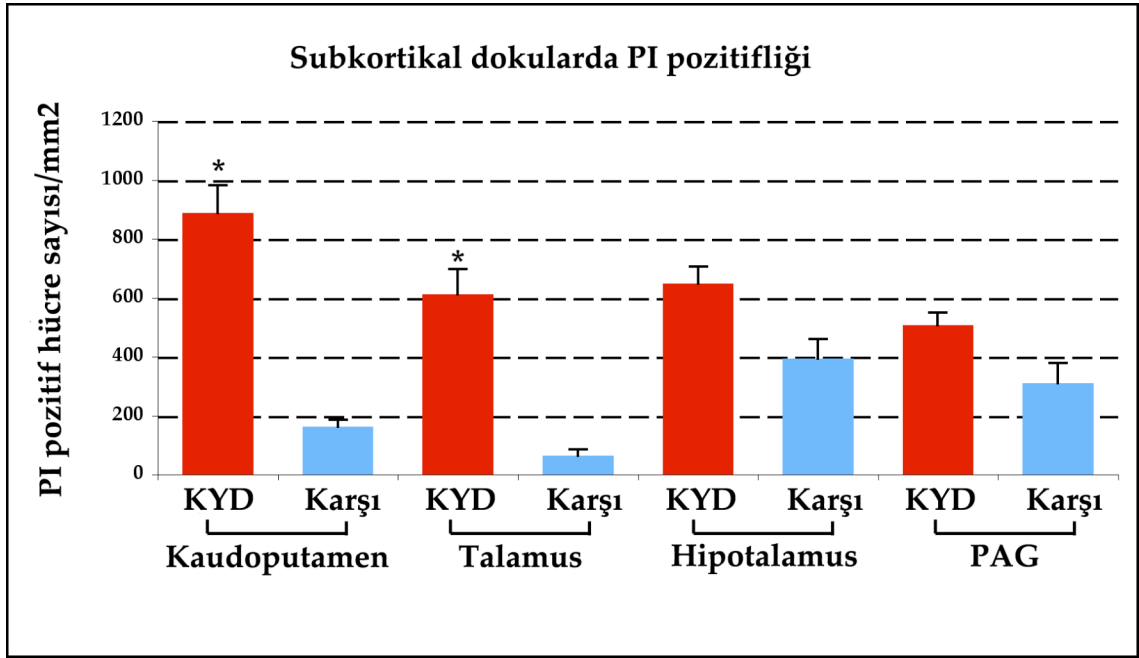
Şekil 4.9. CBX ve $^{10}\text{Panx}$ 'in PI pozitifliği üzerine olan etkisi. KYD'den 5 dk sonra sakrifiye edilen farelerin beyinlerinden elde edilen kesitlerde CBX uygulaması ile tam bir baskılanma olduğu görülmüştür (n=3/grup) ($p<0.05$). $^{10}\text{Panx}$ verilen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde ve önemli oranda bir baskılanma olduğu saptanmıştır (n=3/grup) ($p<0.05$). * 5 dk'da PI pozitifliği CBX ve $^{10}\text{Panx}$ gruplarından istatistiksel olarak farklıdır (ort $\pm$ sh).

Pannexin kanalları dışında oluklu bağlantılar da (gap junction) PI geçmesinden sorumlu olabilir. Bu amaçla oluklu bağlantıları inhibe ettiği bilinen izofloran anestezisi ile yapılan deneylerde, fare beyinlerinde PI ile işaretlenmenin değişmediği saptanmıştır. Kortekste PI pozitif hücre sayısı 1120 ± 80 /mm² ve dentat girusta 1013 ± 78 /mm² olarak saptanmıştır.

Bu inhibisyon deneyleri sonucunda KYD'nin nöronal Panx-1 kanallarında geçici bir açılmaya neden olduğu, bu açılmanın CBX ve ¹⁰Panx ile önlenemediği ve bunun KYD baskılanması veya oluklu bağlantıların blokajı ile ilgili olmadığı gösterilmiştir.

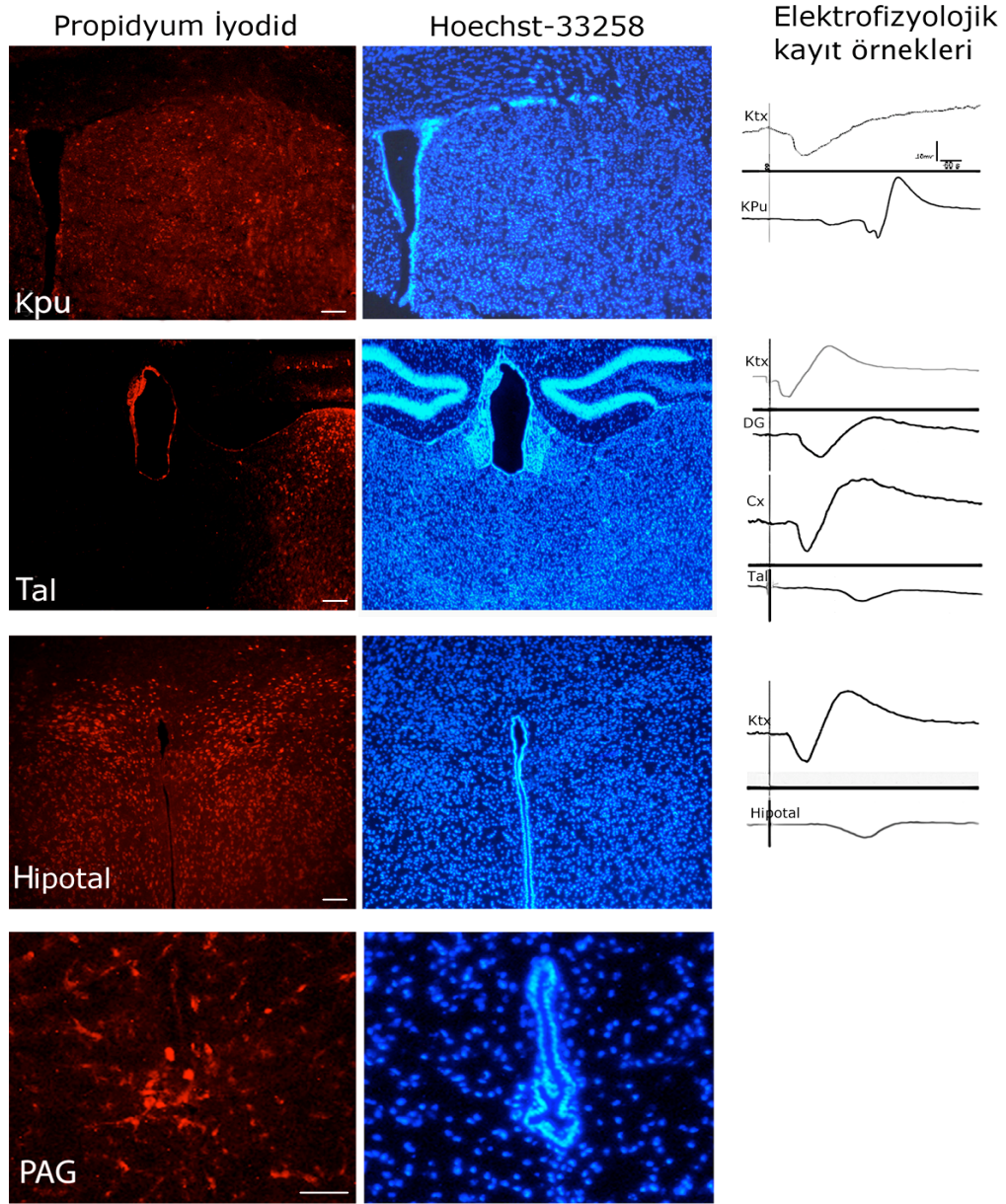
4.2. Kortikal Yayılan Depresyona Bağlı Propidyum İyodür İşaretlenmesinin Saptandığı Anatomik Bölgeler

PI pozitif hücrelerin anatomik lokalizasyonlarını belirlemek üzere, iğne batırılması ile tetiklenen tek KYD sonrası elde edilen seri kesitlerden PI pozitif hücreler sayılmıştır. PI pozitifliğinin ipsilateral korteks yanında ipsilateral dentat girus (Şekil 4.10) ve talamus, kaudaputamen gibi subkortikal yapılarda da olduğu görülmüştür. Aynı zamanda hipotalamus ve periaquaduktal gri maddede bilateral PI işaretlenmesi saptanmıştır (Şekil 4.10). Bu deneylerde PI enjeksiyonunun oluşturabileceği mekanik travmayı en aza indirmek üzere deneyden bir gün önce karşı lateral ventriküle polietilen kanül yerleştirilmiştir. Deney sırasında kanülden PI enjekte edilmiş ve karşı hemisferde KYD tetiklenmiştir. PI pozitifliğinin en fazla olduğu 5. dk'da fareler sakrifiye edilmiştir (n=6). Her deneyde iğne batırılmayan karşı taraf korteks kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.10. Subkortikal dokularda PI pozitif hücre sayısı. Kanülden PI verilip iğne batırılması ile tetiklenen KYD'den 5 dk sonra PI pozitif nöronların saptandığı subkortikal yapılar görülmektedir. Her bölge, KYD olmayan karşı hemisfer ile karşılaştırılmıştır. Kaudoputamen ve talamusta KYD tarafı ile karşı taraf arasında anlamlı fark ($p < 0.05$) varken hipotalamus ve periaquaduktal gri (PAG) maddede iki taraflı PI pozitifliği saptanmıştır ($n=6$ /grup). * PI pozitifliği KYD tarafında karşı taraftan istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklıdır. Değerler $\text{ort} \pm \text{sh}$ olarak verilmiştir.

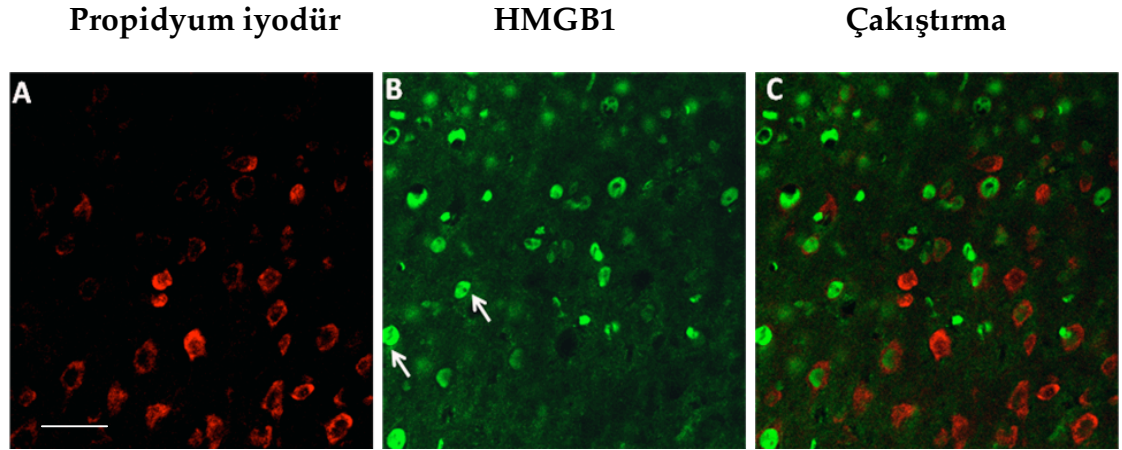
Ayrı bir deney grubunda subkortikal PI işaretlenmesinin elektrofizyolojik karşılığının olup olmadığını test etmek üzere hem korteks ve hem de subkortikal yapılardan eş zamanlı kayıt alınmıştır. Bunun için kortekse yerleştirilen tungsten kayıt elektrodu ile birlikte her biri farklı bir sette olmak üzere dentat girusa, talamusa, kaudoputamene ve hipotalamusa elektrot indirilmiş ve iğne batırılması ile KYD tetiklenmiştir. KYD'den 52-76 saniye sonra subkortikal yapılarda direkt akım kaymasının olduğu görülmüştür ($n=6$). Şekil 4.11'de PI pozitif hücrelerin saptandığı anatomik bölgelerden alınan örnek resimler ile elektrofizyolojik kayıt örnekleri yer almaktadır.



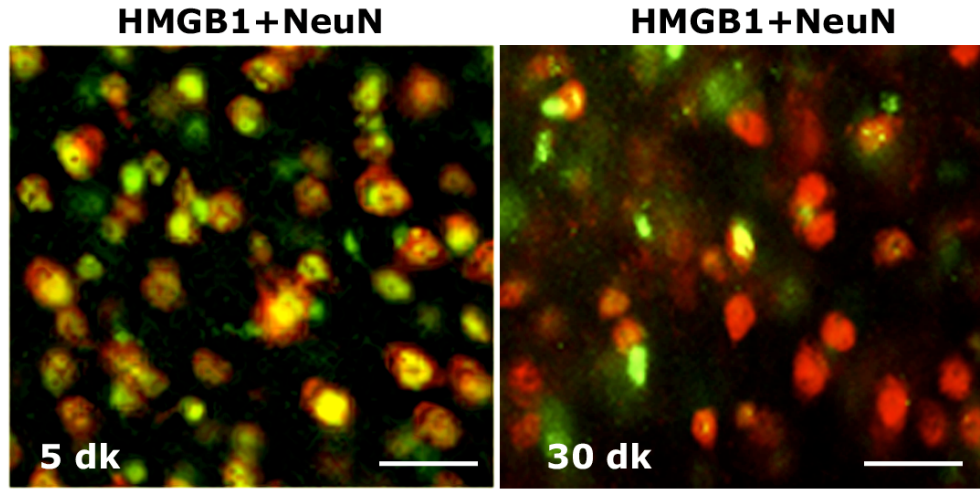
Şekil 4.11. Subkortikal dokularda görülen PI pozitifliği ve elektrofizyolojik kayıt örnekleri. Periaquaduktal gri madde ve hipotalamustaki bilateral boyanma dikkat çekicidir. Diğer bölgelerdeki PI işaretlenmesi KYD ile ipsilateral taraftadır. Hoechst-33258 boyaması ile anatomik detaylar izlenmektedir. Sağdaki kolonda korteks ile dentat girus (dg), kaudoputamen (Kpu), talamus (Tal) ve hipotalamustan (hipotal) eş zamanlı alınan DA potansiyel örnekleri görülmektedir (n=6). Ktx: Korteks. Skala 200 μ m.

4.3. Kortikal Yayılan Depresyon Nöronlardan HMGB1 Salınımını Tetikler

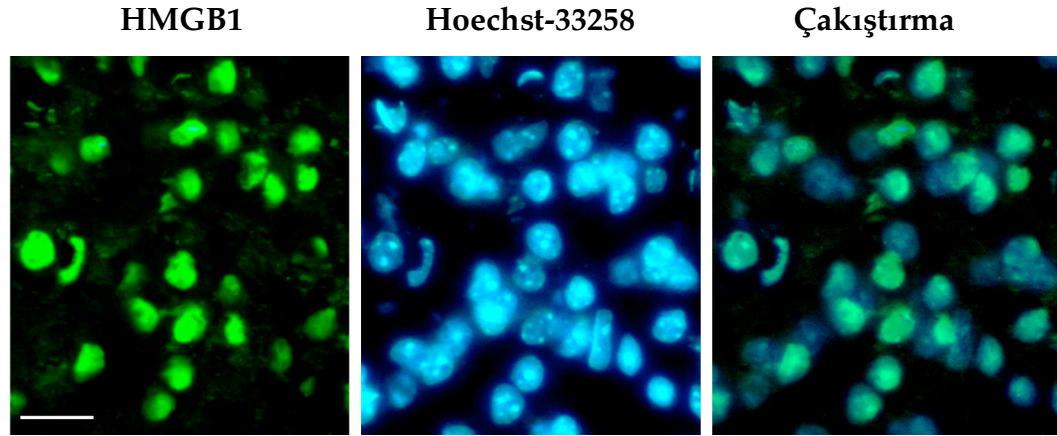
HMGB1 inflamasyonun geç döneminde ortaya çıkan nükleer bir proteindir. Bu çalışmada KYD sonrasında nöronlardan proinflamatuvar bir mediyatör olan HMGB1'in salıverildiği immünokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir. Bu kesitlerde PI pozitif olan nöronların bazılarında HMGB1'in yüzük şeklinde sitoplazmik boyandığı bazılarında ise hiç HMGB1 immünopozitifliği olmadığı ancak bunların çevresinde çamurumsu bir boyanma olduğu görülmüştür. PI negatif nöronlarda ise nükleer HMGB1 immünopozitifliği saptanmıştır. Böylece KYD'nin neden olduğu PI işaretlenmesi görülen kortikal ve subkortikal nöronlarda, HMGB1'in önce nükleustan sitoplazmaya göç ettiği ardından da hücreden ekstrasellüler mesafeye salındığı düşünülmüştür. KYD'den 5 dk sonra PI pozitif hücrelerin % 96 ± 2 'sinin HMGB1 pozitif olduğu, ancak 30 dk sonra sadece % 53 ± 2 'sinde kaldığını ve bunların çoğunun perinükleer HMGB1 immünopozitivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.12). Bu da bize KYD sonrası HMGB1'in aktive olduğunu ve önce sitoplazmaya geçtiğini oradan da intersitisyuma çıktığını düşündürmektedir. Çünkü HMGB1 fizyolojik koşullarda nükleusta yerleşen ancak bir uyarı ile ekstrasellüler matrikse yer değiştiren bir proteindir (74). Nitekim etkilenmemiş bölgelerde veya hiç işlem görmemiş fare beyinlerinden alınan kesitlerde, NeuN pozitif hücrelerde yani nöronlarda HMGB1'in nükleusta lokalize olduğu saptanmıştır. NeuN boyaması ile birlikte HMGB1 immünoreaktivitesine zamansal olarak bakıldığında KYD sonrası nöronal nükleusların 30 dk içinde HMGB1 immünopozitifliklerini kaybettikleri görülmüştür (Şekil 4.13). CBX uygulaması ise nöronlara PI girişini inhibe ettiği gibi HMGB1'in sitoplazmaya ve hücre dışına göçünü de baskılamıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.12. PI pozitif hücrelerde HMGB1 boyaması. KYD'den 30 dk sonra bazı hücrelerin PI pozitif oldukları (A, kırmızı), bu hücrelerde HMGB1'in nükleustan sitoplazmaya oradan da intersitisyuma boşaldığı (B, yeşil) PI ile kolokalize olmamasından anlaşılmaktadır (C). Membran bütünlüğünü kaybetmeyen (PI negatif) hücrelerde HMGB1'in nükleer yerleşimli olduğu görülmektedir (B, ok). Skala 100 μ m.



Şekil 4.13. HMGB1 immüno pozitif hücrelerin karakterizasyonu. KYD sonrası nöronal nükleuslar (NeuN ile işaretlenmiştir, kırmızı) 30 dk içinde HMGB1 (yeşil) immüno pozitifliklerini kaybederler. Skala 100 μ m.

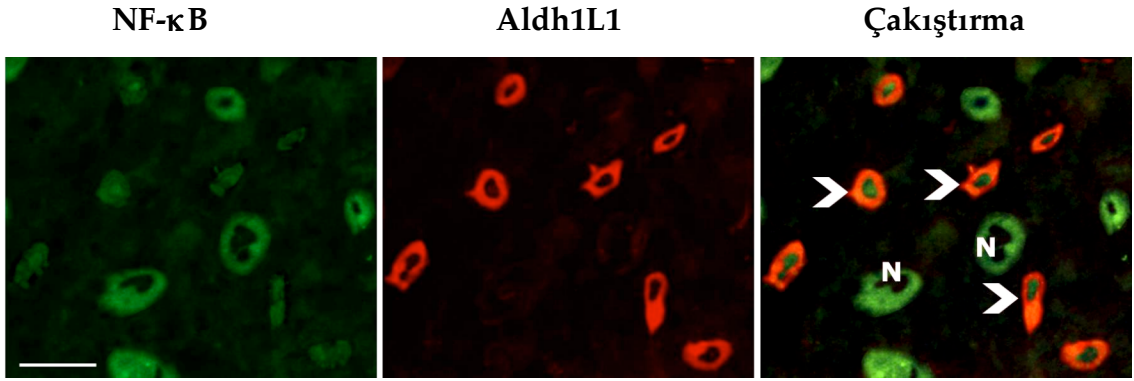


Şekil 4.14. CBX uygulaması ve HMGB1 saliverilmesi. CBX uygulaması ile HMGB1 göçünün engellendiği ve KYD'den 30 dk sonra HMGB1 immünoaktivitesinin hala nükleusa lokalize olduğu ve Hoechst-33258 (mavi) çekirdek boyaması ile HMGB1'in (yeşil) örtüştüğü görülmektedir. Skala 100 μ m.

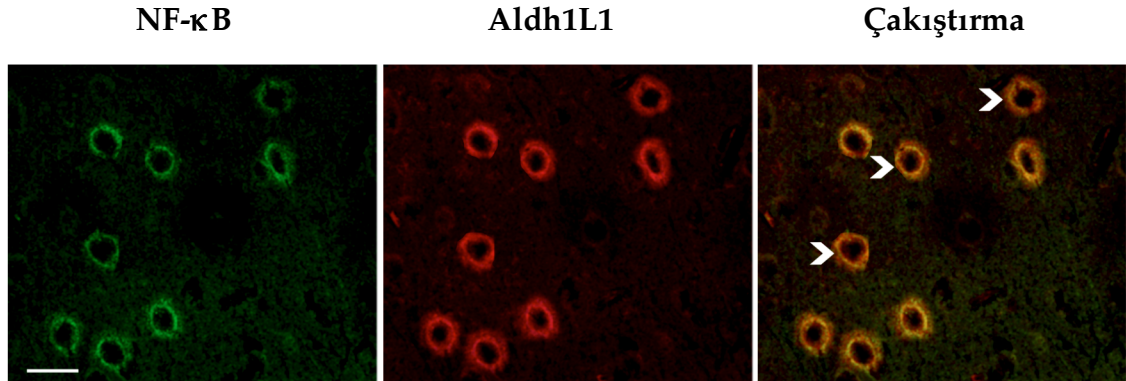
4.4. Kortikal Yayılan Depresyon Astrositlerde NF- κ B Göçüne Neden Olur

HMGB1'in hücreden saliverilmesi çevre doku için uyarıcı nitelik taşır ve inflamatuvar yanıtı başlatabilir. Bunu test etmek amacı ile KYD sonrası NF- κ B cevabı incelenmiştir. HMGB1'in KYD'den 30 dk sonra belirgin olarak intersitisyuma geçtiği saptandığından NF- κ B deneylerinde bu zaman noktası çalışılmıştır. İmmünohistokimyasal boyamalar, KYD sonrası hücrelerde NF- κ B'nin sitoplazmadan nükleusa yer değiştirdiğini göstermiştir (Şekil 4.15). Aldh1L1 ile yapılan immünohistokimyasal boyamalara göre ise NF- κ B göçünün olduğu hücrelerin çoğunluğu astrositlerdir (Şekil 4.15).

CBX verilerek yapılan deneylerde (n=3 fare) NF- κ B göçünün hiç işlem görmemiş gruptakiler gibi neredeyse tamamen baskılandığı saptanmıştır (Şekil 4.16). CBX'in çözücüsünün verildiği grupta (n=3) ise NF- κ B göçü izlenmiştir. Bu bulgular ışığında NF- κ B göçünü başlatan uyarının nöronal Panx-1 kanallarının açılması ve HMGB1 saliverilmesi olduğu düşünülmüştür.

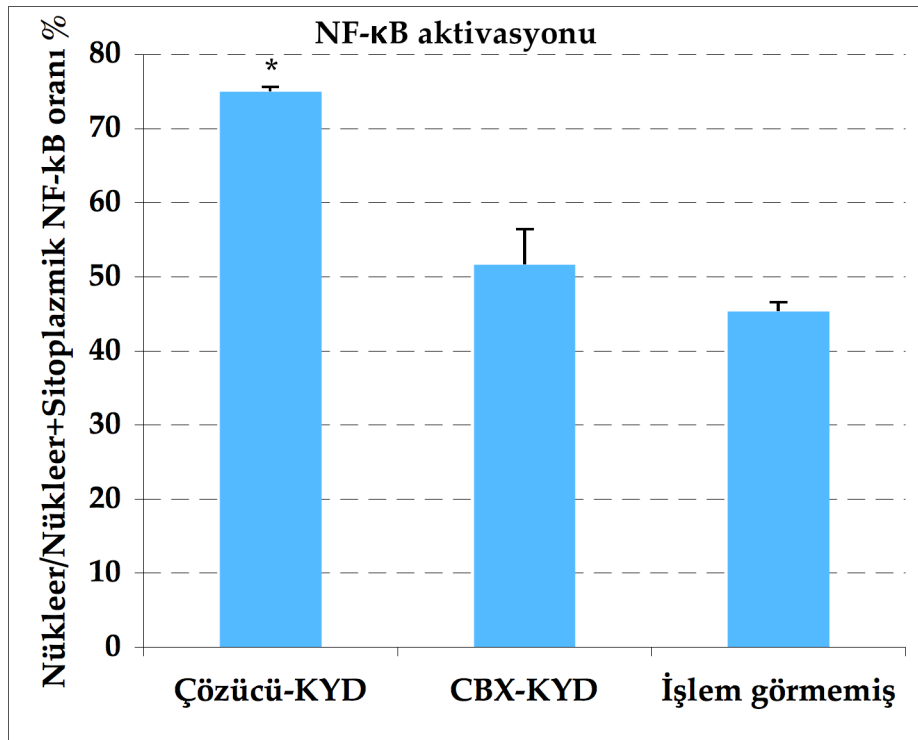


Şekil 4.15. NF- κ B'nin sitoplazmadan nükleusa yer değiştirmesi. KYD'den 30 dk sonra Aldh1L1 boyaması (kırmızı) ile işaretlenen astrositlerde NF- κ B'nin (yeşil) nükleusa göç ettiği görülmektedir (ok başları). Buna karşılık büyük nükleusları ve dar sitoplazmaları ile ayırt edilebilen nöronlarda ise NF- κ B'nin sitoplazmada yerleştiği ve nükleusların (N) boyanmadığı izlenmektedir. Skala 50 μ m.



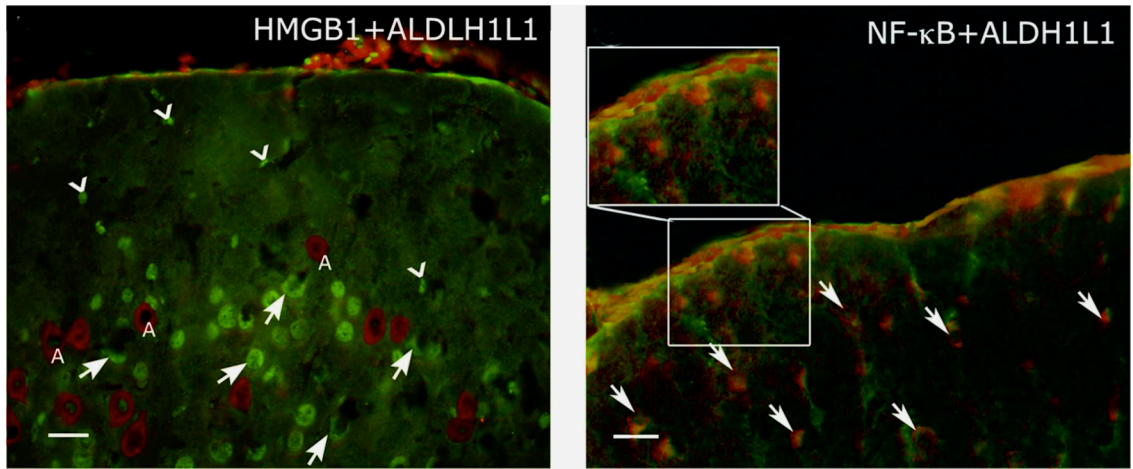
Şekil 4.16. CBX uygulaması ve NF- κ B aktivasyonu. CBX verilen grupta NF- κ B'nin sitoplazmadan nükleusa yer değiştirmedeği görülmüştür. İkili boyama yapıldıktan sonra çakıştırılmış resimde, Aldh1L1 ile işaretli astrositlerin nükleuslarının (kırmızı) boyanmadığı, buna karşılık sitoplazmalarının NF- κ B boyanmasına (yeşil) bağlı sarı renk verdiği görülmektedir (ok başları). Skala 50 μ m.

NF- κ B'nin nükleusa yer değiştirmesi Western blotlama yöntemi ile de gösterilmiş ve CBX uygulaması ile bunun baskılandığı da saptanmıştır (şekil 4.17). CBX verilen farelerde aynı zamanda HMGB1'in de nükleustan sitoplazmaya yer değiştirmediği görölmüştür. Bu grupta KYD'den 30 dk sonra HMGB1 immünoreaktivitesinin nükleusa lokalize olduğu Hoechst-33258 boyaması ile gösterilmiştir (şekil 4.14).



şekil 4.17. Western blotlama ile NF- κ B aktivasyonu. Western blotlama yöntemi kullanılarak KYD'den 30 dk sonra fare beyinlerinde nükleer ve sitoplazmik NF- κ B aktivasyonu çalışılmış ve nükleer aktivasyonun nükleer+sitoplazmik aktivasyona oranı hesaplanmıştır. CBX grubunda işlem görmemiş gruba yakın olacak şekilde NF- κ B'nin nükleusa göçünün baskılandığı saptanmıştır (n=3/grup) (ort $\pm$ sh) (p<0.05). * Çözücü verilen grupta NF- κ B aktivasyonu CBX ve işlem görmemiş gruba göre istatistiksel açıdan farklıdır.

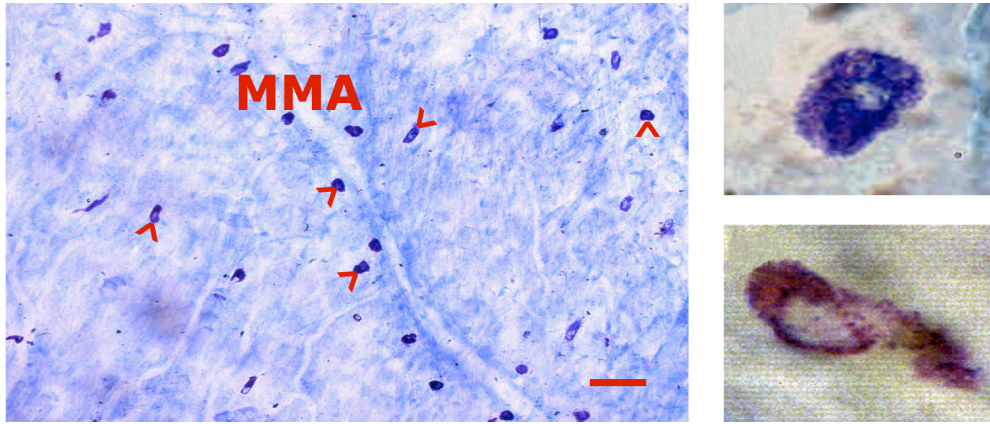
Astrositik sinsityumdaki NF- κ B aktivasyonu inflamatuvar mediyatörlerin ifadesini artırıp glia limitans üzerinden subaraknoid boşluğa saliverilmelerini sağlayabilir. Bu nedenle glia limitansı oluşturan astrositlerde de HMGB1 ve NF- κ B için immüno Floresan boyamalar yapılmış ve bu kesitlerde KYD sonrası HMGB1 aktivasyonu ve buna bağlı hücre dışına saliverilmesi saptanmıştır (Şekil 4.18). Aynı zamanda bu bölgedeki astrositlerde NF- κ B'nin nükleusa göç ettiği de görülmüştür (Şekil 4.18).



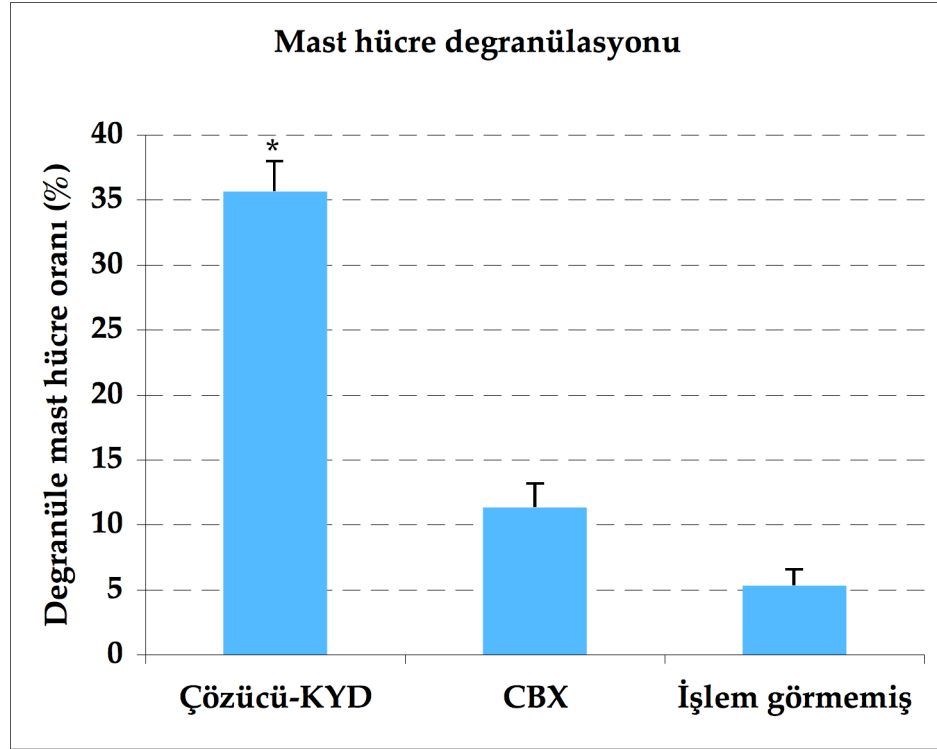
Şekil 4.18. Glia limitansın işaretlenmesi. Korteks ile birlikte komşu glia limitans hücrelerinde de HMGB1'in intersitisyuma salınımı (yeşil) ve NF- κ B'nin de (kırmızı) nükleusa göç ettiği görülmüştür. Perinükleer (oklar) HMGB1 immünopozitifliği HMGB1'in sitoplazmaya geçtiğini veya neredeyse tamamen intersitisyuma salındığını (ok başları) işaret etmektedir. Aldh1L1 ile boyanan astrositler (A) kırmızı görünmektedir. NF κ B+Aldh1L1 boyamasında ise glia limitansı oluşturan kırmızı astrositlerin nükleuslarının NF- κ B ile yeşil işaretlendiği (oklar) izlenmektedir. Skalalar: 100 μ m.

4.5. Panx-1 Aktivasyonunun ve HMGB1 Salınımının İnhibisyonu Trigeminovasküler Aktivasyonu Önler

Trigeminovasküler sistemin aktivasyonunun bir göstergesi de dura materdeki mast hücrelerinin degranülasyonudur (42). Bu nedenle iğne batırılması ile KYD tetiklenen ve KYD tetiklenmeyen gruplarda dura mater metilen mavisi ile boyanmış ve degranüle olan mast hücreleri ışık mikroskopunda sayılmıştır (Şekil 4.19). HMGB1 salıverilmesinin ve NFκB'nin nükleusa yer değiştirmesinin en belirgin olduğu 30 dk bu deneylerde zaman noktası olarak kullanılmıştır. KYD tetiklenmesinden 30 dk sonra degranüle mast hücre sayısı KYD grubunda % 36±2 iken işlem görmemiş grupta %5±1 olarak saptanmıştır. CBX (400 ng, i.s.v.) ile Panx-1 kanalları bloke edildiğinde ise mast hücre degranülasyonu oranı %11±2'ye düşmüştür (n=3/grup) (p<0.05) (Şekil 4.20).



Şekil 4.19. Dura materde mast hücrelerinin boyanması. Işık mikroskopunda, 100'lük büyütmede alınan, metilen mavisi ile boyanmış dura mater kesiti. Orta meningeal arter (MMA) etrafındaki mast hücrelerinin mavi mor renkte boyandığı (ok başları) görülmektedir. Sağ üstteki resimde granülleri sitoplazma içinde olan ve koyu mor boyanan bir mast hücresi izlenmektedir. Sağ alt resimde ise granülleri hücre membranının dışına taşmış, degranüle olan bir mast hücresinin resmi yer almaktadır. Bu görüntüler 1000'lik büyütmede alınmıştır. Skala:100 µm.



Şekil 4.20. Dura materdeki degranüle mast hücrelerinin sayımı. KYD'den 30 dk sonra CBX, distile su (karbenoksolonun çözücüsü) verilen ve hiç işlem yapılmamış farelerin dura mater kesitlerindeki mast hücre degranülasyon oranı. CBX grubunda degranüle mast hücre oranının anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ($n=3/\text{grup}$) ($p<0.05$). * Mast hücre degranülasyonu çözücü grubunda CBX ve işlem görmemiş gruba göre istatistiksel açıdan farklıdır. Değerler $\text{ort} \pm \text{sh}$ olarak verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada fare beyinde kortikal yayılan depresyonun nöronlardaki Panx-1 kanallarında geçici bir açılmaya ve ardından HMGB1 salınımı sonucu NF- κ B aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Panx-1 kanallarının ve HMGB1 salınımının farmakolojik ajanlarla bloke edilmesi, trigeminovasküler sistemin aktivasyonunu inhibe etmiştir. Elde edilen veriler, KYD gibi intrinsik bir beyin aktivitesi ile meningeal ağrı liflerinin aktivasyonu arasında bir sinyalizasyon yolağı olduğunu göstermektedir.

Migren ağrısının patofizyolojisi halen anlaşılamamıştır (1). Trigeminoservikal kompleksin aktivasyonu migren ağrısına neden olur görüşü genel olarak kabul görmektedir (3). Ancak asıl tetikleyici belli değildir. Migren aurası ile KYD arasında benzerlik olduğu 50 yıldır bilinmekte ve bu konuda çalışmalar sürmektedir (6, 43). KYD sırasında nöronal membran iletkenliği önemli oranda artar (16). Panx'ler büyük-gözenekli, iletkenliği yüksek olan iyon kanallarıdır (17). Bu kanallar 1 kD'dan küçük molekülleri geçirebilir (18). Bu çalışmada literatürde tariflenen KYD sonrası artmış membran iletkenliğinden sorumlu olabileceği düşünülen kanallardan biri olarak Panx-1 mega kanallarının rolü araştırılmıştır. Bu amaçla küçük moleküler ağırlığı olan PI i.s.v. yolla verilmiş, 2 dk sonra iğne batırılması veya topikal KCl uygulaması ile KYD tetiklenmiştir. Daha sonra incelenen beyinlerde hem kortikal ve hem de subkortikal PI pozitifliği saptanmıştır. Öyle ise KYD plazma membranındaki Panx-1 kanallarını aktive ederek hücrelere PI girişine yol açıyor olabilir. Ardından KYD sonrası hücrelere PI girişinin zamansal olarak değişimi incelenmiş ve yapılan tarama deneylerinden sonra 5 dk, 30 dk ve 60 dk olmak üzere 3 zaman noktası seçilmiştir. Bu deneyler sonucunda PI pozitifliğine yol açan membran geçirgenliğindeki artışın 5. dk'da en fazla olduğu, 30. dk'da belirgin olarak azaldığı, 60. dk'da ise büyük oranda kaybolduğu görülmüştür. Yani PI pozitifliği hücre membranında geçici bir geçirgenlik artışına neden olmaktadır.

Bundan sonra direkt i.s.v. PI enjeksiyonunun yapabileceği bir travmanın etkisi olabilir mi sorusuna yanıt almak üzere deneylerde KYD'nin karşı hemisferinde lateral ventriküle deneyden 1 gün önce kanül yerleştirilmiş ve deneyler bu düzenekle devam etmiştir. Kanül yerleştirilerek yapılan deneylerde PI pozitifliğinin en fazla olduğu 5. dk, zaman noktası olarak seçilmiştir. PI pozitifliğinin 5. dk'da en fazla olmasının nedeni KYD'nin kortekste yayılma hızının 2-5 mm/dk olması ile ilişkili olabilir. Bu deneylerde tek KYD oluşturulmuş ve bunun etkisi incelenmiştir, olasılıkla tek KYD 5 dk içinde serebral kortekste maksimum etkisini yapmaktadır. Kanül konularak PI verilen deney gruplarında da KYD hemisferinde hücrelere yaygın PI girişinin olduğu saptanmıştır. PI pozitifliği korteks, dentat girus, talamus ve kaudoputamende KYD tetiklenen tarafta, hipotalamus ve periaquaduktal gri maddede ise iki taraflıdır. Hücrelere PI girişinin elektrofizyolojik karşılığının olup olmadığını incelemek üzere subkortikal dokulardan korteks ile eş zamanlı elektrofizyolojik kayıtlama yapılmıştır. Bu deneylerde PI pozitifliğine paralel olacak şekilde KYD dalgasının dentat girus, talamus, kaudoputamen ve hipotalamusa yayıldığı ve bunun belli bir gecikme ile olduğu saptanmıştır. Bu bulgular literatürdeki elektrofizyolojik, biyokimyasal ve görüntüleme çalışmaları ile uyumludur. Literatürde KYD'nin subkortikal dokulara yayılımı ile ilgili çalışmalar 1960'lı yıllara dayanmaktadır. Fifkova'nın yaptığı bir çalışmada korteksten tetiklenen KYD'nin %60 oranında striatuma geçtiği ve striatumdan tetiklenen KYD'nin de %42 oranında kortekse geçtiği gösterilmiştir (60). Ayrıca KYD'nin retrosplenial ve entorinal bölgelerde yayılımı olduğu, ancak hipokampusta olmadığı da belirtilmiştir (60, 62). Henning ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sıçanda topikal KCl uygulaması ile oluşturulan KYD'nin etkileri manganez işaretli MRG (MEMRI=mangane-enhanced MRI) ile görünür hale getirilmiştir (65). İpsilateral kortekste karşı kortekse göre MEMRI sinyal artışı %60 oranında fazla saptanmış ve bu sinyal artışının sadece korteksi değil subkortikal yapıları da etkilediği saptanmıştır. Bu yapılar arasında hipokampusun CA 1-3. segmenti, subikulum, dentat girus, talamik nükleus, superior ve inferior kollikulus ve genikülat nükleus

yer almaktadır. Sinyal artışının altında yatan mekanizma olarak hipokampus ile korteks arasındaki bağlantılarla, kortikotalamik bağlantılar öne sürülmüştür (65). Çalışmamızda kortikal DA potansiyelinin belli bir gecikme ile subkortikal bölgelere yayıldığı görülmüştür. Bu da KYD'nin hızlı aksonal iletimden çok gri cevher boyunca yayıldığı görüşünü desteklemektedir (60, 110). Ayrıca hücre içine giren propidyum iyodür gibi floresan boya ların KYD'nin subkortikal yayılımını incelemek üzere elektrofizyolojik incelemelere ek olarak kullanılabilecek pratik bir yöntem olabileceğini düşünmekteyiz. KYD migren aurası sırasında da subkortikal dokulara yayılıyor olabilir mi? Anestezi altında olmayan migren hastalarında da bu tür yayılım olabilir ancak insan beynindeki sulkuslar KYD'nin subkortikal nöral yapılara ilerlemesini ön lüyor olabilir. Yine de migrenin prodromal fazında ortaya çıkan klinik belirtilerin KYD'nin subkortikal yayılımına bağlı olup olmadığı incelenmeye değ er olabilir.

Bu çalışmada Swiss albino fareler kullanılmıştır. Fare soyları arasında PI pozitifliğinin farkedip etmediğini incelemek üzere C57 ve SV129 farelerinde de KYD tetiklenmiştir. Bu farelerden alınan beyinlerde, Swiss albino soyuna benzer biçimde hem kortikal hem de subkortikal yapılarda hücrelere PI girişinin olduğu görülmüştür.

Nöronal PI pozitifliği gerçekten KYD'nin tetiklenmesi ile mi olmaktadır sorusuna yanıt vermek üzere, bir NMDA reseptör antagonisti olan MK-801 topikal olarak uygulanmış ve iğne batırılması ile KYD'nin oluşmadığı elektrofizyolojik olarak gösterilmiştir. Bu beyinlerde nöronlara PI girişinin istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde baskılandığı görülmüştür. Yani PI pozitifliğine iğne batırılması değil, KYD'nin oluşması neden olmaktadır.

PI girişinin nöronal membran geçirgenliğinde seçici olmayan bir artış sonucu olup olmadığını incelemek üzere ise FITC-dekstran-70S kullanılmıştır. FITC-dekstran-70S yüksek moleküler ağırlıklı (77 kDa) bir floroprobudur. Bu deneylerde FITC-dekstran-70S hem tek başına hem de PI ile birlikte verilmiştir. Kesitlerde KYD sonrası FITC-dekstran-70S'nin nöronlara girmediği ancak PI ile birlikte verilen farelerde PI pozitifliği olduğu

görülmüştür. Bu da bize, hücreye PI girişinin plazma membranındaki ozmotik yırtılma sonucu değil bir kanal aracılığı ile olduğunu düşündürmüştür.

Panx kanalları mega gözenekli iyon kanallarıdır ve iletkenlikleri oldukça fazladır. Panx-1 santral sinir sisteminde yaygın olarak ancak özellikle piramidal nöronların dendritik dikensi çıkıntılarında ifade olan bir alt tipidir (17, 19). Panx-1 kanallarından PI girişi olduğu iskemi, NMDA reseptör aşırı aktivitesi ve aberan patlamalar sırasında in vitro deney düzeneklerinde gösterilmiştir (17). Bu patolojik durumlardakine benzer şekilde, bu çalışmada da KYD sonrasında nöronlara PI girişi tespit edilmiştir. Panx kanallarının rolünü daha detaylı araştırmak amacı ile Panx-1 kanal inhibitörü olan karbenoksolon ve Panx-1 kanalının seçici bir peptid inhibitörü olan ¹⁰Panx ile deneyler yapılmıştır. PI pozitifliği karbenoksolon ile tamamen, ¹⁰Panx ile ise büyük oranda bloke olmuştur. Panx kanalları dışında oluklu bağlantılar da (gap junction) PI girişinden sorumlu olabilir. Bu amaçla oluklu bağlantıları inhibe eden bir ajan olan izofloran anestezisi ile yapılan deneylerde, fare beyinlerinde PI pozitifliğinin değişmediği saptanmıştır, böylece bu bulgu PI girişinin Panx-1 kanalları aracılığı ile olduğunu düşündürmektedir.

KYD sonrası 5. dk'da en fazla olan ve yaygın olarak görülen PI pozitifliğinin hangi hücrelerde olduğu da incelenmiştir. Bunun için nöronları gösteren NeuN ve astrositleri işaretleyen Aldh1L1 ile immünofloresan boyamalar yapılmıştır (70). PI pozitif hücrelerin % 95±3'ünün NeuN ile boyandığı görülmüştür. Aldh1L1 boyamasında ise PI'nın astrositlerde olmadığı saptanmıştır. Bunun nedeni Panx-1 kanallarının in vivo erişkin sıçan beynindeki astrositlerde düşük miktarda ifade edilmesi olabilir (19, 70).

Nöronları strese sokan çeşitli durumlarda örneğin iskemi, KYD, aberan patlamalar gibi, Panx-1 kanallarının aktive olduğu söylenebilir. Ayrıca aşırı potasyum veya yüksek miktarda glutamat gibi hücresel stresörler tarafından Panx-1 kanallarının aktive olduğu ve bu aktivitenin inflamazom kompleksinin uyarılması ve ardından kaspaz-1 aktivasyonu ve IL-1 β üretimine neden olduğu da gösterilmiştir (17, 111). Bu bilgiler Panx-1 kanallarının nöronal stres ile inflamatuvar mediyatörlerin aktivasyonu arasında var olan bir yolakta görev

alabileceğini düşündürmektedir. Panx-1 kanallarında meydana gelen geçici açılma nöronlardan kaynaklanan inflamatuvar bir süreci tetikleyebilir.

HMGB1 hasarlı hücrelerle etrafındakiler arasındaki iletişimi sağlayan alarmin ailesinin bir üyesidir (112). HMGB1 nekrotik hücrelerden pasif olarak ve stres altındaki hücrelerden ise aktif olarak hücre dışı ortama salınır (74, 81). HMGB1'in stresörlerle muamele edilen kültürdeki nöronlardan salıverildiği gösterilmiştir (113). İn vivo çalışmalarda ise hem fare hem de sıçan beyinde iskemiden sonraki ilk saatlerde HMGB1'in sitoplazmaya geçtiği ve oradan da intersitisyuma salıverildiği bildirilmiştir (83, 114, 115). HMGB1 birkez ekstrasellüler ortama salıverildiğinde sitokin olarak çalışır ve inflamasyonu başlatır. Bununla ilgili olarak yapılan bir çalışmada beyine HMGB1 mikroenjeksiyonunun proinflamatuvar mediyatörlerin ifadesini artırdığı gösterilmiştir (113). Yine HMGB1'e maruz kalan astrositlerde inflamatuvar mediyatörlerin ifadesi ve bunların salınımı artar (116). KYD sırasında geçici olarak açılan mega kanallar nöronlardan HMGB1 salıverilmesine ve inflamatuvar bir sürecin başlamasına neden olabilir. Bu çalışmada KYD sonrasında nöronlardan proinflamatuvar bir mediyatör olan HMGB1'in salıverildiği immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir. KYD'den 5 dk sonra PI pozitif nöronların % 96'sının HMGB1 immünopozitifliği gösterdiği, ancak 30 dk sonra sadece % 53'ünde HMGB1 boyanmasının kaldığı görülmüştür. Bunların çoğunun perinükleer HMGB1 immünopozitivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu kesitlerde PI pozitif olan nöronların bazılarında HMGB1'in yüzük şeklinde sitoplazmik boyandığı bazılarında ise hiç HMGB1 immünopozitifliği kalmadığı görülmüştür. Böylece KYD'nin neden olduğu PI işaretlenmesi görülen kortikal ve subkortikal nöronlarda, HMGB1'in önce nükleustan sitoplazmaya göç ettiği ardından da hücreden ekstrasellüler mesafeye salıverildiği düşünülmüştür. Çünkü HMGB1 fizyolojik koşullarda nükleusta yerleşen ancak bir uyarı ile ekstrasellüler matrikse yer değiştiren bir proteindir. Panx-1 kanallarının HMGB1 salınımında bir rolünün olup olmadığı ise bu kanalın blokörü olan karbenoksolon uygulanarak test edilmiş ve karbenoksolon ile HMGB1'in hem sitoplazmaya hem de ekstrasellüler mesafeye

çıkışını düşündüren immünohistokimyasal bulgular baskılanmıştır. Bu veriler bize KYD'nin nöronal Panx-1 kanallarında geçici bir açılmaya neden olduğunu ve bunun nöronlardan HMGB1 salıverilmesini tetiklediğini düşündürmüştür. Bir hücreden HMGB1 salıverilmesi çevre doku için bir uyarı sinyali oluşturur (81). İntersitisyumdaki HMGB1 çevredeki hücrelerde reseptörlerine bağlanıp (RAGE, TLR2 veya TLR4) sitoplazmada bulunan NF- κ B'yi uyarır. Böylece salıverilen HMGB1 astrositlerde inflamatuvar sinyalizasyon yolağını aktive edebilir. Bulgularımız, beyin parankimi KYD veya KYD-benzeri stresli bir durumla karşılaştığında HMGB1'in, ağrı mekanizmalarını tetikleyerek, organizmayı alarme eden bir inflamatuvar mediatör olabileceğini düşündürmektedir. Tabii ki HMGB1 ağrı oluşumunda rol alan tek mediyatör olamaz, inflamazom kompleksinin uyarılması ve ardından gelen IL-1 β üretimi de inflamatuvar yolları tetikleyen önemli olaylardır (17, 111). IL-1 β ifadesinin fare beyinde epileptik nöbetler sırasında arttığı gösterilmiştir (117). Yine KYD'nin ardından IL-1 β ve TNF- α gibi bazı sitokinlerin ifadesinin arttığı gösterilmiştir (118, 119).

HMGB1 bu fonksiyonu, astrositlerde NF- κ B'nin sitoplazmadan nükleusa geçişini indükleyerek sağlıyor olabilir. Birçok çalışmada bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin sinir sistemi ve diğer sistemler için önemli bir inflamatuvar gen ifadesi düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir (103, 104). Normal şartlarda NF- κ B endojen inhibitörü olan I κ B- α 'ya bağlı olarak sitoplazmada latent halde bulunur. Oksidatif stress, nörotrofinler, glutamat, depolarizasyon, bakteriyel endotoksin veya sitokinlerle (HMGB1 gibi) aktive olduğunda I κ B- α fosforlanır ve NF- κ B kompleksinden ayrılır (100). Serbest kalan NF- κ B ise nükleusa transloke olur ve κ B ile ilişkili sekanslara bağlanarak NF- κ B tarafından düzenlenen genlerin ifadesini başlatır. Bu genlerin aktivasyonu ile inflamatuvar veya immün cevap, hayatta kalım cevabı ve hücrel proliferasyon gibi fizyolojik cevaplar düzenlenir (104, 105). Çalışmamızda HMGB1 ile tetiklenen NF- κ B aktivasyonu da incelenmiştir. HMGB1'in KYD'den 30 dk sonra belirgin olarak intersitisyuma geçtiği saptandığından NF- κ B deneylerinde bu zaman noktası çalışılmıştır.

İmmünohistokimyasal boyamalar KYD sonrası NF- κ B'nin sitoplazmadan nükleusa yer değiştirdiğini göstermiştir. NeuN ve Aldh1L1 ile yapılan hücre tiplmesi NF- κ B göçünün olduğu hücrelerin çoğunun astrositler olduğunu göstermiştir. Böylece Panx-1 kanallarının açılmasını takiben nöronlardan ekstrasellüler ortama salınan HMGB1, astrositlerde NF- κ B'nin nükleusa yer değiştirmesini sağlamıştır. Nitekim Panx-1 kanalları karbenoksolon ile bloke edildiğinde nükleusa NF- κ B göçü önlenmiştir. Glia limitansı oluşturan astrosit son ayaklarında da NF- κ B aktivasyonu olabilir. Nitekim glia limitansı oluşturan astrositlerde de KYD sonrası HMGB1'in hücre dışına salıverildiği ve NF- κ B'nin nükleusa göç ettiği saptanmıştır. Bu hücrelerdeki NF- κ B aktivasyonu astrositik sinsityumdan glia limitans aracılığı ile subaraknoid boşluğa sitokin, prostanoit ve nitrik oksit salınmasına ve böylece trigeminal sinir sonlanmalarının uyarılmasına neden olabilir.

KYD sırasında hücre dışı ortamda yüksek konsantrasyonlara ulaşan potasyum gibi mediyatörlerin de perivasküler trigeminal sinir sonlanmalarını aktive ettiği öne sürülmüştür (8, 12). Ancak bu mediyatörler, perivasküler boşluktaki nosiseptörlerin aktivasyonuna neden olabilecek etkin konsantrasyona ulaşamayabilir, çünkü arada glia limitans vardır. Glia limitans beyin intersitisyumunu pial arter ve arteriyollerden ayıran astrosit son ayaklarından oluşan bir tabakadır. Bu astrosit ağı, üzerinde bulunan ve iletkenliği oldukça yüksek olan potasyum kanalları ile artmış hücre dışı potasyumunu subaraknoid boşluğa sifonlayabilir (120). KYD sırasında pial vazodilatasyon olması, astrosit son ayağından salınan potasyumun depolarizasyondan çok hiperpolarizasyon yapacak konsantrasyona ulaştığını düşündürür (121). Trigeminal sinir sonlanmalarının aktivasyonu için ise potasyumun depolarizasyon yapacak seviyeye gelmesi gereklidir. Bu çalışmada saptadığımız alternatif mekanizmalar ile inflamatuvar yolakların aktivasyonu, sensitizasyon ve ağrı oluşması için gerekli uzun süreli ve etkin aljezik uyarıyı sağlıyor olabilir.

Trigeminal sinir aktivasyonun bir göstergesi de dura materde yer alan mast hücrelerinin degranülasyonudur (31, 42). Dura materde ağrı liflerinin

yoğun inervasyonunun yanında çok granüllü immün hücrelerden olan ve inflamasyonda kritik önemi olan mast hücreleri yer almaktadır (38, 39). İn vivo çalışmalarda trigeminal gangliyonun uyarılması ile meningeal nosiseptörlerin aktive oldukları ve dura materdeki mast hücrelerinin granüllerini salıverildikleri gösterilmiştir (40). Bizim çalışmamızda da KYD sonrası dura materde bulunan mast hücrelerinin degranüle oldukları gösterilmiştir. Yani KYD trigeminal sistem aracılığıyla dura materdeki mast hücrelerinin degranüle olmasını sağlamıştır. Panx-1 blokörü (CBX) verildiğinde ise degranülasyon tamamen baskılanmıştır. Böylece Panx kanallarının açılması ile başlayan nöroinflamatuvar sürecin trigeminal sinir uçlarının aktivasyonu ile dura materde de inflamatuvar süreci tetikleyebileceği ilk defa bu çalışma ile gösterilmiş oldu.

Sonuç olarak bu çalışmanın bulgularına dayanarak, ağrılı bir beyin olayı ile trigeminal ağrı liflerinin aktivasyonu arasında yeni bir yolak öne sürülmektedir. Bu yolak KYD gibi bir stresör ile nöronlarda bulunan Panx-1 mega kanallarının açılması ile başlar ve inflamatuvar yolakların aktivasyonu ile devam eder. Bu sinyal böylece pial damarların etrafındaki trigeminal sinir sonlanmalarına ulaşır. Bu bulgular nöronlardan perivasküler ağrı liflerine uzanan kompleks sinyalizasyon yolağının tamamını değil sadece bazı elemanlarını göstermektedir. Bu çalışmada HMGB1 ve NF- κ B seçilmiştir, çünkü bu proteinlerin sitoplazma ve nükleus arasında yer değiştirmesi yolaktaki basamakların gösterilebilmesini sağlamıştır. Daha sonraki çalışmalarda diğer mega kanallar ve inflamatuvar mediyatörler ile glia limitanstaki iletim mekanizmaları çalışılabilir. Ayrıca KYD'nin subkortikal dokulara yayılımı da daha ayrıntılı incelenmelidir. Çünkü tek taraflı oksipital KYD sonrası oluşan iki taraflı baş ağrısı veya migrene eşlik eden hipotalamik semptomlar subkortikal yayılımla ilişkili olabilir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Migren aurasının oluşumunda önemli olan KYD, nöron membranında kısa süreli ve geçici bir mega kanal açıklığına neden olmaktadır.
2. Bu kanallar nöronlarda ifade edilen Panx-1 kanallarıdır.
3. İntraserebroventriküler yolla fare beynine verilen PI nöron membranından geçerek nükleik asitlerle etkileşmekte ve floresan ışıma vermektedir.
4. Nöronları strese sokan KYD inflamatuvar bir sitokin olan HMGB1'in saliverilmesi ile başlayan inflamatuvar bir yolağı tetiklemektedir.
5. Nöronlardan salıverilen HMGB1 astrositlerde NF- κ B aktivasyonuna neden olmaktadır.
6. Glia limitansı oluşturan astrosit uzantılarında da aktive olan NF- κ B inflamatuvar mediyatörlerin subaraknoid boşluğa saliverilmesine yol açarak trigeminal sinir uçlarını uyarabilir.
7. Trigeminovasküler aktivasyonun bir göstergesi olan dura materdeki mast hücre degranülasyonu KYD ile artmakta ve Panx-1 kanal blokörü ile baskılanmaktadır.
8. KYD subkortikal dokulara da yayılmakta ve nöronlarda mega kanalları aktive etmektedir. KYD'nin tetiklediği subkortikal mekanizmalar migrende görülen prodromal belirtilerle ilgili olabilir.
9. Bu çalışmanın bulgularına dayanarak ağrılı bir beyin olayı ile trigeminal ağrı liflerinin aktivasyonu arasında yeni tanımlanan bir yolak öne sürülmektedir.
10. Daha sonraki çalışmalarda diğer mega kanallar ve inflamatuvar mediyatörlerin rolü ile glia limitanstaki iletim mekanizmaları çalışılabilir.

KAYNAKLAR

1. Lipton RB, Stewart WF, Diamond S, Diamond ML, & Reed M (2001) Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II *Headache* 41, 646-657.
2. (2004) The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition *Cephalalgia* 24 Suppl 1, 9-160.
3. Moskowitz MA (2008) Defining a pathway to discovery from bench to bedside: the trigeminovascular system and sensitization *Headache* 48, 688-690.
4. Goadsby PJ (2007) Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics *Trends Mol Med* 13, 39-44.
5. Leao AA (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex *J Neurophysiol* 7, 359-390.
6. Lauritzen M (1994) Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory *Brain* 117 (Pt 1), 199-210.
7. Dalkara T, Zervas NT, & Moskowitz MA (2006) From spreading depression to the trigeminovascular system *Neurol Sci* 27 Suppl 2, S86-90.
8. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, & Moskowitz MA (2002) Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model *Nat Med* 8, 136-142.
9. Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, Kwong KK, Cutrer FM, Rosen BR, Tootell RB, *et al.* (2001) Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4687-4692.
10. Zhang X, Levy D, Nosedà R, Kainz V, Jakubowski M, & Burstein R (2010) Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura *J Neurosci* 30, 8807-8814.
11. Somjen GG (2001) Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization *Physiol Rev* 81, 1065-1096.
12. Olesen J, Burstein R, Ashina M, & Tfelt-Hansen P (2009) Origin of pain in migraine: evidence for peripheral sensitisation *Lancet Neurol* 8, 679-690.
13. Strassman AM, Raymond SA, & Burstein R (1996) Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches *Nature* 384, 560-564.
14. Lotze MT & Tracey KJ (2005) High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal *Nat Rev Immunol* 5, 331-342.
15. Dumitriu IE, Baruah P, Manfredi AA, Bianchi ME, & Rovere-Querini P (2005) HMGB1: guiding immunity from within *Trends Immunol* 26, 381-387.
16. Snow RW, Taylor CP, & Dudek FE (1983) Electrophysiological and optical changes in slices of rat hippocampus during spreading depression *J Neurophysiol* 50, 561-572.

17. MacVicar BA & Thompson RJ (2009) Non-junction functions of pannexin-1 channels *Trends Neurosci* 33, 93-102.
18. Wang J, Ma M, Locovei S, Keane RW, & Dahl G (2007) Modulation of membrane channel currents by gap junction protein mimetic peptides: size matters *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C1112-1119.
19. Zoidl G, Petrasch-Parwez E, Ray A, Meier C, Bunse S, Habbes HW, Dahl G, & Dermietzel R (2007) Localization of the pannexin1 protein at postsynaptic sites in the cerebral cortex and hippocampus *Neuroscience* 146, 9-16.
20. Thompson RJ, Jackson MF, Olah ME, Rungta RL, Hines DJ, Beazely MA, MacDonald JF, & MacVicar BA (2008) Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus *Science* 322, 1555-1559.
21. Thompson RJ, Zhou N, & MacVicar BA (2006) Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels *Science* 312, 924-927.
22. Goadsby PJ (2002) New directions in migraine research *J Clin Neurosci* 9, 368-373.
23. Silberstein SD (2004) Migraine pathophysiology and its clinical implications *Cephalalgia* 24 Suppl 2, 2-7.
24. Moskowitz MA (1991) The visceral organ brain: implications for the pathophysiology of vascular head pain *Neurology* 41, 182-186.
25. Penfield W (1935) A contribution to the mechanism of intracranial pain. *Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 15, 399-416.
26. Ray BS & Wolff HG (1940) Experimental studies on headache. Pain-sensitive structures of the head and their significance in headache. *Arch. Surg.* 41, 813 - 885.
27. Graham JR & Wolff HG (1938) Mechanism of migraine headache and action of ergotamine tartrate *Arch Neurol Psychiatry* 39, 737-763.
28. Olesen J, Friberg L, Olsen TS, Iversen HK, Lassen NA, Andersen AR, & Karle A (1990) Timing and topography of cerebral blood flow, aura, and headache during migraine attacks *Ann Neurol* 28, 791-798.
29. Zwetsloot CP, Caekebeke JF, Jansen JC, Odink J, & Ferrari MD (1992) Blood flow velocities in the vertebrobasilar system during migraine attacks--a transcranial Doppler study *Cephalalgia* 12, 29-32.
30. Bove GM & Moskowitz MA (1997) Primary afferent neurons innervating guinea pig dura *J Neurophysiol* 77, 299-308.
31. Markowitz S, Saito K, & Moskowitz MA (1987) Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain *J Neurosci* 7, 4129-4136.
32. Moskowitz MA (1984) The neurobiology of vascular head pain *Ann Neurol* 16, 157-168.

33. Goadsby PJ, Edvinsson L, & Ekman R (1990) Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache *Ann Neurol* 28, 183-187.
34. Burstein R, Yamamura H, Malick A, & Strassman AM (1998) Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons *J Neurophysiol* 79, 964-982.
35. Burstein R (2001) Deconstructing migraine headache into peripheral and central sensitization *Pain* 89, 107-110.
36. Pietrobon D & Striessnig J (2003) Neurobiology of migraine *Nat Rev Neurosci* 4, 386-398.
37. Waeber C & Moskowitz MA (2005) Migraine as an inflammatory disorder *Neurology* 64, S9-15.
38. Dimlich RV, Keller JT, Strauss TA, & Fritts MJ (1991) Linear arrays of homogeneous mast cells in the dura mater of the rat *J Neurocytol* 20, 485-503.
39. Strassman AM, Weissner W, Williams M, Ali S, & Levy D (2004) Axon diameters and intradural trajectories of the dural innervation in the rat *J Comp Neurol* 473, 364-376.
40. Buzzi MG, Dimitriadou V, Theoharides TC, & Moskowitz MA (1992) 5-Hydroxytryptamine receptor agonists for the abortive treatment of vascular headaches block mast cell, endothelial and platelet activation within the rat dura mater after trigeminal stimulation *Brain Res* 583, 137-149.
41. Rozniecki JJ, Dimitriadou V, Lambracht-Hall M, Pang X, & Theoharides TC (1999) Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell-neuron interactions in vitro and in vivo *Brain Res* 849, 1-15.
42. Levy D, Burstein R, Kainz V, Jakubowski M, & Strassman AM (2007) Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache *Pain* 130, 166-176.
43. Milner PM (1958) Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leao *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 10, 705.
44. Saito K, Markowitz S, & Moskowitz MA (1988) Ergot alkaloids block neurogenic extravasation in dura mater: proposed action in vascular headaches *Ann Neurol* 24, 732-737.
45. Goadsby PJ & Edvinsson L (1993) The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats *Ann Neurol* 33, 48-56.
46. Moskowitz MA & Macfarlane R (1993) Neurovascular and molecular mechanisms in migraine headaches *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 5, 159-177.
47. Pietrobon D (2005) Migraine: new molecular mechanisms *Neuroscientist* 11, 373-386.

48. Bianchi ME & Manfredi A (2004) Chromatin and cell death *Biochim Biophys Acta* 1677, 181-186.
49. Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, Yang R, Ochani M, Qiang X, Harris HE, Czura CJ, Wang H, Ulloa L, *et al.* (2003) Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1 *Mol Med* 9, 37-45.
50. Yang QW, Wang JZ, Li JC, Zhou Y, Zhong Q, Lu FL, & Xiang J (2009) High-mobility group protein box-1 and its relevance to cerebral ischemia *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 243-254.
51. Ferrari MD (1998) Migraine *Lancet* 351, 1043-1051.
52. James MF, Smith JM, Boniface SJ, Huang CL, & Leslie RA (2001) Cortical spreading depression and migraine: new insights from imaging? *Trends Neurosci* 24, 266-271.
53. Fabricius M, Fuhr S, Bhatia R, Boutelle M, Hashemi P, Strong AJ, & Lauritzen M (2006) Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex *Brain* 129, 778-790.
54. Strong AJ, Fabricius M, Boutelle MG, Hibbins SJ, Hopwood SE, Jones R, Parkin MC, & Lauritzen M (2002) Spreading and synchronous depressions of cortical activity in acutely injured human brain *Stroke* 33, 2738-2743.
55. Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, Bhatia R, Major S, Drenckhahn C, Lehmann TN, Sarrafzadeh A, Willumsen L, Hartings JA, *et al.* (2006) Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations *Brain* 129, 3224-3237.
56. Moskowitz MA, Nozaki K, & Kraig RP (1993) Neocortical spreading depression provokes the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms *J Neurosci* 13, 1167-1177.
57. Iadecola C (2002) From CSD to headache: a long and winding road *Nat Med* 8, 110-112.
58. Gursoy-Ozdemir Y, Qiu J, Matsuoka N, Bolay H, Bempohl D, Jin H, Wang X, Rosenberg GA, Lo EH, & Moskowitz MA (2004) Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9 *J Clin Invest* 113, 1447-1455.
59. Bures J, Buresova O, Weiss T, & Fifkova E (1963) Excitability changes in non-specific thalamic nuclei during cortical spreading depression in the rat *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 15, 73-83.
60. Fifková E, Syka, J. (1964) Relationships between cortical and striatal spreading depression in rat *Experimental Neurology* 9, 355-366.
61. Fifkova E & Bures J (1964) Spreading depression in the mammalian striatum *Arch Int Physiol Biochim* 72, 171-179.
62. Krivanek J & Fifkova E (1965) The value of ultramicro-analysis of lactic acid in tracing the penetration of Leao's cortical spreading depression to subcortical areas *J Neurol Sci* 2, 385-392.

63. Caggiano AO, Breder CD, & Kraig RP (1996) Long-term elevation of cyclooxygenase-2, but not lipoxygenase, in regions synaptically distant from spreading depression *J Comp Neurol* 376, 447-462.
64. Arabia AM, Shen PJ, & Gundlach AL (1998) Increased striatal proenkephalin mRNA subsequent to production of spreading depression in rat cerebral cortex: activation of corticostriatal pathways? *Brain Res Mol Brain Res.* 61, 195-202.
65. Henning EC, Meng X, Fisher M, & Sotak CH (2005) Visualization of cortical spreading depression using manganese-enhanced magnetic resonance imaging *Magn Reson Med* 53, 851-857.
66. Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, & Monyer H (2003) Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13644-13649.
67. Lai CP, Bechberger JF, Thompson RJ, MacVicar BA, Bruzzone R, & Naus CC (2007) Tumor-suppressive effects of pannexin 1 in C6 glioma cells *Cancer Res* 67, 1545-1554.
68. Ebihara L, Liu X, & Pal JD (2003) Effect of external magnesium and calcium on human connexin46 hemichannels *Biophys J* 84, 277-286.
69. Bruzzone R, Barbe MT, Jakob NJ, & Monyer H (2005) Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes *J Neurochem* 92, 1033-1043.
70. Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, *et al.* (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function *J Neurosci* 28, 264-278.
71. Lecoecur H (2002) Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases *Exp Cell Res* 277, 1-14.
72. Suzuki T, Fujikura K, Higashiyama T, & Takata K (1997) DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy *J Histochem Cytochem* 45, 49-53.
73. Moore A, Donahue CJ, Bauer KD, & Mather JP (1998) Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death *Methods Cell Biol.* 57, 265-278.
74. Muller S, Ronfani L, & Bianchi ME (2004) Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function *J Intern Med* 255, 332-343.
75. Bianchi ME (2004) Significant (re)location: how to use chromatin and/or abundant proteins as messages of life and death *Trends Cell Biol* 14, 287-293.
76. Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtlander T, Ferrier P, Ferrari S, & Bianchi ME (1999) The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice *Nat Genet* 22, 276-280.
77. Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Muller S, Resnati M, Sanvito F, Arrigoni G, & Bianchi ME (2001) The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear

- protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells *J Cell Biol* 152, 1197-1206.
78. Huttunen HJ & Rauvala H (2004) Amphoterin as an extracellular regulator of cell motility: from discovery to disease *J Intern Med* 255, 351-366.
 79. Parkkinen J, Raulo E, Merenmies J, Nolo R, Kajander EO, Baumann M, & Rauvala H (1993) Amphoterin, the 30-kDa protein in a family of HMG1-type polypeptides. Enhanced expression in transformed cells, leading edge localization, and interactions with plasminogen activation *J Biol Chem* 268, 19726-19738.
 80. Phair RD, Scaffidi P, Elbi C, Vecerova J, Dey A, Ozato K, Brown DT, Hager G, Bustin M, & Misteli T (2004) Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins *Mol Cell Biol* 24, 6393-6402.
 81. Scaffidi P, Misteli T, & Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation *Nature* 418, 191-195.
 82. Czura CJ, Yang H, & Tracey KJ (2003) High mobility group box-1 as a therapeutic target downstream of tumor necrosis factor *J Infect Dis* 187 Suppl 2, S391-396.
 83. Kim JB, Sig Choi J, Yu YM, Nam K, Piao CS, Kim SW, Lee MH, Han PL, Park JS, & Lee JK (2006) HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain *J Neurosci* 26, 6413-6421.
 84. Muller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, Beltrame M, & Bianchi ME (2001) New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal *EMBO J* 20, 4337-4340.
 85. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, Fenton MJ, Tracey KJ, & Yang H (2006) HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2 *Shock* 26, 174-179.
 86. van Zoelen MA, Yang H, Florquin S, Meijers JC, Akira S, Arnold B, Nawroth PP, Bierhaus A, Tracey KJ, & van der Poll T (2009) Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo *Shock* 31, 280-284.
 87. Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, & Marriott I (2003) Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products *Glia* 43, 281-291.
 88. Lafon M, Megret F, Lafage M, & Prehaud C (2006) The innate immune facet of brain: human neurons express TLR-3 and sense viral dsRNA *J Mol Neurosci* 29, 185-194.
 89. Ma Y, Li J, Chiu I, Wang Y, Sloane JA, Lu J, Kosaras B, Sidman RL, Volpe JJ, & Vartanian T (2006) Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis *J Cell Biol* 175, 209-215.

90. Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, *et al.* (2007) Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13798-13803.
91. Stevens SL, Ciesielski TM, Marsh BJ, Yang T, Homen DS, Boule JL, Lessov NS, Simon RP, & Stenzel-Poore MP (2008) Toll-like receptor 9: a new target of ischemic preconditioning in the brain *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1040-1047.
92. Lu YC, Yeh WC, & Ohashi PS (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway *Cytokine* 42, 145-151.
93. Arumugam TV, Okun E, Tang SC, Thundyil J, Taylor SM, & Woodruff TM (2009) Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury *Shock* 32, 4-16.
94. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, *et al.* (2005) The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion *J Exp Med* 201, 1135-1143.
95. Nguyen MD, Julien JP, & Rivest S (2002) Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 3, 216-227.
96. Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, & Lizasoain I (2007) Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke *Circulation* 115, 1599-1608.
97. Yang QW, Li JC, Lu FL, Wen AQ, Xiang J, Zhang LL, Huang ZY, & Wang JZ (2008) Upregulated expression of toll-like receptor 4 in monocytes correlates with severity of acute cerebral infarction *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1588-1596.
98. Cao CX, Yang QW, Lv FL, Cui J, Fu HB, & Wang JZ (2007) Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice *Biochem Biophys Res Commun* 353, 509-514.
99. Zuany-Amorim C, Hastewell J, & Walker C (2002) Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases *Nat Rev Drug Discov* 1, 797-807.
100. Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 49-62.
101. Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, & Baltimore D (2003) NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior *Nat Neurosci* 6, 1072-1078.
102. Nabel GJ & Verma IM (1993) Proposed NF-kappa B/I kappa B family nomenclature *Genes Dev* 7, 2063.
103. Grilli M & Memo M (1999) Nuclear factor-kappaB/Rel proteins: a point of convergence of signalling pathways relevant in neuronal function and dysfunction *Biochem Pharmacol* 57, 1-7.

104. Sanz O, Acarin L, Gonzalez B, & Castellano B (2002) NF-kappaB and IkappaBalpha expression following traumatic brain injury to the immature rat brain *J Neurosci Res* 67, 772-780.
105. Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, & Camandola S (2000) Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity *J Neurochem* 74, 443-456.
106. Nelson DE, Ihekweba AE, Elliott M, Johnson JR, Gibney CA, Foreman BE, Nelson G, See V, Horton CA, Spiller DG, *et al.* (2004) Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression *Science* 306, 704-708.
107. Voss LJ, Melin S, Jacobson G, & Sleight JW (2010) Role of Cx36 gap junction modulation in general anaesthetic anticonvulsant action. *Eur J Pharmacol* 643, 58-62.
108. Schreiber AB, Hrinda ME, Newman J, Tarr GC, D'Alisa R, & Curry WM (1989) Removal of viral contaminants by monoclonal antibody purification of plasma proteins *Curr Stud Hematol Blood Transfus*, 146-153.
109. Unal Cevik I & Dalkara T (2003) Intravenously administered propidium iodide labels necrotic cells in the intact mouse brain after injury *Cell Death Differ* 10, 928-929.
110. Dehbandi S, Speckmann EJ, Pape HC, & Gorji A (2008) Cortical spreading depression modulates synaptic transmission of the rat lateral amygdala *Eur J Neurosci* 27, 2057-2065.
111. Silverman WR, de Rivero Vaccari JP, Locovei S, Qiu F, Carlsson SK, Scemes E, Keane RW, & Dahl G (2009) The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes *J Biol Chem* 284, 18143-18151.
112. Pisetsky DS, Erlandsson-Harris H, & Andersson U (2008) High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease *Arthritis Res Ther* 10, 209.
113. Faraco G, Fossati S, Bianchi ME, Patrone M, Pedrazzi M, Sparatore B, Moroni F, & Chiarugi A (2007) High mobility group box 1 protein is released by neural cells upon different stresses and worsens ischemic neurodegeneration in vitro and in vivo *J Neurochem* 103, 590-603.
114. Kim JB, Lim CM, Yu YM, & Lee JK (2008) Induction and subcellular localization of high-mobility group box-1 (HMGB1) in the postischemic rat brain *J Neurosci Res* 86, 1125-1131.
115. Qiu J, Nishimura M, Wang Y, Sims JR, Qiu S, Savitz SI, Salomone S, & Moskowitz MA (2008) Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 927-938.
116. Pedrazzi M, Patrone M, Passalacqua M, Ranzato E, Colamassaro D, Sparatore B, Pontremoli S, & Melloni E (2007) Selective proinflammatory activation of astrocytes by high-mobility group box 1 protein signaling *J Immunol* 179, 8525-8532.

117. Maroso M, Balosso S, Ravizza T, Liu J, Aronica E, Iyer AM, Rossetti C, Molteni M, Casalgrandi M, Manfredi AA, *et al.* (2010) Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures *Nat Med* 16, 413-419.
118. Jander S, Schroeter M, Peters O, Witte OW, & Stoll G (2001) Cortical spreading depression induces proinflammatory cytokine gene expression in the rat brain *J Cereb Blood Flow Metab* 21, 218-225.
119. Kunkler PE, Hulse RE, & Kraig RP (2004) Multiplexed cytokine protein expression profiles from spreading depression in hippocampal organotypic cultures *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 829-839.
120. Xu HL, Mao L, Ye S, Paisansathan C, Vetri F, & Pelligrino DA (2008) Astrocytes are a key conduit for upstream signaling of vasodilation during cerebral cortical neuronal activation in vivo *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H622-632.
121. Girouard H, Bonev AD, Hannah RM, Meredith A, Aldrich RW, & Nelson MT (2010) Astrocytic endfoot Ca^{2+} and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3811-3816.

