

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
NÖROLOJİK BİLİMLER VE PSİKİYATRİ ENSTİTÜSÜ**

**KORTİKAL YAYILAN DEPOLARİZASYON İLE TETİKLENEN
NÖRO-PARAİNFLAMASYONDA NLRP2 İNFLAMAZOMUNUN
ROLÜ**

Doç. Dr. Eda DERLE ÇİFTÇİ

**TEMEL NÖROLOJİK BİLİMLER PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2024

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
NÖROLOJİK BİLİMLER VE PSİKİYATRİ ENSTİTÜSÜ**

**KORTİKAL YAYILAN DEPOLARİZASYON İLE TETİKLENEN
NÖRO-PARAİNFLAMASYONDA NLRP2 İNFLAMAZOMUNUN
ROLÜ**

Doç. Dr. Eda DERLE ÇİFTÇİ

**TEMEL NÖROLOJİK BİLİMLER PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI:
Prof. Dr. Hülya KARATAŞ KURŞUN**

ANKARA

2024

ONAY SAYFASI**KORTİKAL YAYILAN DEPOLARİZASYON İLE TETİKLENEN NÖRO-
PARAİNFLAMASYONDA NLRP2 İNFLAMAZOMUNUN ROLÜ****Eda DERLE ÇİFTÇİ****Danışman: Prof. Dr. Hülya KARATAŞ KURŞUN**

Bu tez çalışması 28.6.2024 tarihinde jürimiz tarafından
“Temel Nörolojik Bilimler Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof .Dr. Münire Kılınç
Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Fadime İrsel Tezer Filil
Hacettepe Üniversitesi

Doç. Dr. Cahide Banu Tel
Hacettepe Üniversitesi

Doç. Dr. Gül Yalçın Çakmaklı
Hacettepe Üniversitesi

Doç. Dr. Aslıhan Taşkiran Sağ
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav
Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun
bulunmuştur.

29 Haziran 2024

Prof. Dr. Müge Yemişçi Özkan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- ✕ Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

29.07.2014

(İmza)

Öğrencinin Adı SOYADI

ⁱ“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanım Prof Dr. Hülya KARATAŞ KURŞUN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Eda DERLE ÇİFTÇİ

TEŞEKKÜR

Doktora programına başlamamda ve sürdürmemde bana gösterdikleri, destek ve sabır için başta sevgili ailem ve Başkent Üniversitesi Nöroloji Ana Bilim Dalı üyelerine sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda bana verdiği destek için sevgili tez danışmanım Prof Dr. Hülya Karataş Kurşun'a teşekkür ederim. Tüm eğitimimiz boyunca bilgi ve desteğini esirgemeyen Prof Dr. Turgay Dalkara'ya teşekkürlerimi sunarım. Doktora program boyunca eğitime verdikleri destek ve emekleri için Prof. Dr. Emine Eren Koçak, Doç Dr. Evren Erdener ve Prof. Dr. Müge Yemişçi Özkan'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora programının bana kattığı en muhteşem varlıklar, sevgili arkadaşlarıma, başvurduğum ilk günden itibaren yanımda olan biricik arkadaşım Aslıhan Bahadır Varol'a, hayatıma varlıklarıyla anlam katan Meftun Doğa Başaran ve Gökçe Gürler'e her daim beraber olmak dileğiyle sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ekip arkadaşlarım sevgili Beyza Türken ve Onur Çağın Gürlek'e bana gösterdikleri sevgi ve destek için teşekkür ederim.

Tüm çalışmalarım boyunca bana her zaman destek veren, bilgi ve emeklerini benden esirgemeyen sevgili Dr. Nebiye Buket Dönmez, Dr. Melike Sever Bahçekapılı, Dr. Canan Çakır Aktaş ve Dr. Nevin Belder'a teşekkür ederim.

Doktora program boyunca birlikte çalıştığımız tüm öğrenci arkadaşlarıma bana gösterdikleri sevgi, destek ve sabır için teşekkür ederim.

Laboratuvarda imkansız olduran, yardımlarını ve birçok teknik konu ile ilgili bilgilerini bizden esirgemeyen sevgili teknisyenimiz Mesut Fırat'a, her başımız sıkıştığında kapılarını çaldığımız bizden gülyüzlerini ve yardımlarını esirgemeyen enstitü sekreterlerimiz Hülya Erener, Tuğba Sarıtaş ve Meltem Anlı'ya, ve yardımcımız Zafer Akdoğan'a teşekkür ederim.

Çalışmanın yapılabilmesinde verdikleri kapsamlı proje desteğiyle katkıda bulunan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne teşekkür ederim.

ÖZET

Derle E, Kortikal Yayılan Depolarizasyon İle Tetiklenen Nöro-Parainflamasyonda Nlrp2 İnflamazomunun Rolü, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Nörolojik Bilimler (Neuroscience) Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2024.

Migren, toplumda yaygın olarak görülen bir baş ağrısı sendromudur. Patofizyolojisinde trigeminovasküler sistemin aktivasyonu sonucu ortaya çıkan inflamasyonun önemli rol oynamaktadır. Kortikal yayılan depolarizasyon (KYD) migren aurasının elektrofizyolojik korelatı olarak kabul edilmektedir. KYD tetiklenmesi ile nöronal aktivitede artma, nöronal panneksin 1 kanallarında açılma ve astrositlerde NF- κ B üzerinden proinflamatuvar bir yanıt ortaya çıkmaktadır. Deneysel çalışmalarda ATP ile uyarılan panneksin 1 kanalı ve pürinerjik reseptör aktivasyonu sonucu inflamazom kompleksinin oluştuğu gösterilmiştir. İnflamazom ailesinden olan NLRP2'nin astrositlerde ifadenmesinin olduğu ve inflamazom kompleksi oluşturarak nöroinflamasyona katkıda bulunduğu birkaç yayında gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı optogenetik olarak uyarılabilen transgenic Thy1-ChR2-YFP farelerde noninvaziv olarak KYD tetiklenmesiyle ortaya çıkan nöroinflamasyonda NLRP2 inflamazom kompleksinin rolünü incelemektir. KYD'yi takiben 5 farklı zaman noktasında (15. dakika, 5., 24., 48. ve 72. saat) beyin dokusu elde edilmiş ve kesitlerdeki NLRP2 işaretlenme özellikleri immonofloresan işaretleme ile incelenmiş, NLRP2'nin hangi hücrelerde ifade edildiği gösterilmiştir. Kontrol ve naif grupta NLRP2 ifadenmesi kortikal ve subkortikal alanlarda NeuN (+) nöronal hücrelerde belirgin iken KYD sonrası 15.dk, 5. ve 24. saatte immünoreaktivitede belirgin azalma saptanmış olup, 48. ve 72. saatte ise kontrollerle benzer düzeylerde gözlenmiştir. Astrosit işaretleyicisi S100 β ile NLRP2'nin belirgin olarak daha az oranda ko-lokalize olduğu gösterilmiştir. Aynı zaman noktalarında C57/BL6 farelerde KYD 1M KCl ile tetiklenerek Western blotlama (WB) ile NLRP2 protein analizi için korteksler alınmıştır. WB'de protein düzeylerinde anlamlı olmayan ancak immünofloresan görüntüleme sonuçlarına benzer olarak KYD erken dönem beyinlerinde naif beyinlere göre NLRP2 protein düzeyinde azalma saptanmıştır. Bu çalışma bildiğimiz kadarıyla literatürde migren aurası korelatı olarak kabul edilen KYD sonrası ortaya çıkan parankimal nöroinflamasyonda NLRP2 inflamazomunun zamansal değişimini inceleyen ilk çalışmadır. KYD sonrası nöronlarda NLRP3 inflamazom artışı ile ters olan bu çalışma sonucu NLRP2'nin NLRP3'ün negatif düzenleyicisi olabileceği yönünde bir sonuç olarak yorumlanabilir. Daha ileri araştırmalarla NLRP2'nin farmakolojik veya genetik manipülasyonu ile nöroinflamasyondaki rolünü belirlemek mümkün olabilir.

Anahtar Sözcükler: NLRP2, inflamazom, migren, kortikal yayılan depolarizasyon, nöro-parainflamasyon

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (TSA-2020-18568) tarafından desteklenmektedir

ABSTRACT

Derle E, The Role of NLRP2 Inflammasome in Neuro-Parainflammation Induced By Cortical Spreading Depolarization, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Basic Neurological Sciences (Neuroscience) Program, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2024. Migraine is a common headache syndrome in the general population. Inflammation resulting from activation of the trigeminovascular system plays an important role in its pathophysiology. Cortical spreading depolarization (CSD) is accepted as the electrophysiological correlate of migraine aura. It is thought that the triggering of CSD leads to an increase in neuronal activity, opening of neuronal pannexin 1 channels and a proinflammatory response in astrocytes via NF- κ B. Experimental studies have shown that ATP-induced pannexin 1 channel and purinergic receptor activation results in the formation of an inflammasome complex. It has been revealed in the literature that NLRP2, a member of the inflammasome family, is expressed in astrocytes and contributes to neuroinflammation by forming an inflammasome complex. The aim of this study was to investigate the role of NLRP2 inflammasome complex in neuroinflammation induced by noninvasive induction of CSD in optogenetically inducible transgenic Thy1-ChR2-YFP mice. Brain tissue was obtained at 5 different time points (15-min, 5-, 24-, 48- and 72-hours) following CSD and NLRP2 labeling properties in the sections were examined by immunofluorescence labeling and it was shown in which cells NLRP2 was expressed. While NLRP2 expression was prominent in NeuN (+) neuronal cells in the cortical and subcortical areas in the control and naive groups, a significant decrease in immunoreactivity was detected at 15-min, 5- and 24-hours after CSD, and similar levels were observed at 48- and 72-hours. It was shown that NLRP2 co-localized significantly less with the astrocyte marker S100 β . At the same time points, CSD was induced with 1M KCl in C57/BL6 mice and cortices were taken for protein analysis by Western blotting. Similar to the results of immunofluorescence imaging, NLRP2 protein levels were found to be decreased in early CSD brains compared to naive brains, although results were not significant. To the best of our knowledge, this is the first study in the literature investigating the temporal changes of NLRP2 inflammasome in parenchymal neuroinflammation after CSD, which is accepted as a correlate of migraine aura. The result of this study, which is contrary to the increase in NLRP3 inflammasome in neurons after CSD, can be interpreted as a result that NLRP2 may be a negative regulator of NLRP3. With further research, it may be possible to determine the role of NLRP2 in neuroinflammation by pharmacologic or genetic manipulation.

Key Word: NLRP2, inflammasome, migraine, cortical spreading depolarization, neuro-parainflammation

This study is supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (TSA-2020-18568)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Migren ve Klinik Özellikleri	4
2.2 Migren ve trigeminovasküler sistem	6
2.3 Deneysel Migren Modelleri	9
2.4 Migren ve Kortikal Yayılan Depolarizasyon	12
2.5 Migren, Nöroinflamasyon ve Astrositlerin Rolü	15
2.6 İnflamazomlar	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1 Deneysel Hayvanlarının Barındırılması	33
3.2 Anestezi ve Yaşamsal Bulguların Takibi	33
3.3 Optogenetik Uyarım Yapılacak Farelerin Genotiplemesi	35
3.4 Optogenetik Yolla Kortikal Yayılan Depolarizasyon Dalgasının Uyarımı ve Beyin Dokusunun Eldesi	38
3.5 İmmünoflöresan İşaretleme	40
3.6 Western Blotlama için Beyin Eldesine Yönelik Yapılan Deneyler	41
3.7 Elde Edilen Görüntülerin Analizi	45
3.8 İstatistiksel Yöntem	45
4. SONUÇLAR	46
4.1 NLRP2 ifadenin immünoflöresan yöntem ile gösterilmesi	46
4.2 NLRP2 (+) hücrelerin zaman noktalarına göre oranlarının belirlenmesi	56
4.3 Western Blotlama ile elde edilen protein analizleri	63
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
7. KAYNAKLAR	72
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Tez Verilerinden Üretilen Makale	
EK-3: Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Araşidonik asit
AD	Alzheimer hastalığı
CFA	Freund adjuvant
CGRP	Kalsitonin gen ilişkili peptid
ChR2	Kanalarodopsin 2
COX	Siklooksijenaz
EtBr	Etidyum bromür
HMGB1	‘High mobility group box 1’
IL-1B	İnterlökin 1 beta
IL-18	İnterlökin 18
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LC	Lokus seruleus
KYD	Kortikal yayılan depolarizasyon
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NLRP	Nod-benzeri reseptör proteini
OGD	Oksijen glukoz deprivasyonu
PAG	Periaküaduktal gri cevher
PBS	Fosfatla tamponlu salin
PVS	Perivasküler boşluk
RS	Retrosplenial
ROS	Reaktif oksijen türleri
RVM	Rostral ventromedial medulla
SuS, SSN	Superior salivatuvar nucleus
TAE	Tris-asetat-EDTA
TBS	Trisle Tamponlu Salin
TCC	Trigeminoservikal kompleks
TG	Trigeminal gangliyon

ŞEKİLLER	Sayfa
2.1 Migren fazları ve ilişkili belirtiler	4
2.2 Trigeminovasküler sistem anatomisi	7
2.3 Trigeminovasküler sistemdeki anatomik yapılar ile semptomların ilişkisi	8
2.4 Deneysel migren modellerinin şematik anlatımı	10
2.5 Thy1-ChR2-YFP transgenik hayvanında ChR2 eksprese eden kortikal ve subkortikal yapılar	11
2.6 Deneysel migren modelleri ile ortaya çıkan yanıtların şematize anlatımı	12
2.7 Leao tarafından tanımlanan tavşan beyinde oluşturulmuş KYD kaydı	13
2.8 KYD; risk faktörleri, tetikleyicileri, mekanizmaları ve fonksiyonel sonuçları	14
2.9 Kortikal yayılan depolarizasyonun tetiklenmesi ile ortaya çıkan parankimal inflamatuvar yanıt ve neden olduğu sinyalizasyon yolağının şematik çizimi	15
2.10 Nöroinflamasyonun pozitif ve negatif özellikleri	17
2.11 PET-MRG çalışmasında migren hastalarının beyinlerinde sağlıklı kontrollere göre inflamatuvar tutulumun anlamlı olarak farklı olduğu bölgeler	19
2.12 KYD’de nöron ve astrositlerin sinaptik fizyolojik aktivitesi	21
2.13 Kortikal yayılan depolarizasyonda astrositlerin rolünün şematik anlatımı	22
2.14 İnflamazom ve inflamazom kompleksinin yapısı	24
2.15 NF- κ B sinyalizasyonu ve inflamazom aktivasyonu	26
2.16 NLRP2’nin konakçı savunması ve inflamasyondaki fonksiyonları	28
2.17 NLRP2’nin çeşitli hastalıklarda görülen ortak ve farklı mekanizmalarla etkileri	29
2.18 ATP ile uyarılan pürinerjik reseptörler ve NLRP2 inflamazom yolağı ilişkisi	31

3.1	Tez sırasında immünoflöresan işaretleme için yapılan deneylerin özeti	34
3.2	Tez sırasında western blot için yapılan deneylerin özeti	35
3.3	Thy1-ChR2-YFP genotipi taşıyan farelerin belirlenmesi	38
3.4	Optogenetik uyarım sonucu kaydedilen Kortikal Yayılan Depolarizasyon dalgasının örneği	39
3.5	KCl ile yapılan KYD uyarımı denek düzeneği	43
4.1	NLRP2 immünoreaktivitesinin NeuN (+) hücrelerde KYD'den sonraki 15. dakikada gösterilmesi	47
4.2	NLRP2 immünoreaktivitesinin s100β (+) hücrelerde KYD'den sonraki 15. dakikada gösterilmesi	48
4.3	NLRP2 immünoreaktivitesinin NeuN (+) hücrelerde KYD'den sonraki 5. saatte gösterilmesi	49
4.4	NLRP2 immünoreaktivitesinin s100β (+) hücrelerde KYD'den sonraki 5. saatte gösterilmesi	50
4.5	NLRP2 immünoreaktivitesinin NeuN (+) hücrelerde KYD'den sonraki 24. saatte gösterilmesi	51
4.6	NLRP2 immünoreaktivitesinin s100β (+) hücrelerde KYD'den sonraki 24. saatte gösterilmesi	52
4.7	NLRP2 immünoreaktivitesinin NeuN (+) hücrelerde KYD'den sonraki 48. saatte gösterilmesi	53
4.8	NLRP2 immünoreaktivitesinin s100β (+) hücrelerde KYD'den sonraki 48. saatte gösterilmesi	54
4.9	NLRP2 immünoreaktivitesinin NeuN (+) hücrelerde KYD'den sonraki 72. saatte gösterilmesi	55
4.10	NLRP2 immünoreaktivitesinin s100β (+) hücrelerde KYD'den sonraki 72. saatte gösterilmesi	56
4.11	Zaman noktalarına göre NLRP2 (+) / NeuN (+) hücre oranları	59
4.12	Zaman noktalarına göre NLRP2 (+) / Hoechst (+) hücre oranları	60

4.13 Zamana göre NLRP2 (+) / NeuN (+) hücre sayılarının değişim trendi	61
4.14 Zamana göre NLRP2 (+) / Hoechst (+) hücre sayılarının değişim trendi	61
4.15 NLRP2 immünoreaktivitesinin NeuN (+) hücrelerde KYD sonrası zamansal değişimi	62
4.16 Western Blotlama ile NLRP2 ve β -aktin için elde edilen bant örnekleri	63
4.17 Western Blotlama ile deney gruplarında NLRP2 düzeylerinin karşılaştırılması	64

TABLÖLAR	Sayfa
2. 1 Migren Tanı Kriterleri	6
3. 1 İmmünoölöresan işaretleme için yapılan deneylerde zaman noktalarına göre fare sayısı ve dağılımı	41
3. 2 Western Blot Görüntüleme için yapılan deneylerin zaman noktalarına göre denek sayısı ve dağılımı.	43
4. 1 Sham ve KYD gruplarında NLRP2 (+) / NeuN (+) oranı.	57
4. 2 Sham ve KYD gruplarında NLRP2 (+) / Hoechst (+) hücre oranı.	58

1. GİRİŞ

Migren toplumda yaygın olarak görülen bir baş ağrısı sendromudur. Baş ağrısı dışında beraberinde birçok nörolojik, gastrointestinal ve emosyonel değişiklikler de eşlik eder. Şiddetli ve uzun süreli ataklar nedeni ile günlük aktiviteleri etkileyebilmekte ve disabilite nedeni olabilmektedir. Migren atağı, klinik seyrinde aşamalı bir gidişat izlemektedir. Bu aşamalar içerisinde prodromal faz ve aurayı ağrı izlemektedir. Ağrı, karakteristik olarak genellikle tek taraflı, zonklar tarzda, 4-72 saat süren bir baş ağrısı olup, ağrıya kütanöz allodini de eşlik edebilir (1). Migren patofizyolojisi kesin olarak ortaya konulamamakla birlikte trigeminovasküler sistemin aktivasyonu sonucu ortaya çıkan inflamasyonun baş ağrısı ve beraberinde görülen semptomlara yol açtığı düşünülmektedir. Ağrının ortaya çıkmasındaki mekanizmada durayı inerve eden trigeminal sinir liflerinin uyarımı öne sürülmüştür. Durayı inerve eden trigeminal sinir liflerinin kortikal yayılan depolarizasyon (KYD) sonrası oluşan nörojenik inflamasyonla uyarılabildiği literatürde gösterilmiştir (2).

Kortikal yayılan depolarizasyon ilk olarak 1940'larda Leao tarafından tanımlanmış ve migren aurasının elektrofizyolojik bir korelatı olarak kabul edilmiştir (1, 3, 4). KYD nöronal ve glial depolarizasyona eşlik eden masif iyon akımı ve bunu takip eden nöronal aktivitede supresyon ile karakterize yavaş ilerleyici bir dalgadır (5). Oluşan KYD 'nin pial damarların çevresinde trigeminal lifleri uyararak parankimal inflamasyonu tetiklediği ve bu yolla baş ağrısını başlattığı düşünülmektedir (2).

Daha önce laboratuvarımızda KYD oluşumu ile birlikte nöronal panneksin 1 kanallarının açıldığı, bu sürecin kaspaz 1'i aktive ederek HMGB1 ('high mobility group box 1') ve interlökin-1 β (IL-1 β) salıverilmesine neden olduğu, bunun nükleer faktör-kappa B (NF- κ B)'nin astrositlerde çekirdeğe göçü ile siklooksijenaz (COX) ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) gibi inflamatuvar genlerin ekspresyonunda artışa ve sonuç olarak glia limitans ve meningeal perivasküler alana arakidonik asit (AA) ve potasyum salıverilmesi ile nörojenik inflamasyonun ortaya çıkmasına neden olduğu gösterilmiştir (2, 5). Ayrıca KYD uyarımı ile ortaya çıkan parankimal inflamasyonda inflamazom yolağının aktive olduğunu gösteren çalışmalarda mevcuttur. Ancak bu çalışmalarda daha çok nöronlarda eksprese olduğu bilinen NLRP3 inflamazomu üzerinde durulmuştur (6). Tek ve çoklu KYD ile nöronlarda NLRP3 inflamazomunun çok erken dönemde aktive olduğu ancak astrosit ve

mikroglialarda olmadığı gösterilmiştir (6). Ancak astrositlerin de KYD sonrası ortaya çıkan inflamasyonda rol oynadığına dair kanıtlar mevcuttur. Familial hemiplejik migren 1 (FHM1) fare modelinde bazal düzeyde astrosit ve mikroglia aktivasyonunun olduğu gösterilmiştir (7). Özellikle NLRP3 ün astrositlerde aktivasyonu olmadığının gösterilmesi ancak astrositlerin ortaya çıkan inflamasyonda yeri olduğunu gösteren kanıtlar dolayısı ile KYD’de farklı bir inflamazom üyesinin bu süreçte rolü olabileceğini düşündürmüştür.

KYD tetikleme yöntemleri genellikle invazif yöntemlerdir ve anestezi altındaki deney hayvanına kraniyotomiye takiben açılan kraniyal pencereye potasyum klorür (KCl) gibi ajanların uygulanması, iğne batırılması veya elektriksel uyarımı içerir. Bu yöntemler nöronları depolarize edebilmektedir fakat nöronlar, astrositler ve damar yapıları üzerine spesifik olmayan ve hasar veren etkileri de bulunmaktadır. Optogenetik yöntemlerin gelişmesiyle, uyarılması hedeflenen nöronlara kanalorodopsin geni (ChR2), viral vektörler kullanılarak veya transgenik yolla aktarılabilmekte ve bu nöronlar mavi ışık kaynağı kullanılarak uyarılabilmektedir (8-11). Bu yöntem invazif olmayan bir şekilde, bütünlüğü korunmuş kafatası üzerinden ve ayrıca anestezi altında olmayan deney hayvanlarında da nöron aktivitesinin uyarılmasını ve kontrol edilmesini mümkün kılmıştır (12, 13). Aynı zamanda diğer yöntemlerin yol açtığı olası uyarım artefaktlarını da ortadan kaldırılabilmektedir.

Bu çalışmada, diğer KYD uyarım yöntemlerinin neden olduğu etkileri ekarte etmek ve sadece KYD’nin neden olduğu nörojenik inflamasyonu incelemek amacıyla invaziv olmayan bir model olan ve dünyada birkaç laboratuvarında bulunan optogenetik yöntem kullanarak tetiklenen KYD’nin beyin parankiminde, NLRP2 inflamazom yolağı üzerine etkisinin incelenmesi planlanmıştır. NLRP2 inflamazomunun oluşumu KYD’ye bağlı oluşan nöro-parainflamasyonun ortaya çıkmasına mı yoksa baskılanmasına mı neden olmaktadır sorusuna yanıt aranmıştır. (11). KYD uyarımı ile nöronal inflamasyonun tetiklendiği, astrositlerde Nf-KB’nin çekirdeğe göçü ile ortaya çıkan sitokinlerin yayılımına katkı sağladığı literatürde ve enstitümüzde yapılan daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (2, 11, 14). NLRP2 astrosit kaynaklı olduğu düşünülen inflamazom ailesinin bir üyesidir. Hücre kültüründe ve fare beyin iskemi modelinde NLRP2’nin astrositlerde ifade edildiği saptanmıştır (15, 16). Buna karşın periferik ağrı modelinde dorsal kök ganglionunda küçük çaplı nöronlarda NLRP2

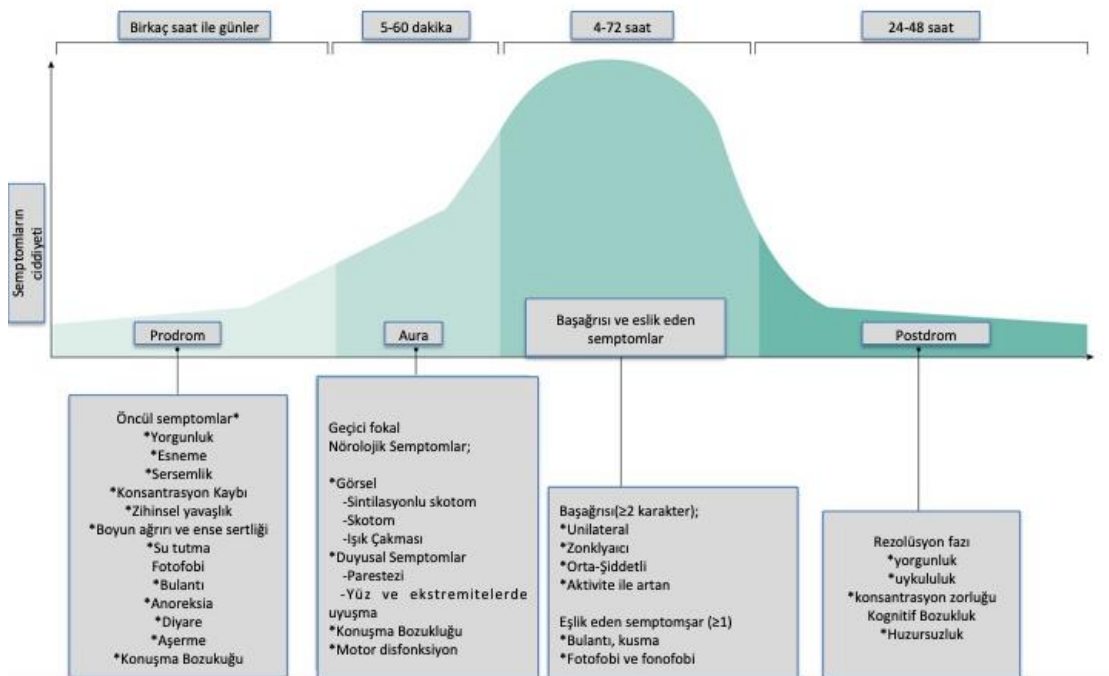
ifadesinin arttığı gözlenmiştir (17). Periferik ve santral sinir sistemine ait hücrelerde farklı yanıtlar oluşabileceği gibi, bu farklılık altta yatan tetikleyicinin farklılığı nedeni ile de olabilir. KYD ile NLRP2 ifadesinde nasıl bir değişiklik olacağı henüz gösterilmemiştir. Buna ek olarak NLRP2'nin NF-kB yolağı üzerine etkileri olduğu bilinmekle beraber KYD ile ortaya çıkan NF-kB aktivasyonu üzerine etkisi bilinmemektedir. Bu süreçte tek KYD sonrası NLRP2 inflamazomunun aktive olup olmadığı farklı zaman noktalarında (15 dk, 5 st, 24 st, 48 st, 72 st) incelemeler yapılarak ortaya konmaya çalışılmıştır. Böylece KYD'nin tetiklediği nöroinflamasyonda yer alabilecek bir yolağın belirlenmesi, migren patofizyolojisinin ve yeni tedavi hedeflerinin ortaya konulması ile literatüre katkı sunulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Migren ve Klinik Özellikleri

Migren toplumda sık görülen ve genç erişkinlerde en sık iş gücü kaybına yol açan hastalıklardan biridir. Toplumda prevalansı yaklaşık %15'tir (18). Kadınlarda erkeklere göre 3-4 kat daha sık görülür. Başlangıç yaşı sıklıkla genç erişkinlik döneminde olmakla beraber çocukluk çağına da görülmektedir (1). Dünyada en sık morbiditeye neden olan hastalıklar arasında ikinci sırada yer almaktadır. Global hastalık yükünün % 5,6'sını oluşturarak diğer bütün nörolojik hastalıkların toplamından daha büyük bir etkiye sahiptir. Avrupa'da migrenin sebep olduğu finansal maliyetin 50-110 milyar euro olduğu tahmin edilmektedir (19).

Migren klinik olarak şiddetli baş ağrısının ana belirti olduğu, otonomik, gastrointestinal ve emosyonel belirtilerin de eşlik ettiği bir semptomlar bütünüdür. Migrende klinik olarak 4 faz tanımlanmıştır. Bu fazlar prodrom, aura, baş ağrısı ve rezolüsyon fazlarıdır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Migren fazları ve ilişkili belirtiler (1).

Prodrom fazı hastaların %80'inden fazlasında görülen farklı sistemleri etkileyen öncü semptomlardır. Bu semptomlar baş ağrısı başlamadan saatler hatta günler öncesinde ortaya çıkabilir. Hastalarda yorgunluk, dikkat dağınıklığı, aşırma, diyare, boyun ağrısı, esneme gibi çok farklı semptomlar bu dönemde ortaya çıkabilmektedir (1). Prodrom fazından sonra eğer hastada var ise aura fazı ortaya çıkar. Migren hastalarının yaklaşık %15'inde aura bulunmaktadır ve sıklıkla görsel bulgularla kendini göstermektedir. Görsel auralardan sintilasyonlu skotom olarak adlandırılan ışık çakmaları ile karakterize aura migren için en özellikli olanlardandır. Bunun dışında görme alan kaybı, mikropsi, makropsi, renkli objeler görme gibi farklı görsel auralar da ortaya çıkabilir. Görsel dışında duyuşsal, motor, beyin sapı, retinal ya da konuşmayı etkileyen farklı kliniklerde aura olarak karşımıza çıkabilmektedir. Üçüncü fazda ise baş ağrısı ortaya çıkar. Genellikle zonklayıcı karakterde tek taraflı, fiziksel aktivite ile kötüleşen, 4-72 saat devam eden şiddetli ataklardır. Bu ataklara fonofobi, fotofobi, bulantı, kusma gibi semptomlar eşlik etmektedir. Bu atakların sonunda ise son faz olan rezolüsyon fazı ortaya çıkar. Bu dönemde hastada yorgunluk, konsantre olmakta zorluk gibi semptomlar görülebildiği gibi öfori ve yenilenmiş hissi gibi semptomlar da görülebilmektedir (1).

Migren tanısı klinik olarak temelde hastadan öğrenilen semptomların değerlendirilmesi ile konulur. Migren semptomları uluslararası baş ağrısı topluluğu (IHS) tarafından sınıflandırılmıştır ve kesin tanı için bu sınıflamada tanımlanan kriterleri karşılaması gerekir (Tablo 2. 1)(20). Migren tanısına yönelik objektif bir biyobelirteç yoktur. Ancak hastanın semptomları ve olası diğer tanılarının dışlanması ile tanı konulabilmektedir (20).

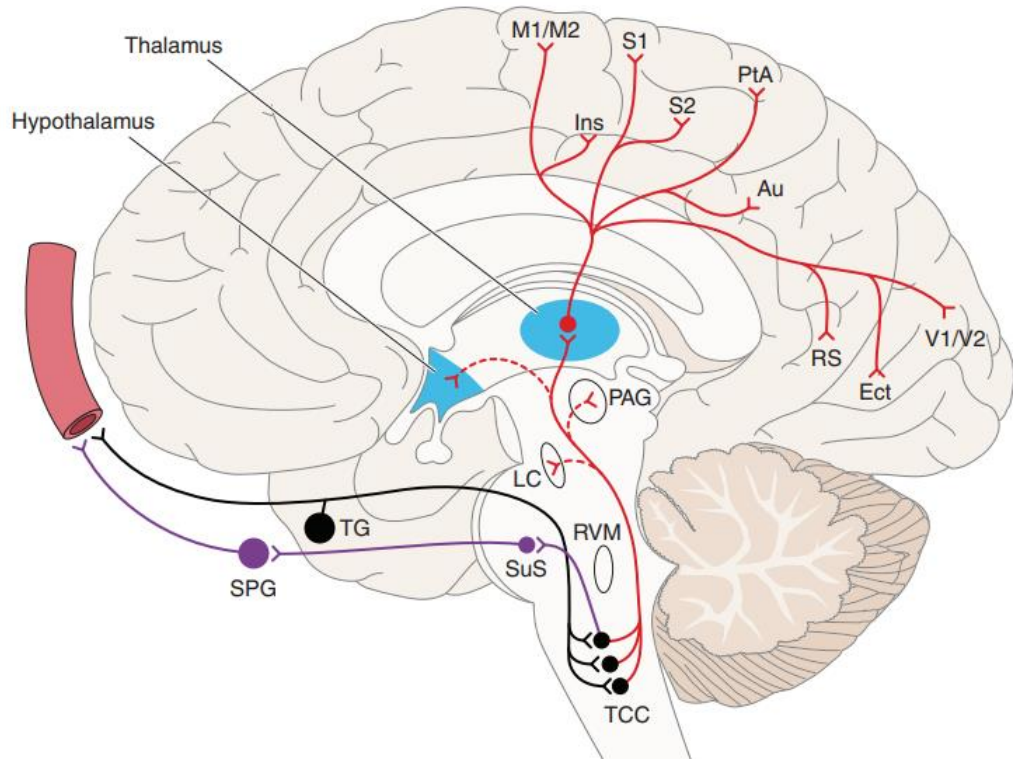
Tablo 2. 1 Migren Tanı Kriterleri

Aurasız migren	Auralı Migren
A. B–D kriterlerini karşılayan en az 5 atak B. Baş ağrısı atakları 4-72 saat (tedavisiz ya da yetersiz tedavi) C. Baş ağrısı aşağıdaki 4 özellikten ikisini göstermeli 1. Tek taraflı 2. Zonklayıcı karakterde 3. Orta-ciddi şiddette 4. Fiziksel aktivite ile artan ya da kaçınmaya yol açan D. Baş ağrısı sırasında en az 1 tanesi eşlik etmeli: 1. Bulantı ve /veya kusma 2. Fotofobi ve fonofobi E. Herhangi bir baş ağrısı tanısı ile daha iyi açıklanamaması	A. B and C kriterlerini sağlayan en az 2 atak B. 1 veya daha fazla tamamen düzelen aura semptomu: 1. Vizüel 2. Sensöriyel 3. Konuşma /dil 4. Motor 5. Beyinsapı 6. Retinal C. 6 özellikten 3'ü 1. En az 1 aura semptomunun 5 dakika içinde artması 2. İki ya da daha fazla aura semptomunun ardısıra ortaya çıkması 3. Her bir aura semptomu 5–60 dakikada düzelme gösterir 4. En az 1 aura semptomu tek taraflıdır 5. En az 1 aura semptomu pozitif olmalı 6. Baş ağrısı aura ile birlikte ya da 1 saat içinde ortaya çıkmalı D. Herhangi bir baş ağrısı tanısı ile daha iyi açıklanamaması

Uluslararası başağrısı topluluğunun 2018 yılında yayınlanan tanı kriterleri 3. versiyonu (20)

2.2 Migren ve trigeminovasküler sistem

Trigeminovasküler sistem trigeminal gangliyon (TG) nöronlarından başlayan ve duramater projesinde olan kalsitonin geni ile ilişkili peptitten (CGRP) zengin bir yolaktır (Şekil 2.2)(1).



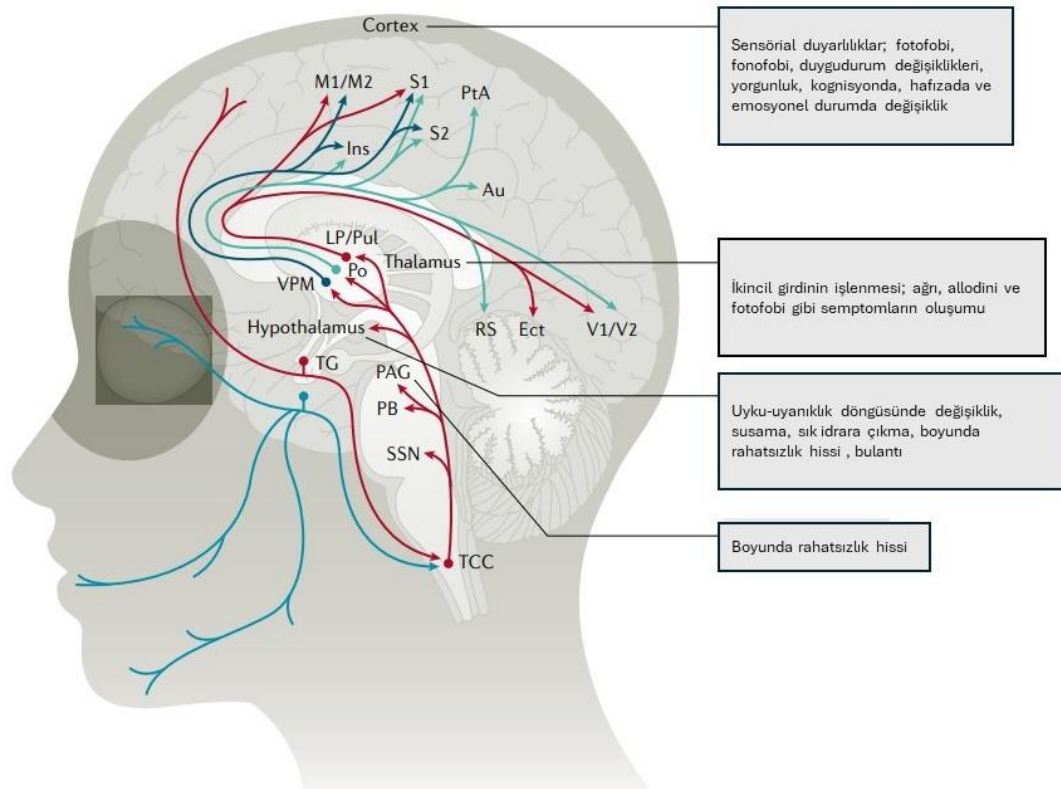
Şekil 2.2 Trigeminovasküler sistem anatomisi.

Migren patofizyolojisiinde rol oynayan nöral yollarlar. Baş ve boyundan gelen duyuşal trigeminal afferentler trigeminal gangliyondan geçtikten sonra trigeminoservikal komplekste ikincil seviye nöronlarla sinaps yaparlar. Buradan çıkan sinirler talamustan geçerek kortekse ulaşır. Bu yolların iletimi beyin sapındaki çeşitli çekirdekler (lokus seruleus, PAG, A11, RVM, SuS vb.) tarafından regüle edilmektedir (3).TG, trigeminal gangliyon; TCC, trigeminoservikal kompleks; LC lokus seruleus; PAG, periakvaduktal gri cevher; S1/S2; somatosensöriyel; M1/M2, primer ve sekonder motor; V1/V2 vizüel korteks; SPG, sfenopalatin gangliyon; PtA, parietal assosiasyon; RVM, rostral ventromedial medulla; RS, retrosplenial; Ect, ektorinal; SuS, superior salivatuvar nukleus.

Trigeminal gangliyondan orijin alan nosiseptif sinir lifleri pial, araknoid, dural damarları, superior sagital sinus ve orta serebral artere ve diğer büyük serebral arterleri çepeçevre sarar ve inerve eder. Bu yapıların, özellikle duranın, mekanik, kimyasal ya da elektriksel uyarımı ise ağrı ile sonuçlanmaktadır. Aynı zamanda bu yapıların uyarımı migrende görülen bulantı, fotofobi gibi diğer semptomlarla da ilişkilidir (1, 3)(Şekil 2.3). Trigeminoservikal kompleks (TCC) nöronlarının aksonal projeksiyonları beyin sapı, talamus ve hipotalamus nöronlarına nosiseptif sinyaller gönderirler ki bunun sonucu olarak duyuşal, otonomik, affektif, endokrin ve davranışsal cevaplar ortaya çıkar (1). Trigeminovasküler talamik nöronların insüler, motor, pariyetal, sensöriyel, odituar, vizüel ve olfaktor kortekse projeksiyonları da

ağrının şiddeti, lokalizasyonu gibi migrenin duyuşal ayırt edici özellikleri ile sakarlık, odaklanmada zorluk, transient amnezi ve allodini gibi çeşitli semptomlarla ilişkilidir (Şekil 2.3)(1).

Kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) migrende ana mediyatör olarak görülmekte ve önemli bir tedavi hedefi konumunda bulunmaktadır (21). TG stimülasyonunun CGRP ve P maddesi salıverilmesine neden olduğu deneysel olarak gösterilmiştir (1, 22). CGRP dura, TG, TCC, talamus ve periakuaduktal gri cevherde (PAG) trigeminovasküler nosisepsiyonun düzenlenmesi ve iletilmesini sağlamaktadır (1). Aynı zamanda CGRP'yi bloke eden tedavilerin migren atağını tedavi etmede etkili olmaları da bu molekülün migren patofizyolojisindeki yeri ve önemini vurgulayan kanıtlar arasındadır (1).



Şekil 2.3 Trigeminovasküler sistemdeki anatomik yapılar ile semptomların ilişkisi.

Migren santral ve periferik sinir sisteminin komponentlerinin fonksiyonlarında eş zamanlı ortaya çıkan değişiklikleri içemektedir. Bunun sonucunda birçok semptom bir arada ortaya çıkmaktadır. Örneğin üst servikal sinirlerin uyarımı boyun ağrısına neden olurken talamus ve bağlantılarının uyarımı allodiniye neden olmaktadır (1). TG, trigeminal gangliyon; TCC, trigeminoservikal kompleks; LC lokus seruleus; PAG, periakuaduktal gri cevher; S1/S2; somatosenseriye; M1/M2, primer ve sekonder motor; V1/V2 vizüel korteks; SPG, sfenopalatin ganglion; PtA, parietal assosiasyon;

RVM, rostral ventromedial medulla, RS, retrosplenial; Ect, ektorhinal; SSN, superior salivatuar nukleus

2.3 Deneyisel Migren Modelleri

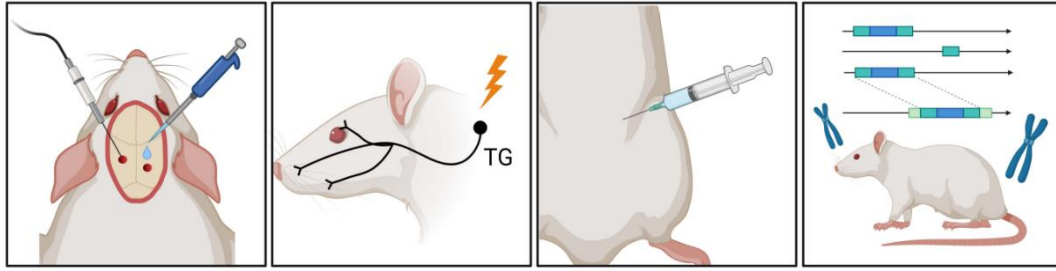
Migren patofizyolojisi net olarak ortaya konulamayan birçok faktörün öne sürüldüğü bir başağrısı sendromudur. Vasküler disfonksiyon, genetik faktörler, kortikal yayılan depolarizasyon, trigeminovasküler system aktivasyonu, inflamasyon ve oksidatif durumlar anahtar faktörler olarak gösterilmektedir (8).

Deneyisel modeller migren mekanizmalarını farklı yönlerden araştırma imkanı sağlamıştır. Bunlar arasında yer alan modeller aşağıda özetlenmiştir (Şekil 2.4).

Kranial stimülasyonun elektriksel uyarım ile sağlandığı modellerde trigeminal gangliyon elektriksel olarak uyarılmakta ve sonucunda dura materde plazma ekstrasvazyonu oluşmaktadır. Bu modelde uyarı parametreleri kontrol edilebilmekte bu da bize tekrarlanabilir ve kontrol edilebilir bir model sağlamaktadır (8). Trigeminal gangliyon dışında superior sagittal sinüsü inerve eden sinir terminalleri, transvers sinüs ya da orta meningeal arterin uyarımı da mümkündür (8, 9). Diğer bir uyarım yapılabilecek bölge de miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerini aktive ederek meningeal kan akımını artıran duramaterdir (8, 9).

Kranial stimülasyon, kimyasal olarak sağlandığı duramater uyarım modellerinde ise çeşitli irritan ve inflamatuvar maddelerin duramater üzerine uygulanması söz konusudur. Bu maddeler arasında komplet Freud adjuvanı, kapsaisin, inflamatuvar çorba sayılabilir (8).

Nitrogliserin uygulaması bir diğer migren modelidir. Uzun yıllardır kullanılmakta olan bu model migren benzeri semptomların oluşturulmasında ve migrenin fizyolojik ve semptomatik yönlerini taklit etmede başarılıdır (8). Bu modelde nitrogliserin nitrik oksijen sağlayıcısı olarak görev yapmaktadır (3).



Şekil 2.4 Deneyisel migren modellerinin şematik anlatımı.

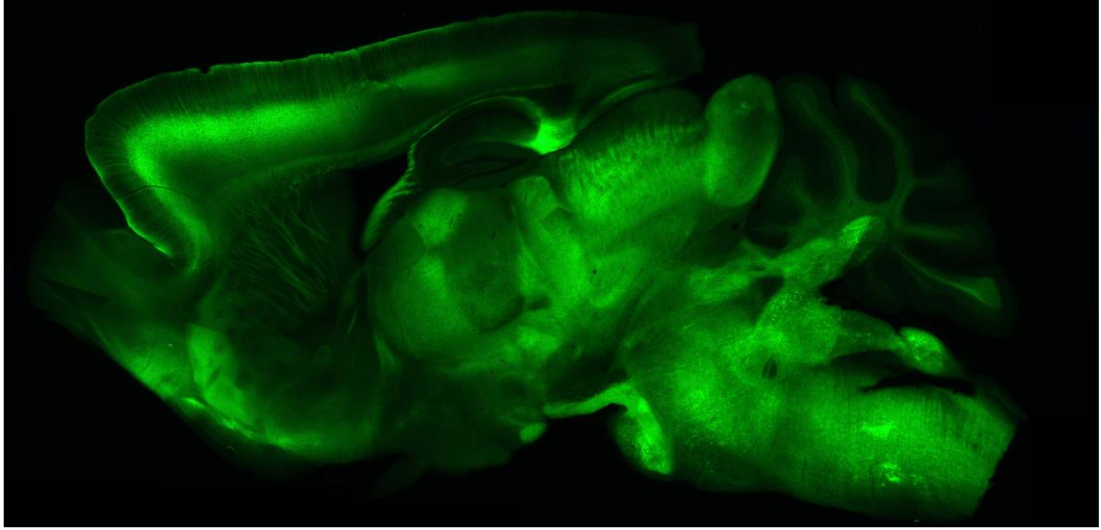
Farklı patofizyolojileri açıklamaya yönelik geliştirilmiş deneyisel migren modellerine örnekler. Duranın mekanik ve elektriksel uyarımı, trigeminal gangliyonun elektriksel uyarımı, sistemik nitrogliserin uygulanması, genetik modeller (8).

Genetik migren modellerinde ise familial hemiplejik migren’de (FHM) saptanan farklı mutasyonlardan transgenik modeller oluşturulmuştur. Örneğin CACNA1A genini etkileyen R192Q ve S218L mutasyonlarının ‘knock-in’ modeli ile transgenik fare modeli oluşturulabilmektedir. Sinaptik bölgedeki farklı kanal veya proteinlerin mutasyonu ile FHM 2, 3 ve 4 deneyisel transgenik fare modelleri de geliştirilmiştir. FHM dışında NOTCH3 gibi migren ile ilişkili monojenik mutasyonlar ile oluşturulan modeller de mevcuttur (8).

Kortikal yayılan depolarizasyon oluşumu ile trigeminovasküler sistemi aktive etmek mümkün olmaktadır. Bunun için dura üzerine KCl uygulama, iğne batırma, elektriksel stimülasyon ve optogenetik uyarım yapılabilmektedir (10).

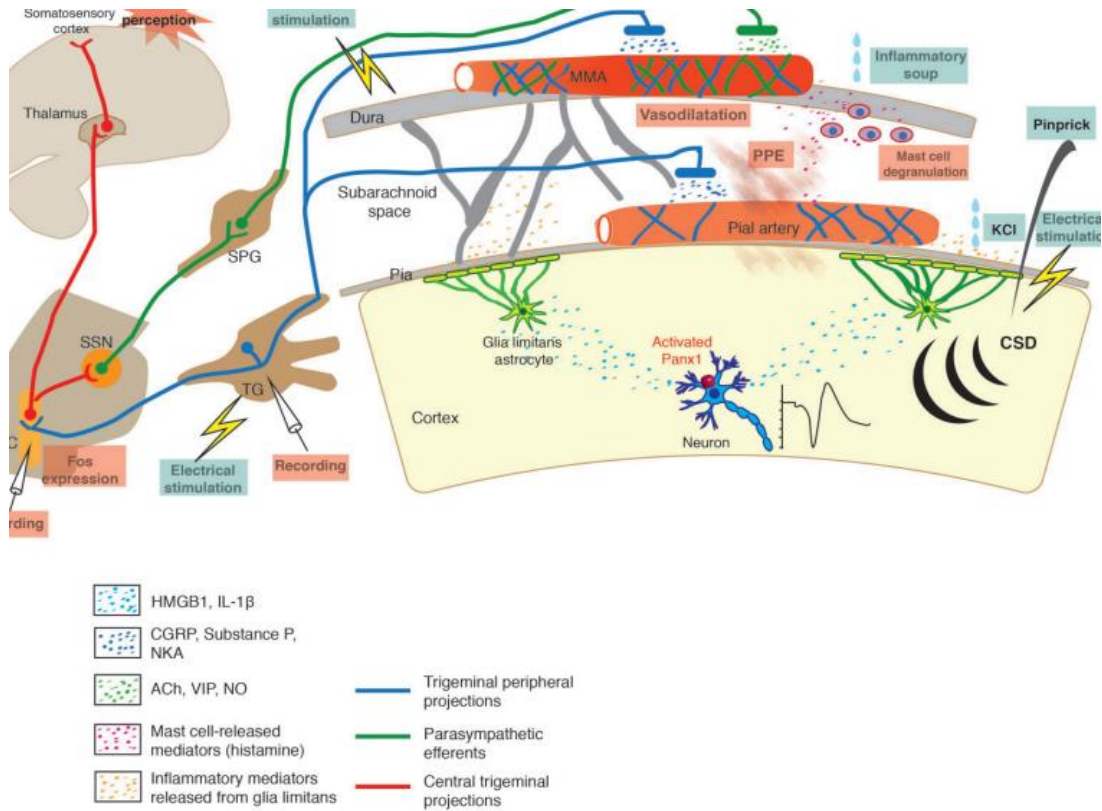
Literatürde kullanılan KYD tetikleme yöntemleri invazif yöntemler olup (işlem için kraniyotomi yapılması, yüksek konsantrasyonda KCl kullanılması gibi) işlemin kendisine bağlı da inflamatuvar yollar tetiklenebilmektedir. Optogenetik metod ile nöronlara kanalarodopsin geni (ChR2) viral vektörler kullanılarak veya transgenik yolla aktarılabilmekte ve mavi ışık kaynağı kullanılarak bu nöronlar uyarılarak invazif olmayan bir şekilde nöron aktivitesinin uyarılması mümkün olmaktadır (12, 13, 23). Optogenetik olarak uyarılan KYD elektrofizyolojik ve hemodinamik olarak diğer konvansiyonel metodlarla oluşturulan yanıtlara benzerdir (13). Thy1-ChR2-YFP transgenik fare hattı korteksin 5. tabakasında, hipokampusta CA1 ve CA3 piramidal nöronlarda, talamus, orta beyin ve beyin sapı nöronları, serebellar ‘mossy’ bağlantılar ve olfaktör bulbus mitral hücrelerinde ChR2 eksprese etmektedir (Şekil 2.5). Optogenetik yöntemde kemik üzerinden uygulanan mavi ışık ile nöronlar uyarılabilmekte ve KYD oluşumu sağlanabilmektedir (12). KYD uyarımı

için gerekli eşik ve eşik üstü değerler enstitü bünyesinde daha önceki çalışmalarda saptanmış ve optimize edilmiştir (11).



şekil 2.5 Thy1-ChR2-YFP transgenik hayvanında ChR2 eksprese eden kortikal ve subkortikal yapılar (11).

Bu metodlar kullanılarak ortaya çıkan yanıtların şematize edilmiş hali şekil 2.6’da yer almaktadır.

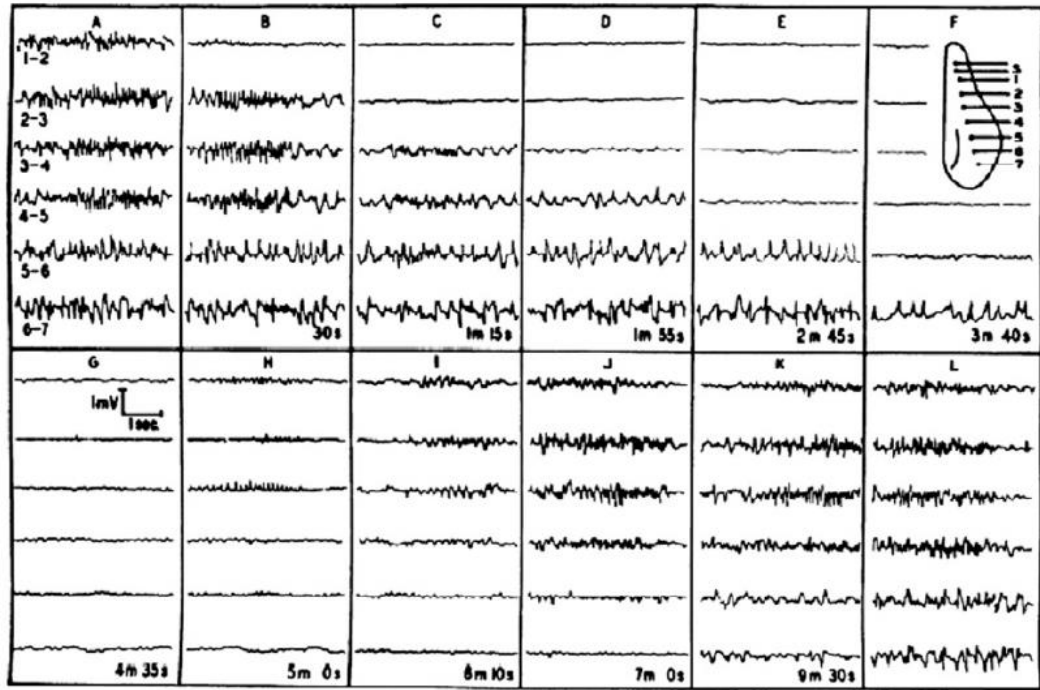


Şekil 2.6 Deneysel migren modelleri ile ortaya çıkan yanıtların şematize anlatımı.

TG nöronlarının periferik uzantıları pial ve dural damarlarda, santral uzantıları ise TNC de sonlanmaktadır. TNC talamusa projekte olurken parasempatik superior salivatuvar çekirdeğe de kollateraller göndermektedir, bu lifler sfenopalatin gangliyon üstünden dural damarları innerve etmektedir. TVS aktivasyonu ile damar çevresindeki sinir sonlanmalarından salıverilen çeşitli peptid ve mediyatörler aracılığı ile dural vazodilatasyon, plazma proteini ekstrasvazasyonu ve mast hücre degranülasyonuna ortaya çıkar. TVS dura ya da TG'nin elektriksel uyarımı, inflamatuvar mediyatörlerin dural uygulanması, ve KYD (iğne batırma, KCl, elektriksel uyarı) uyarımı ile aktive edilebilmektedir. KYD ile nöronal panneksin 1 kanalları açılarak parankimal inflamasyonu ve ardından TVS'de inflamatuvar yanıtı tetiklemektedir (10).

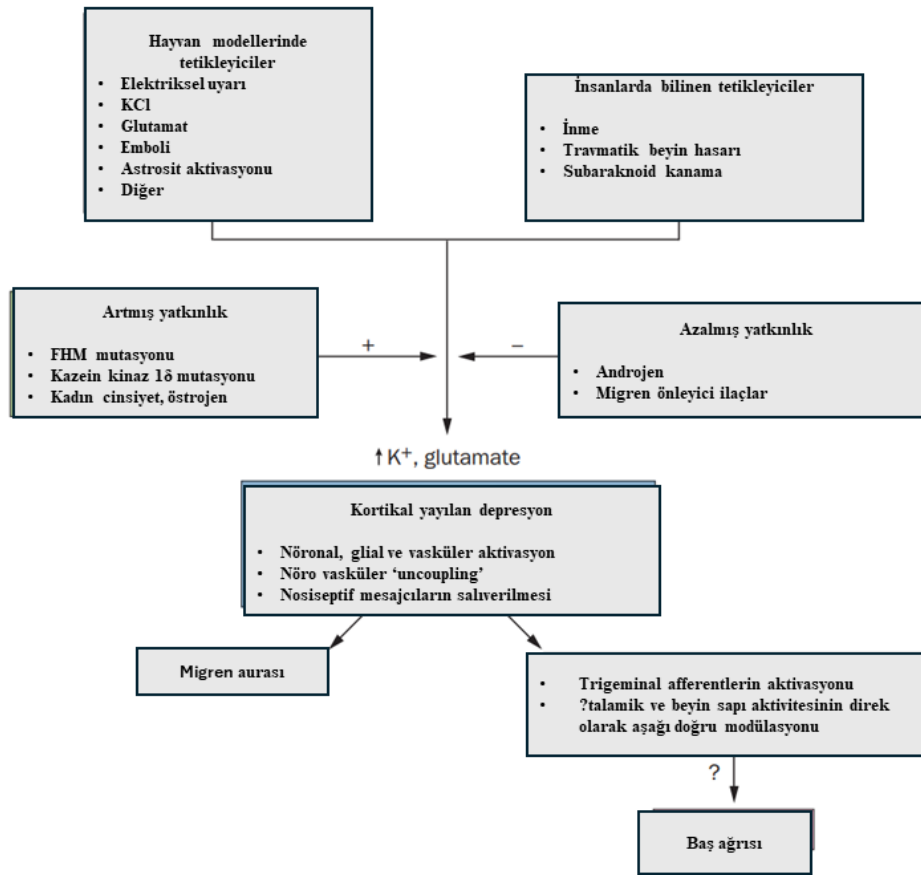
2.4 Migren ve Kortikal Yayılan Depolarizasyon

Migren patofizyolojisi tam olarak açıklanamamakla birlikte KYD auranın elektrofizyolojik karşılığı olarak kabul edilmekte ve ağrının oluşumunda etkisi olduğu öne sürülmektedir (2, 24). KYD ilk defa 1940'lerde Leao tarafından tanımlanmıştır (Şekil 2.7)(4); bu fenomen nöronal, glial ve vasküler fonksiyonlarda değişikliğe neden olan yavaş ilerleyen bir dalga olarak tanımlanmaktadır (24, 25).



Şekil 2.7 Leao tarafından tanımlanan tavşan beyinde oluşturulmuş KYD kaydı. Frontal korteksten yapılan elektriksel uyarımın 1’den 7’ye doğru numaralandırılan ve anteriordan posteriora yerleştirilmiş elektrodlardan alınan kayıta, elektriksel aktivitedeki yayılan depresyonu görülmektedir (4).

KYD deneysel olarak farklı yöntemler ile (elektriksel, mekanik, kimyasal ve optogenetik) oluşturulabilmektedir (26). KYD, depolarizan uyarıların ekstrasellüler potasyumun kritik eşik değerin üstüne çıkmasını sağlayacak şekilde tetiklenmesi ile ortaya çıkmaktadır (26, 27). KYD sırasında ilişkili beyin bölgesindeki hücrelerde masif olarak K^+ , nörotransmitter ve glutamat’ın hücre dışında artışı, buna karşın Na^+ , Ca^{++} ve H_2O ’nun hücre içine girişi ile neredeyse tam bir membran depolarizasyonu ortaya çıkmakta ve nöronal şişme meydana gelmektedir (1). Yayılan depolarizasyon dalgasının doku metabolizması, perfüzyonu, ikincil mesajcı aktivitesi ve gen ekspresyonu üzerine belirgin etkisi vardır (1). Yayılan depolarizasyon dalgası sadece migrende tanımlanmamıştır, aynı zamanda serebral iskemi, beyin kanaması ve kafa travması sonrası insan beyinde de kayıtlanmıştır (1, 28). KYD oluşumunu kolaylaştıran ya da azaltan faktörler mevcuttur (Şekil 2.8)(24). Kadın cinsiyet, östrojen hormonu, FHM mutasyonu yatkınlığı arttırırken, androjen hormonlarının yatkınlığı azalttığı bilinmektedir.



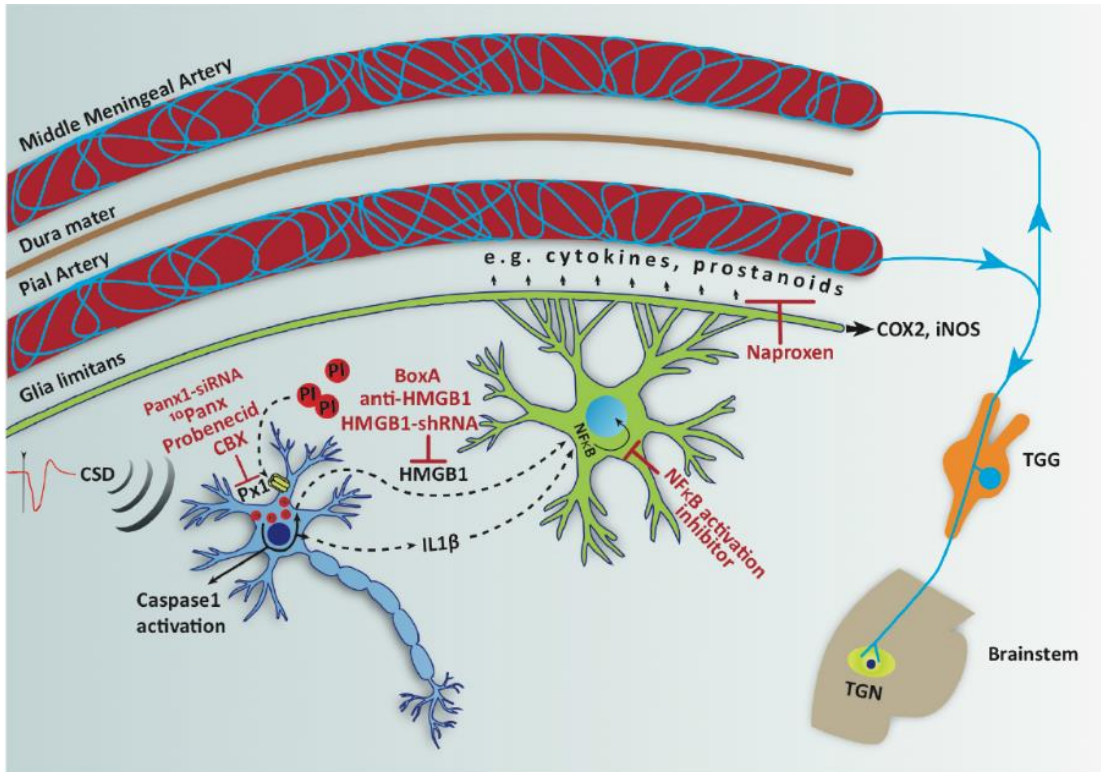
Şekil 2.8 KYD; risk faktörleri, tetikleyicileri, mekanizmaları ve fonksiyonel sonuçları (24). FHM: familial hemiplejik migren

Deneyssel modeller yayılan depolarizasyon dalgasının trigeminal nosiseptif yolları tetiklediğini göstermektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada sıçanda korteksi uyararak tetiklenen KYD sonrasında leptomeninge inflamasyonun tetiklendiği gösterilmiştir (29). KYD aynı zamanda pial ve dural makrofaj ve dendritik hücrelerin aktivasyonu ve glimfatik yolların kapanması ile de ilişkilidir (1).

KYD oluşumunda astrositlerin rolü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (7, 30). Bu çalışmalarda astrositlerde nöronal aktivasyon sırasında ortaya çıkanlara benzer olan kalsiyum dalgalarının olduğu gösterilmiştir. Ancak bu dalgalarda farmakolojik olarak yapılan blokajın KYD oluşumunu baskılamadığı görülünce, astrositlerin daha çok yayılımı desteklediği düşünülmüştür (24). Buna karşın ailesel hemiplejik migren tip 2’de saptanan ve birincil olarak astrositlerde ifade edilen Na^+/K^+ ATPaz’ı kodlayan gende ortaya çıkan mutasyon, primer olarak astrositlerde oluşan bir

fonksiyon bozukluğunun KYD başlatılmasında rolü olabileceğini düşündürmektedir. Daha da önemlisi Baca ve arkadaşları optogenetik yöntem ile astrositleri uyarak KYD oluşumunu göstermişlerdir (24).

Literatürde ve enstitümüzde yapılan çalışmalarda KYD oluşumunda ve yayılımında parankimal inflamasyonun rolü olduğu gösterilmiştir (2, 23). Bu çalışmalarda KYD ile ortaya çıkan uyarının nöronal Panneksin 1 kanal aktivasyonuna ve bunu takiben inflamazom oluşumu ve proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesi ile astrositlerde NF- κ B aktivasyonuna neden olduğu saptanmıştır (2). NF- κ B aktivasyonu sonucu ortaya çıkan mediyatörler ile pial damarların ve bunların çevresindeki trigeminal ağrı liflerinin uyarıldığı öne sürülmektedir (Şekil 2.9)(2).



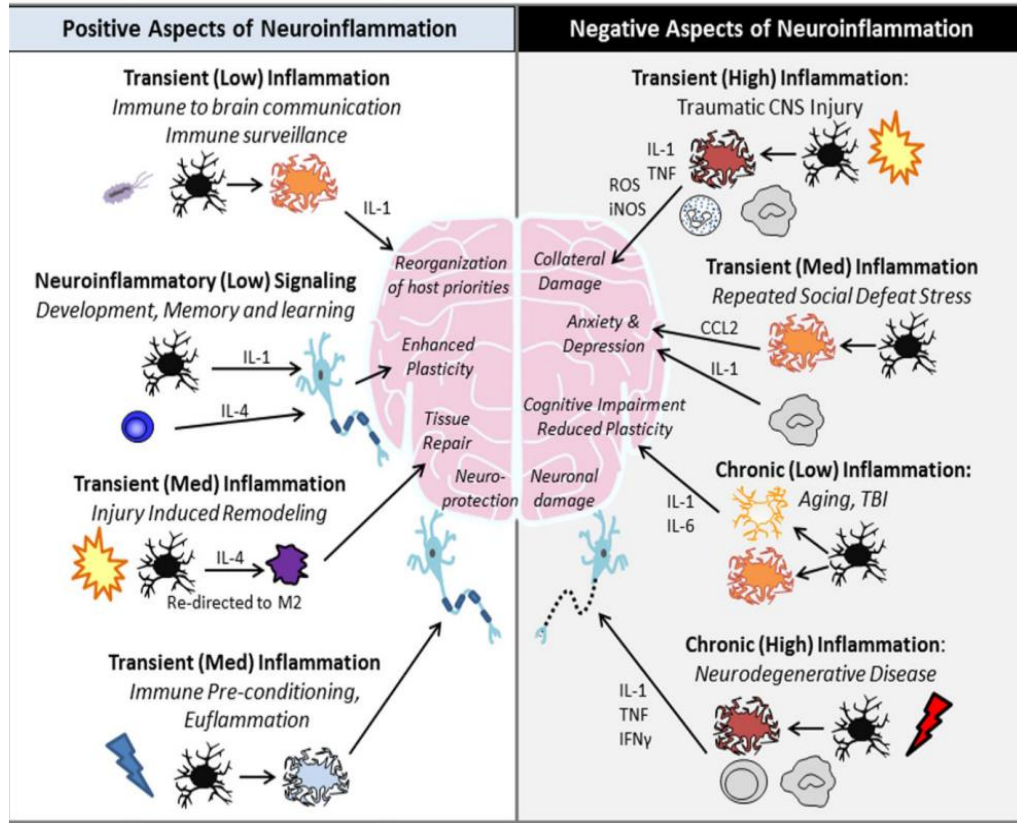
Şekil 2.9 Kortikal yayılan depolarizasyonun tetiklenmesi ile ortaya çıkan parankimal inflamatuvar yanıt ve neden olduğu sinyalizasyon yolağının şematik çizimi (2).

2.5 Migren, Nöroinflamasyon ve Astrositlerin Rolü

Nöroinflamasyon ağırlı uyaranların başlattığı adaptif bir cevaptır ve santral sinir sisteminde birçok hastalığın patofizyolojisinde rol alır (31). İnflamasyon sitokin,

kemokin, reaktif oksijen türleri ve ikincil mesajcılarının oluşumu ile yayılır ve bu mediyatörler santral sinir sisteminin glial hücreleri (mikroglia ve astrositler), endotelyal hücreler ve periferel immün hücrelerce üretilir (32). Nöroinflamasyonun derecesi de primer uyarana ve süresine göre değişkenlik gösterir (32). Nöroinflamasyon hastalık süreçlerinde hasarın şiddetini arttırabildiği gibi, immün gözetleme, gelişim, hafıza ve öğrenme gibi süreçlerde ise olumlu rol oynamaktadır (32)(Şekil 2.10).

Patolojik olan nöroinflamasyonda glial hücrelerde anlamlı derecede kemokin ve sitokin üretimi meydana gelir, beraberinde kan beyin bariyerinin permeabilitesinde artma ve bozulma, periferel immün hücrelerin infiltrasyonu ve ödem meydana gelir (32).



Şekil 2.10 Nöroinflamasyonun pozitif ve negatif özellikleri.

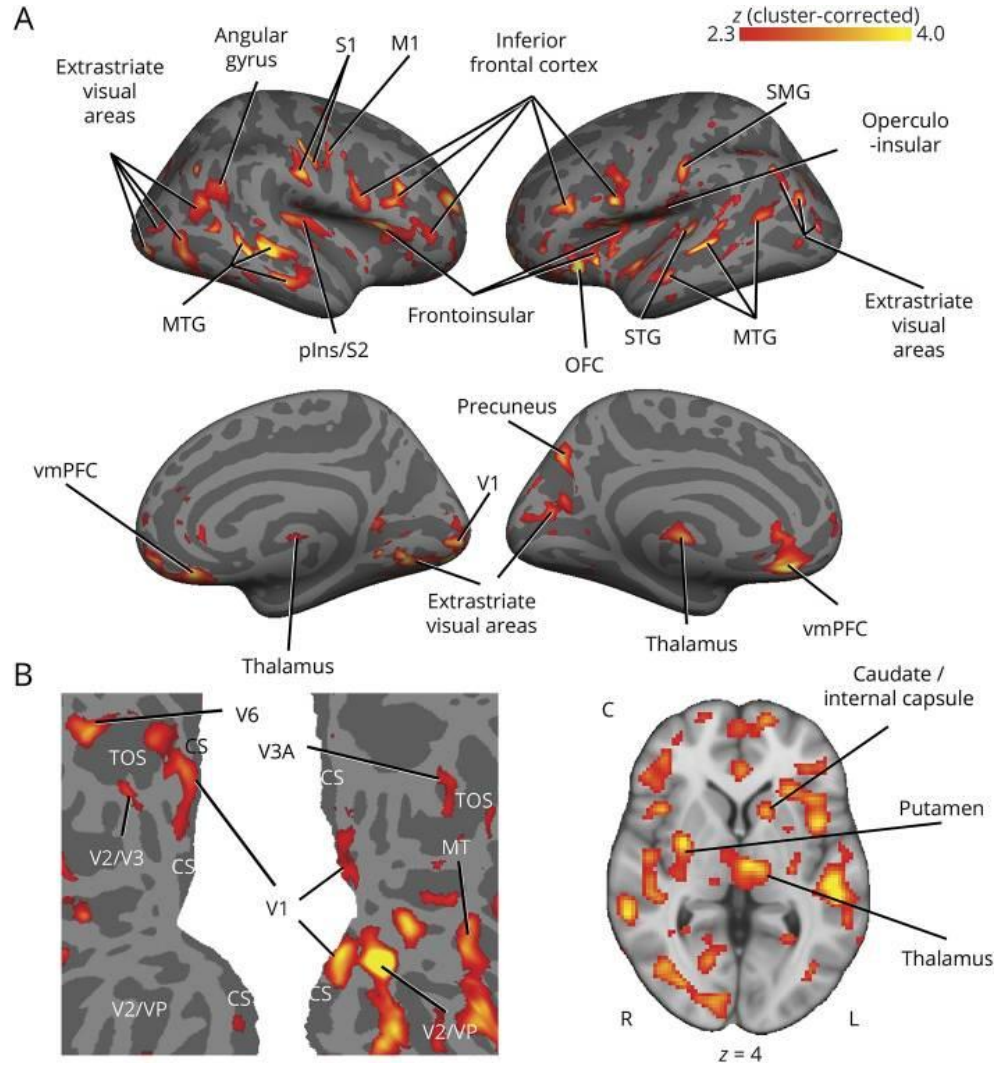
İmmün sinyallerin santral sinir sisteminde destekleyici mi yıkıcı mı yanıt oluşturacağı inflamasyonun yoğunluğu ve süresi ile ilişkilidir. Sol tarafta gösterildiği üzere kısa ve kontrollü inflamatuvar yanıtlar konak organizmaya faydalı kabul edilmektedir. Örneğin, enfeksiyon sonrası immün sistemin beyine gönderdiği sinyaller konakta hasta davranışlarını tetiklemekte ve önceliklerini tekrar belirlemesini ve organize etmesini sağlamaktadır. Ek olarak IL-1 ve IL-4'ün öğrenme ve bellek üzerinde önemli rolü vardır. Travmatik beyin hasarını takiben IL-4 iyileşme ve aksonal büyümeyi destekler. Buna karşın sağ tarafta ise daha çok maladaptif inflamatuvar yanıtlar gösterilmektedir. Burada sitokin (IL-1, TNF) reaktif oksijen türleri ve diğer inflamatuvar mediatörlerin üretiminde artış ile karakterize kronik, kontrolsüz bir inflamasyon söz konusudur. Bu belirteçler travmatik beyin hasarını takiben artış göstermektedir ve hasar alanına periferik makroraj ve nötrofillerin göçü bu duruma eşlik etmektedir. Tekrarlayan sosyal yenilgi stresinden sonra ortaya çıkan geçici inflamasyon, monosit ve makrofajları sürece katmakta ve bunun sonucunda anksiyete ve depresyona neden olmaktadır. Travmanın akut fazını takiben yaşla ilişkili IL-1 ve IL-6 ile oluşturulan kronik inflamatuvar cevap nöronal plastisiteyi bozmakta ve kognitif bozulmaya neden olmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklarda ise daha yüksek dereceli kronik inflamasyon ile karakterize bir hasar söz konusudur (32).

Migrende ise TVS'de nöronal aktiviteye cevaben bir inflamatuvar reaksiyon ortaya çıkar (5). Migren baş ağrısının TVS aktivasyonu sonucu ortaya çıktığı

düşünülmektedir. Trigeminal sinir sonlanmaları dural damarları inerve etmektedir. Trigeminal sinir uyarımı ile CGRP, P maddesi ve nitrik oksit perivasküler alana salıverilmekte ve bu da kan akımında artış, duramatere protein ekstrasvazasyonu ile sonuçlanmaktadır (3).

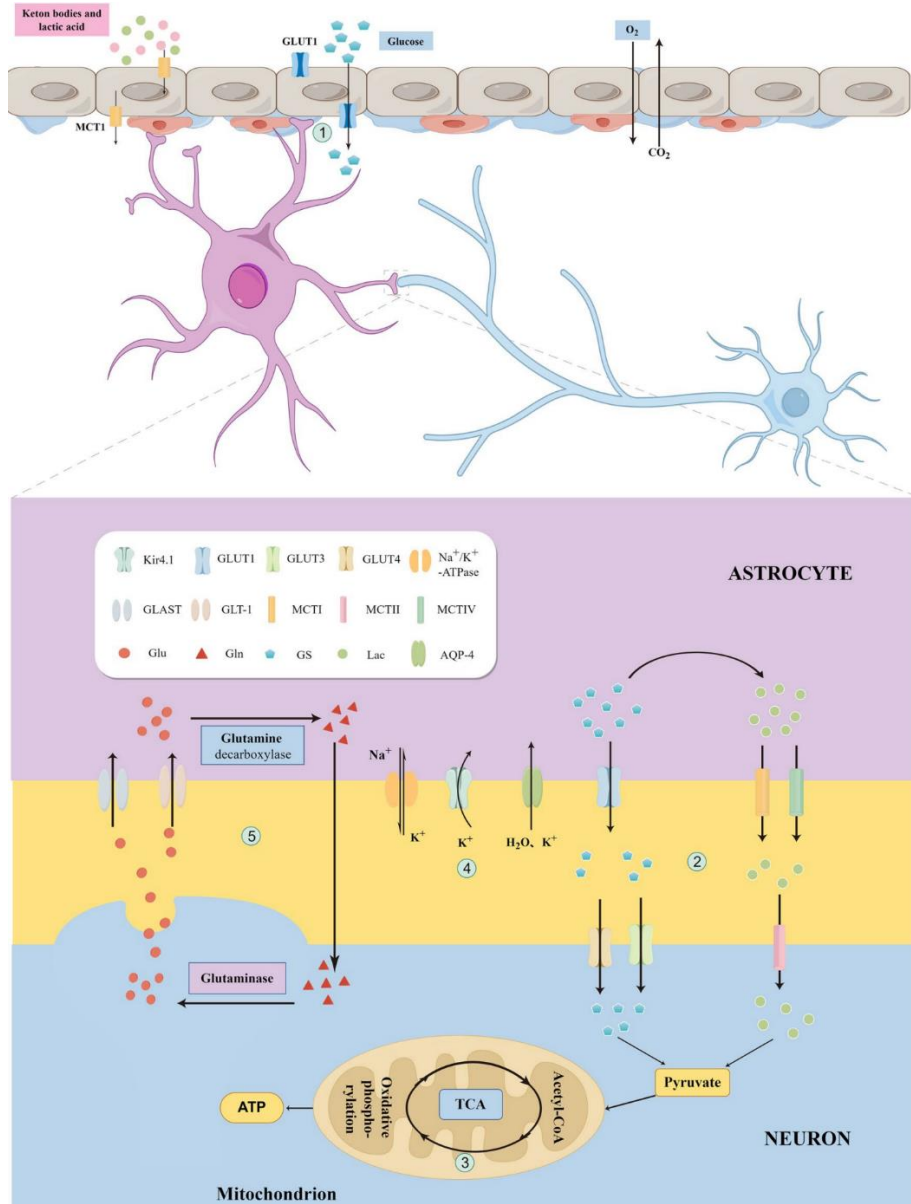
KYD ise auranın elektrofizyolojik bir karşılığı olarak kabul edilmekte ve baş ağrısının başlamasında parankimal nöroinflamatuvar sinyaller üzerinden rolü olduğu düşünülmektedir. KYD oluşumunu takiben nöronal panneksin 1 megakanalları açılmakta ve bunun sonucunda kaspaz-1 aktivasyonu ve IL-1 β ve yüksek mobilite HMGB1 salıverilmesi gerçekleşmektedir (2, 14, 33). Bu nöronal reaksiyon çevredeki astrositlerde NF- κ B'nin çekirdeğe translokasyonuna ve COX ve iNOS gibi inflamatuvar genlerin transkripsiyonuna ve glia limitansı oluşturan astrositik ayaklardan AA ve potasyumun perivasküler alana yayılmasına neden olur (5). Bu kaskadın meningeal damarların çevresindeki trigeminal sinirleri aktive edebileceği düşünülmektedir (5).

Bunlara ek olarak 13 auralı migren hastası ile sağlıklı kontrolleri karşılaştırmış ve, inflamasyon sonucu ifadesi artan gliyal bir belirteç olan 18 kDa translokator proteinine bağlanan (11C)PBR28 radyoligandı kullanılarak yapılan PET-MRG çalışmasında migren hastalarındaki kortikal ve subkortikal yapılarda inflamasyonun varlığı gösterilmiştir (20)(Şekil 2.11).



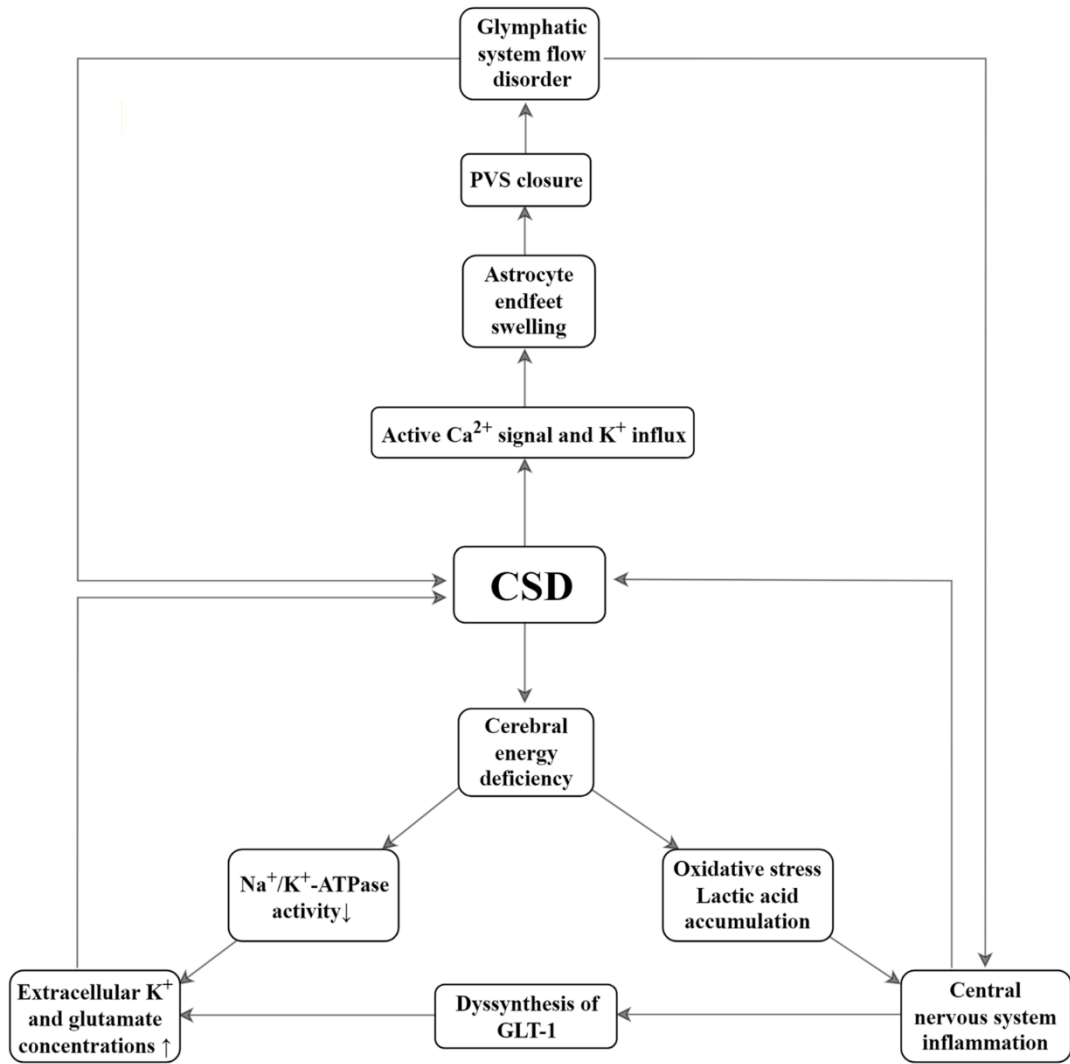
Şekil 2.11 PET-MRG çalışmasında migren hastalarının beyinlerinde sağlıklı kontrollere göre inflamatuvar tutulumun anlamlı olarak farklı olduğu bölgeler. (A) [11C]PBR28 tutulumunun gruplar arasındaki farkı beyin yüzey projeksiyonlarında gösterilmiştir. (B) Oksipital korteksi göstermektedir. Sol hemisfer sol tarafta; sağ hemisfer sağ tarafta gösterilmiştir. Açık gri çizgiler girusları, koyu gri çizgiler sulkusları temsil etmektedir. (C) Subkortikal radyoligand tutulumunun aksiyel bir kesitte gösterilmesi. CS = Kalkarin sulkus; M1 = Primer motor korteks; MTG = Orta temporal girus; pIns = Posterior insula; OFC = Orbitofrontal korteks; S1/S2 = Primer/ sekonder somatosensör korteks; SMG = Supramarjinal girus; STG = Süperior temporal girus; TOS = Transvers oksipital sulkus; V1 = Primer görme korteksi; vmPFC = Ventromediyal prefrontal korteks (34).

KYD aslında glukoz ve ATP konsantrasyonunun yaklaşık %50 azalmasına neden olan yüksek enerji isteyen bir metabolik stres durumudur. Bu süreç nörovasküler üniteyi (NVU) aktive edebilir. NVU'da astrosit son ayakları, perisitler, parankimal nöronal projeksiyonlar, perivasküler nöronlar, düz kas hücreleri ve endotel gibi pek çok farklı hücre yapısı mevcuttur (35). NVU aktivasyonu beraberinde kan akımı değişikliğine neden olmaktadır (35). Astrositler nöroinflamasyonda hem proinflamatuvar sitokin kaynağı hem de nöronların artmış enerji ihtiyacına destek olmaktadır. Astrositler SSS'de enerji metabolizması ürünlerini sağlarlar, ekstrasellüler sıvı ve elektrolit dengesini kontrol ederler ve glikojen sentezleyerek metabolik homeostazı regüle ederler (35). Glukoz beynin primer enerji kaynağı iken nadiren direk nöronlara girer. Normalde kan beyin bariyerini geçtikten sonra astrositlere geçer ve orada işlendikten sonra laktat olarak nöronlara verilir (35). KYD sırasında ekstrasellüler ortama çıkan yüksek miktardaki glutamat ise glutamat taşıyıcı 1 (GLT1) ve glutamat aspartat taşıyıcı (GLAST) yolu ile astrosite girer ve glutamine dönüşür. Glutamin ekzositoz yolu ile astrositi terkeder ve endositoz ile nöronlara giriş yapar ve glutamata dönüştürülerek sinaptik aralığa verilir. Bu sürece glutamat-glutamin döngüsü adı verilir ve bu yolla glutamatın eksitotoksik etkisi sınırlandırılmış olur (Şekil 2.12)(35). Astrositin diğer bir önemli görevi ise nöronal aktivite sırasında hücre dışına salıverilen K^{+} 'u sinaptik aralıktan uzaklaştırmaktır (Şekil 2.13).



Şekil 2.12 KYD’de nöron ve astrositlerin sinaptik fizyolojik aktivitesi.

Glukoz taşıyıcı 1 (GLT1) esas olarak astrositler ve endotelial hücrelerde eksprese olurlar. Glukoz kan beyin bariyerinden GLT1 aracılığı ile astrosite girmektedir (1 no’lu basamak) ve oksidatif metabolizma aracılığı ile laktat oluşturmaktadır (2 no’lu basamak). Laktat nörona piruvat oluşturmak üzere monokarboksilat taşıyıcı (MCT) ile girmekte, sonrasında asetil KoA oluşturarak trikarboksilik asid döngüsüne (TCA) girmektedir (3 no’lu basamak). KYD sırasında sinaptik aralıktaki artmış K^+ astrosit içine giriş yapmaktadır (4 no’lu basamak), bu durum astrosit son ayaklarında şişmeye neden olmaktadır. Glutamat (Glu) KYD sırasında nöronlardan masif miktarda salıverilir. Glu taşıyıcı 1 (GLT-1) ve glu aspartat taşıyıcı (GLAST) aracılığı ile Glu astrosite geçiş yapar ve glutamin (Gln) oluşturur. Gln astrositleri ekzositoz ile terkederken nöronlara endositoz ile giriş yapar ve Glu’a dönüştürülerek sinaptik aralığa verilir. Bu süreç Glu-Gln döngüsü olarak bilinmektedir (5 no’lu basamak)(35).



Şekil 2.13 Kortikal yayılan depolarizasyonda astrositlerin rolünün şematik anlatımı
Astrosit son ayaklarının şişmesinden aşırı aktif Ca^{2+} ve K^+ inflüksü sorumludur. Son ayaklardaki şişme perivasküler mesafenin kapanmasına, glimfatik sistemdeki dolaşımın yavaşlamasına ve nöroinflamasyonun artmasına neden olmaktadır. Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) glutamat taşıyıcı 1 (GLT-1) sentezini bozmakta ve sinaptik aralıkta glutamat birikime ve persistan KYD'ye yol açmaktadır (35). GLT-1; glutamate taşıyıcı 1, PVS; perivasküler boşluk.

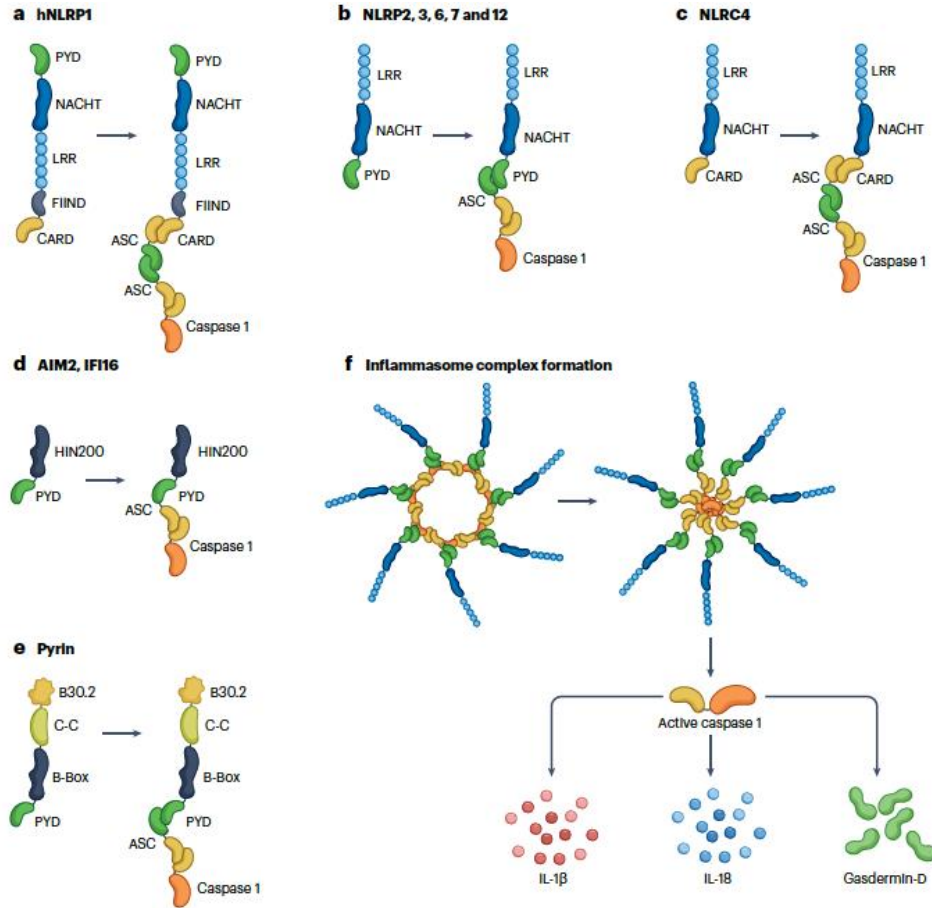
KYD'nin meningeal nosiseptörleri uyarması halinde de daha önce bahsettiğimiz şekilde nöronal panneksin 1 megakanallarının açılması ile başlayan kaskad nöroinflamasyon ile sonuçlanır. KYD astrositlerde reaktif proliferasyona neden olmaktadır ve bu da sitokin salıverilmesine neden olarak inflamasyonu artırmaktadır. Astrositlerin ayaksı uzantılarından vasküler uzantılar olarak adlandırılanları komşu damar duvarına yapışık ve kan akımını kontrol ederken, nöronlarla kontakt halinde olan ayaksı çıkıntıları ise nöronal aktiviteyi hissederek

gerekli ürünleri taşırlar (35). KYD sırasında ortaya çıkan damar çapındaki değişiklik perivasküler boşlukların kapanmasına ve glimfatik sistemin bozulmasına neden olur ki, bu da ortamdaki proinflamatuvar sitokinlerin uzaklaştırılamamasına yol açarak hücrede olumsuz anlamda kısır bir döngü yaratır (35).

Astrositlerin KYD ile birlikte reaktif olarak aktivasyonu ve ortaya çıkan proinflamatuvar yanıtta rolü olduğu son yıllarda çalışılmaktadır (2). Bu süreçte inflamazom aktivasyonunun rolü olduğu bilinmekle birlikte bu yolda en çok NLRP3 üzerine çalışmalar yapılmıştır (6). Literatürde ve enstitümüzde yapılan çalışmalarda KYD tetiklenmesi sonucunda oluşan parankimal nöroinflamasyonda özellikle NLRP3 inflamazom kompleks oluşumu ve aktivasyonunun rol oynadığı gösterilmiştir. Minkiewicz ve arkadaşlarının hücre kültüründe gösterdiği üzere astrositlerde özellikle NLRP2 inflamazomunun varlığı bu inflamazomun panneksin 1 ve pürinerjik reseptörler üzerinden aktive olması KYD sırasında rolü olabileceğini düşündürmüştür (15). Buna ek olarak NLRP2'nin literatürdeki farklı dokularda gösterilen hem proinflamatuvar hem de NF- κ B üzerine inhibitör etki olmak üzere dual etkisi nedeni ile KYD sürecinde nasıl rol alacağı ayrı bir merak uyandırmıştır.

2.6 İnflamazomlar

İnflamazom, ilk olarak 2000'lerin başında tanımlanmış olup, doğal immünitinin bir parçası olan nod benzeri reseptör (NLR) ailesinin bir üyesidir (36-38). NLR ailesinin 5 alt üyesi vardır ve N-terminal domainlerine göre isimlendirilirler. NLRP ailesi ise N-terminalinde pirin domaini (PYD) olan gruptur. NLRP ailesinin insanda tanımlanmış 14 üyesi vardır (36). Hasar ilişkili (DAMP) ve patojen ilişkili moleküler paternlerce (PAMP) aktive olmaktadır (39). İnflamazom kompleksinin oluşumu ise proinflamatuvar moleküllerin aktive olması ile sonuçlanmaktadır. İnflamazomların nörodejeneratif hastalıklar, enfeksiyöz hastalıklar gibi birçok nörolojik hastalığın patogeneğinde yer aldığı düşünülmektedir (39). İnflamazom ailesinin içerdikleri moleküler yapılara göre farklı özellikleri olan birçok üyesi vardır. Bu moleküler yapılar arasında C-terminal lösinden zengin tekrar (LRR), pirin domaini, NACHT ATPaz domaini ve kaspaz kabul bölgesi (CARD) sayılabilir (Şekil 2.14)(39).



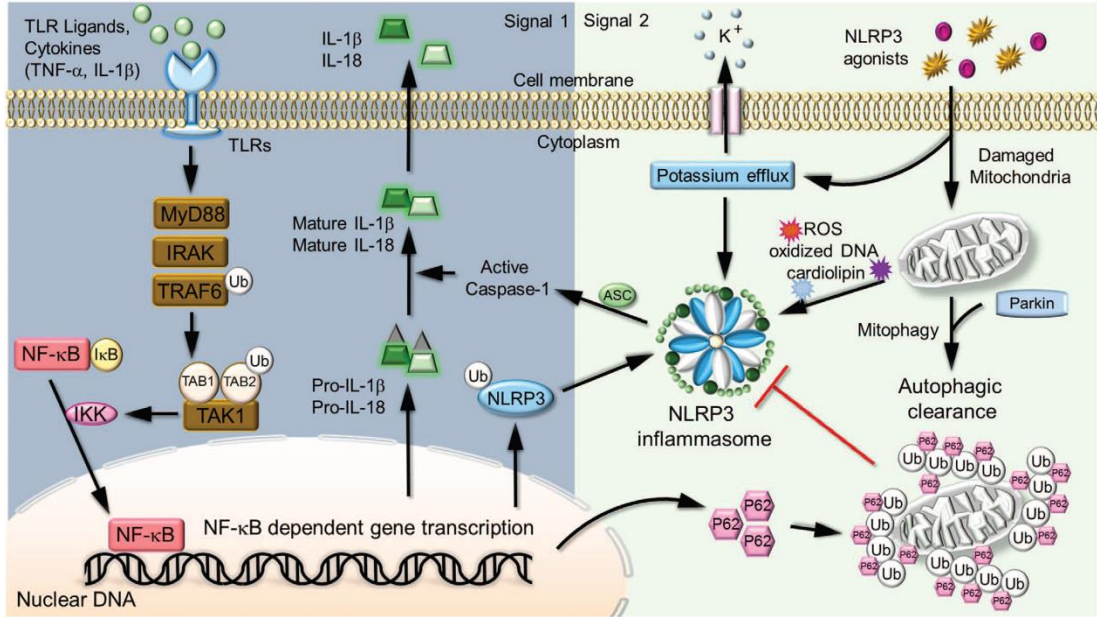
Şekil 2.14 İnflamazom ve inflamazom kompleksinin yapısı.

a, İnsan NLRP1'i pirin domaini (PYD), NACHT ATPaz domaini ve lösinden zengin tekrar (LRR), FIIND ('function to find domain') domaini ve CARD'ı ('caspase recruitment domain') içermektedir. Kaspaz 1 'i ASC ('associated speck like proteinn containin a CARD') dimeri CARD-CARD bağlantısı üzerinden temin eder. NLRP1 bakteriyel toksinlerce aktive olur. b, Bu NLR ailesi PYD, LRR ve NACHT domaini içermektedir. Kaspaz 1 PYD-PYD bağlantısı yolu il etemin edilir. NLRP2 ATP ile, NLRP3, 6, 7 ve 12 ise patojen ilişkili moleküler pattern ve hasar ilişkili moleküler patternce aktive olur. Bunlara ek olarak NLRP3 amiloid-β, tau ve α-sinüklein gibi nörolojik hastalıklarla ilişkili proteinlerle de aktive olmaktadır. c, NLRC4, LRR, NACHT ve CARD domaini içerir. ASC dimeri üzerinden kaspazı temin eder, CARD-CARD bağlantısı ile ilişkilidir. Bakteriyel flagellin ile aktive olur. d, AIM2 ve IFI16 inflamazomları HIN-200 ve PYD domaini içerir. Kaspaz 1'i ASC üzerinden temin eder, PYD-PYD etkileşimi ile ilişkilidir. e, pirin inflamazomu B30.2, 'coiled-coil' ve 'zinc finger B-Box' ve PYD domaini içerir. PYD-PYD etkileşimi ile ilişkili olan ASC domaini üzerinden kaspaz 1'i temin eder. Pirin, RhoA-GTPaz'ı inaktive eden bakteriyel toksinlerce aktive olur. f, inflamazom aktivasyonu, oligomerizasyon inflamazom kompleksi oluşumunu sağlar. Bu durum otoproecolitik kesme ile aktif kaspaz 1 oluşumunu sağlar. Aktif kaspaz 1 pro-IL-1β ve pro IL-18'i matür IL-1β ve IL-18'e çevirir, aynı zamanda hücre membranında delikler oluşmasına ve sitokin salıverilmesine izinn veren gesdermin D'yi böler (39).

NLR ailesinden NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12 ve NLRC4 inflamazom komplekslerinin oluşabileceği bilinmektedir (39). İnflamazom kompleksi oluşumunda farklı sinyaller farklı NLR'leri uyarabilir. Örneğin NLRP3 için PAMP bir uyarıcı iken NLRC4 için bakteriyel flagellin, NLRP1 için bakteriyel toksinler, NLRP2 için ise ATP bir uyarıcıdır (15, 39).

NLRP'lerle ilgili yapılan çalışmalar sonucunda santral sinir sisteminde ana ifadenme özellikleri tanımlanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda NLRP1 ve NLRP3 mikrogliyalarda, NLRP2 ve NLRP3 astrositlerde, NLRP2 dorsal kök gangliyonunda ve nöral kök hücrelerde, AIM2 ve NLRP1 nöronlarda, ve yakın zamanda Alzheimer hastalık modelinde oligodendrositlerde NLRP3'ün uyarıldığı gösterilmiştir (40). Özellikle NLRP1 ve NLRP3 en çok incelenen inflamazomlar olup nöroinflamasyonda kritik rol almaktadır (40, 41).

İnflamazom aktivasyonu iki basamaklıdır; sinyal 1 (hazırlayan/priming) ve sinyal 2 (yetkilendiren/licensing)(39, 42, 43). Hastalıkların patogeneğinde en çok çalışılan üyelerden biri olan NLRP3 üzerinden inflamazom aktivasyonunu anlatırsak örneğin bakteriyel polisakkaridlerin TLR4'e bağlanması, hazırlayan sinyal yani sinyal 1'dir. Bu bağlanma ile NF- κ B sinyalizasyonu aktive olur. Hücre çekirdeğinde NF- κ B bağımlı, inflamazom aktivasyonu için gerekli olan NLRP3, pro-IL-1 β , pro-IL-18 gen transkripsiyonunu uyarır. Bu aşamadan sonra inflamazom kompleks oluşumu için 2. bir sinyale ihtiyaç vardır ki NLRP3 için bu sinyal hasarlı mitokondriyal materyal olabilir. K⁺'un dışarı atılması, mitokondriyal hasar, lizozomal disfonksiyon gibi ikincil sinyallerin varlığında da inflamazom aktivasyonu olmakta ve bunun sonucunda kaspaz1 aktif formuna geçerek pro -IL-1 β ve pro-IL-18'i aktif formu olan IL-1 β 'a ve IL-18'e dönüştürmektedir. Bu kaskad sonucunda ortama sitokinler salıverilerek inflamatuvar bir süreç başlamaktadır (Şekil 2.15)(39, 44).



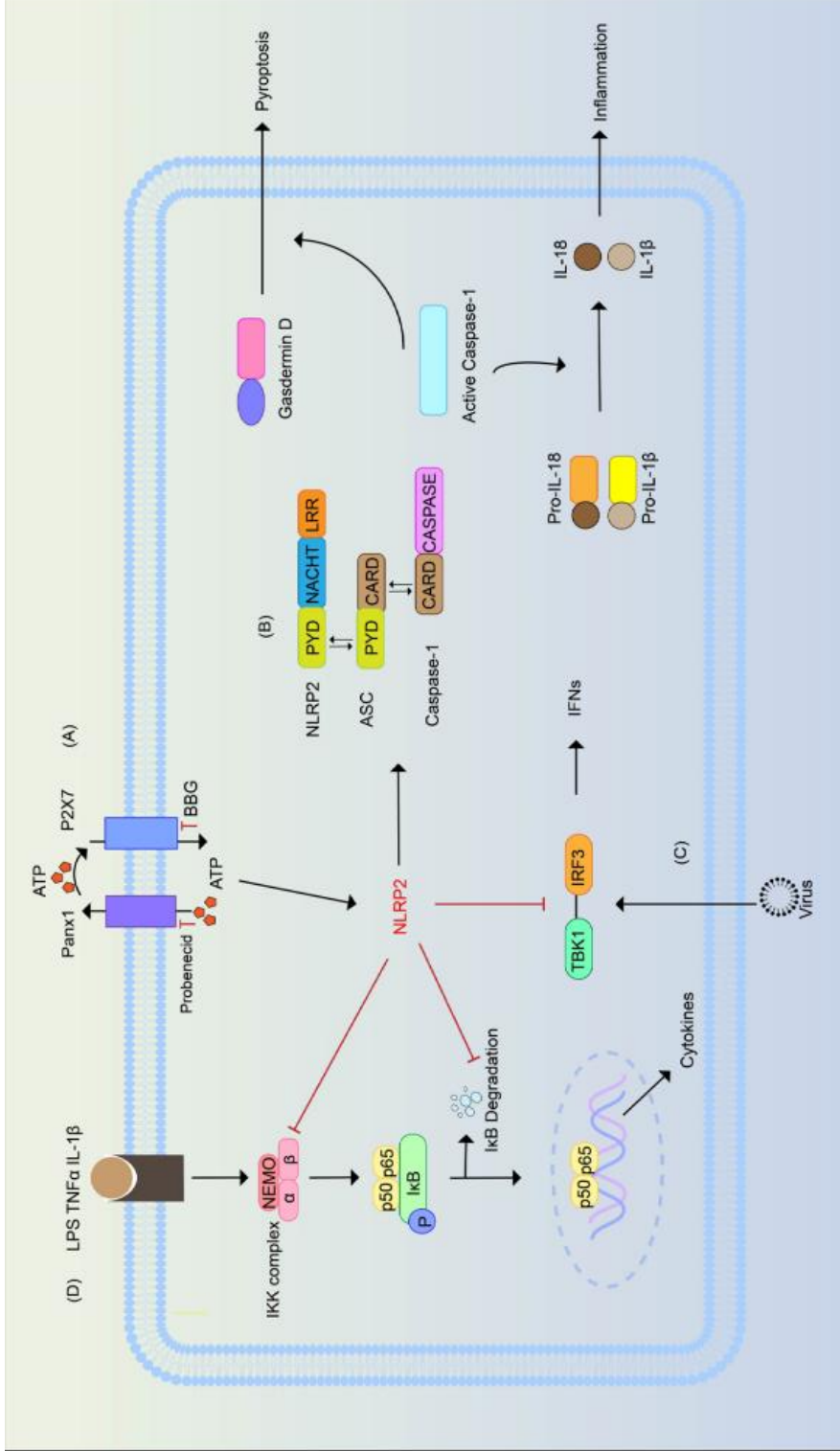
Şekil 2.15 NF- κ B sinyalizasyonu ve inflamazom aktivasyonu.

NLRP3 inflamazomunun regülasyonunda NF- κ B rol almaktadır. NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu için başlatıcı ve aktive edici olmak üzere 2 sinyal gerekmektedir. NF- κ B sinyalizasyonunu aktive eden en prototip örnek bakteriyel lipopolisakaritin TLR4'e bağlanmasıdır. Çekirdeğe transloke olduğunda aktif olan NF- κ B, NLRP3, pro IL-1 β , pro-IL18 gibi NF- κ B bağımlı genlerin transkripsiyonunu arttırmaktadır. NLRP3 agonistlerince sağlanan ve inflamazom aktivasyonuna neden olan ikinci sinyal ile inflamazom kümelenmesi ve matür IL-1 β salıverilmesi tetiklenmektedir. Günümüzde mitokondriyal hasar en çok çalışılan NLRP3 aktivasyon tetikleyicisidir. NF- κ B otofaji reseptörü p62'nin kümelenmesinin gecikmesini tetikler, mitofajik eliminasyon üzerinden inflamazom aktivasyonunu negatif yönde regüle eder (44).

NLRP ailesinin üyelerinden NLRP2 intrasellüler bir protein olup NALP2, PAN1, NBS1, CLR19. 9 ve PYPAF2, olarak da adlandırılmaktadır. NLRP2 2012 yılında keşfedilmiştir. NLR ailesinin diğer üyelerinde olduğu gibi N terminalinde pirin domaini, santralde NACHT domaini ve C-terminalinde LRR'ler içerir (Şekil 2.16). 19. kromozomda 19q13-42 bölgesinde lokalizedir. NLRP2'nin inflammatuar yanıtlarda ATP ile uyarılan inflamazom kompleksi oluşumu ve en nihayetinde proinflammatuar sitokinlerin salıverilmesi ile sonuçlanan inflamasyonu arttırıcı etkisi olduğu kadar NF- κ B üzerinden düzenleyici etkisi olduğunu düşündüren çalışmalar da mevcuttur (Şekil 2.16)(36). NLRP2 vücutta bir çok sistemde rol almakta, immün sistem dışında da örneğin üreme sisteminde rolü bulunmakta, vücutta ise en fazla plasenta, akciğer ve timusda eksprese olmaktadır (36). NLRP2 mutasyonunun dişilerde infertiliteye neden olduğu gösterilmiştir (45). Embriyonik gelişim üzerine etkileri konusunda birçok

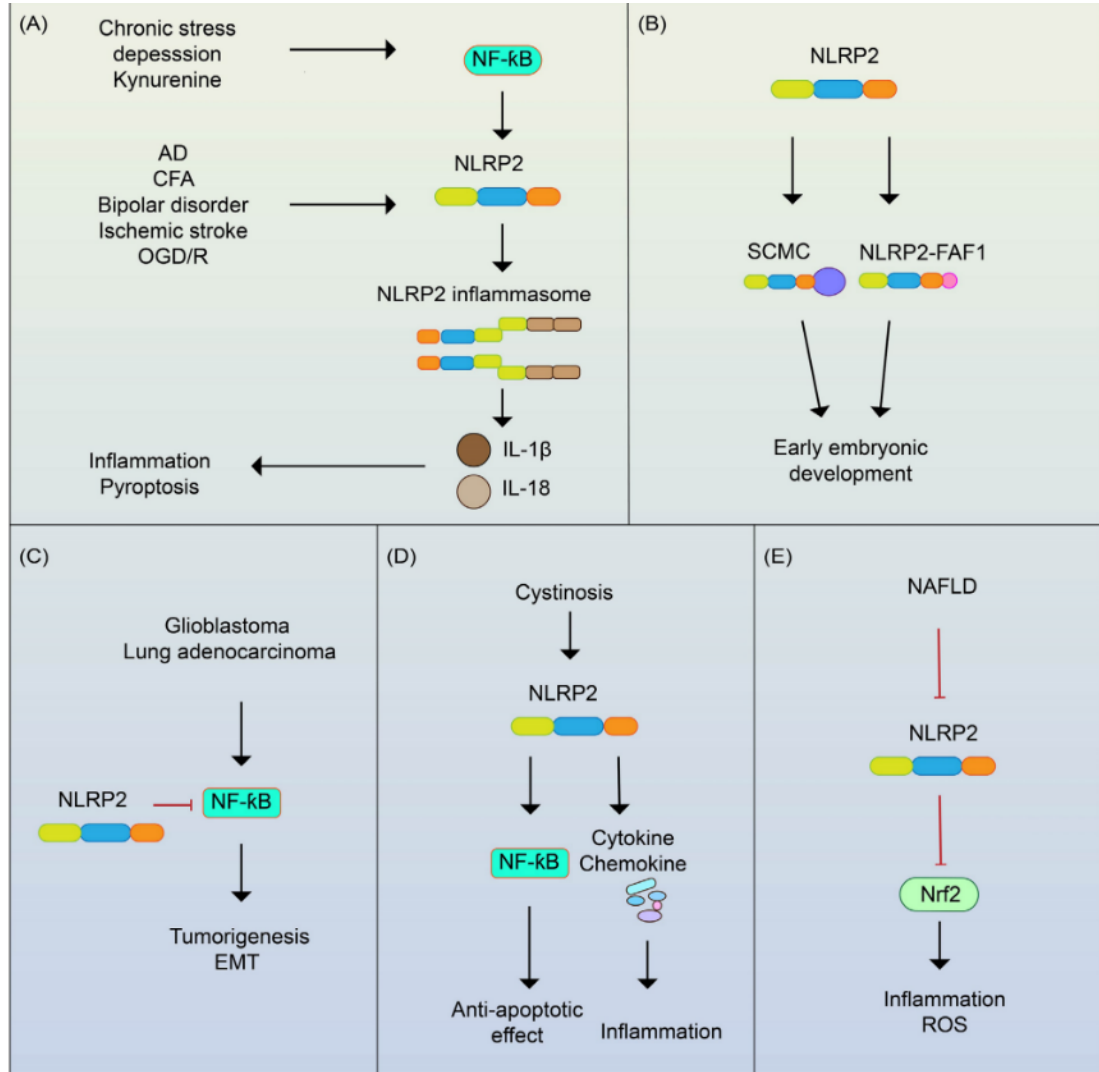
çalışma mevcuttur. Özellikle erken embriyonik gelişim üzerine etkili olduğunu gösteren yayınlar vardır. NLRP2 eksikliği erken embriyogenezi önlemektedir (36, 40)(Şekil 2.17). Buna ek olarak NF- κ B inhibisyonu üzerinden tümörogenezi inhibe ettiği glioblastom ve akciğer adenokarsinomunda gösterilmiştir (46, 47). Ayrıca sistinozisde, proksimal tübüler epitelyal hücrelerde, NLRP2'nin aşırı ifadelenmesinin inflamazom aktivasyonu olmaksızın NF- κ B aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin artışı uyardığı gösterilmiştir (Şekil 2.17)(48).

NLRP2 beyinde de eksprese olmaktadır (49). Nörolojik hastalıklardaki patogeneizde NLRP2'nin rolüne yönelik son yıllarda az sayıda çalışma bulunmakla beraber NLRP2'nin inflamazom yolağı üzerine etkilerini inceleyen hastalık modellerinde farklı sonuçlar bildirilmiştir (40). Bir çalışmada santral sinir sistemi hasarına bağlı ortaya çıkan inflamasyonu NLRP2'nin baskıladığı gösterilmiştir. Glukagon benzeri peptid 1 (GLP-1) analogu NLRP2 aktivasyonunu inhibe ederek Alzheimer Hastalığı'nda oluşan nöroinflamasyonu baskılamıştır (50).



Şekil 2.16 NLRP2'nin konakçı savunması ve inflamasyondaki fonksiyonları.

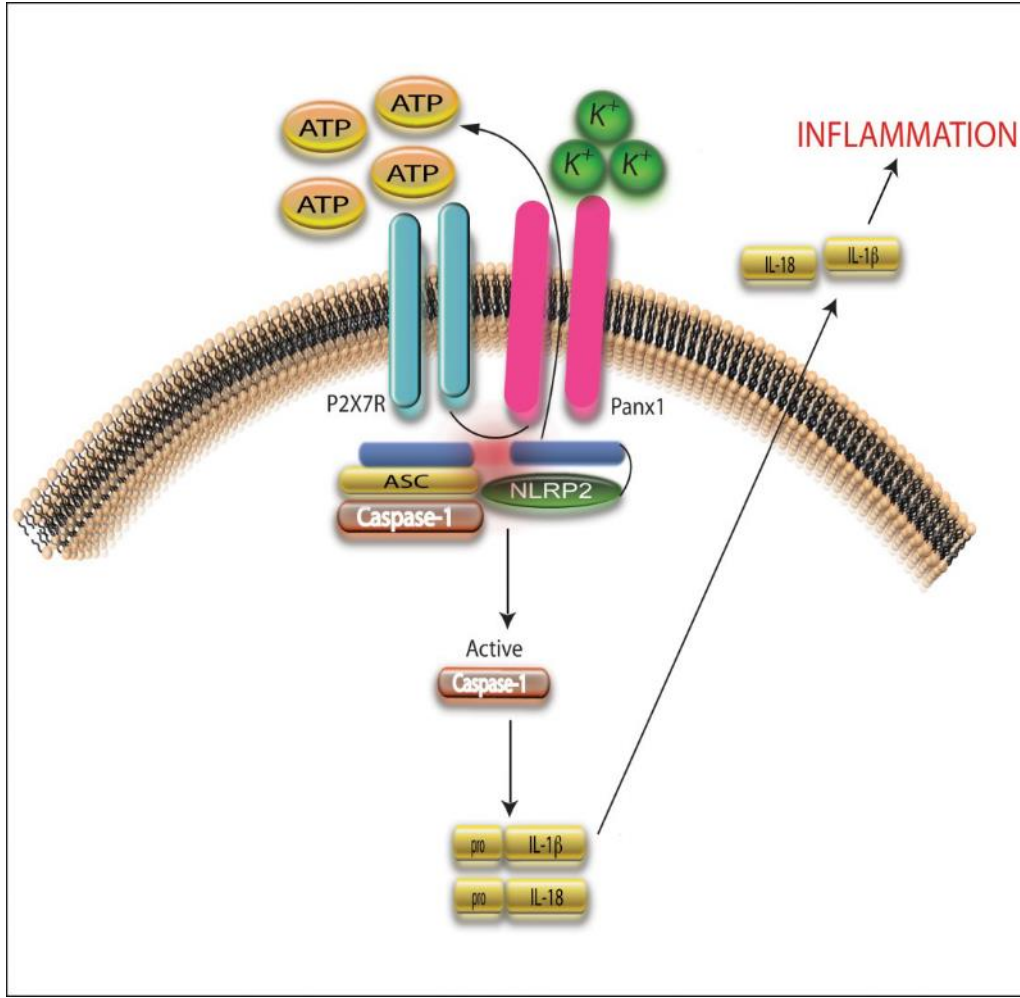
(A) NLRP2 ATP ile aktive olmaktadır. (B) NLRP2, ASC ve kaspaz 1 ile NLRP2 inflamazomunu oluşturmakta ve sonucunda kaspaz-1 aktive olarak proinflamatuvar sitokinler olan IL-1β ve IL-18 salıverilmesini uyarmaktadır. (C) TANK-bağlayıcı kinaz 1 (TNK-1) ile etkileşerek antiviral immüniteyi negatif olarak etkilemektedir. (D) NF-κβ yolğunun inhibitörüdür (36).



Şekil 2.17 NLRP2'nin çeşitli hastalıklarda görülen ortak ve farklı mekanizmalarla etkileri.

(a) Santral sinir sistemi hastalıklarında NLRP2 ifadenmesi artmakta, inflamasyon ve piropitozu tetiklemektedir. (b) NLRP2 SCMC formasyonunda yer almakta ve erken embriyonik gelişimde NLRP2-FAF1 krtitik rol oynamaktadır. (c) NLRP2 glioblastom ve akciğer adenokarsinomunda NF-κB sinyalizasyonunu inhibe ederek tümorogenezi inhibe etmektedir. (d) NLRP2 sistinozide proinflamatuvar ve antiapopitotik cevabı düzenlemektedir. (e) Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığında NLRP2 ifadenmesinin inhibisyonu Nrf2 yolağını baskılayarak hepatik steatozu hızlandırmıştır. AD, Alzheimer hastalığı; CFA, Freund adjuvant; EMT, epitelyal-mezenkimal geçiş; FAF1, Fas-iliskili protein faktör 1; IL-1β, interlökin-1β; IL-18, interlökin-18; NAFLD, nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı; NF-κB, nuclear faktör kappa B; Nrf2, NF-E2-iliskili faktör 2; OGD/R, oksijen-glukoz deprivasyonu ve reperfüzyon; ROS, Reaktif oksijen türleri; SCMC, subkortikal maternal kompleks (36).

NLRP2'nin esas olarak astrositlerde ifade olan inflamazom ailesinin bir üyesi olduğu bildirilmiştir. Astrositlerde ATP ile uyarılmış panneksin 1/ P2X7 aktivasyonu sonucu NLRP2 aktivasyonunun olduğu ve oluşan inflamazom kompleksinin kaspaz 1'i aktive ederek inflamatuvar yolağı tetiklediği hücre kültüründe gösterilmiştir (Şekil 2.18). KYD ile tetiklenen nöroinflamasyonun inflamazom yolağı üzerinden proinflamatuvar yolağı tetiklediği ve astrositlerde NF-kB'yi uyararak inflamasyonu tetiklediği bilinmektedir. Hemopoetik progenitor hücreler üzerinde yapılan bir çalışmada NF-kB yolağı uyarıldığında NLRP2'nin arttığı ve bu yolak üzerinden inhibitör etkisi olduğu gösterilmiştir (49, 51). Ancak alellik farklılıklarda bu inhibitör etkinin olmayabileceği ve kronik inflamatuvar hastalığa yatkınlık yaratabileceği öne sürülmüştür (51). Bunlara ek olarak farede iskemik inme modelinde NLRP2'nin aktivasyonunun serebral iskemi derecesini arttırdığı saptanmıştır (16, 52). İnflamatuvar ağrı hipersensitivitesinin oluşumunun dorsal kök gangliyonunda NLRP2 inflamazom aktivasyonu ile ilişkili olduğu, ancak diğer çalışmalardan farklı olarak küçük çaplı nöronlarda ekspresyonunun arttığı in vivo bir çalışmada gösterilmiştir (17).



Şekil 2.18 ATP ile uyarılan pürinerjik reseptörler ve NLRP2 inflamazom yoluyla ilişkisi.

Ekstrasellüler potasyumdaki artış panneksin kanallarının açılmasına ve ATP salıverilmesine neden olmaktadır. Ekstrasellüler ATP nin artışı P2X7 reseptörünü aktive etmektedir. P2X7 reseptörünün açılması ve daha fazla potasyumun çıkışı ise panneksin kanallarını aktive etmekte ve daha fazla ATP salıverilmesine neden olmaktadır (pozitif 'feedback'). Yüksek ATP panneksin 1'i inhibe ederek inflamazomun aşırı uyarılmasını ve hücre ölümünü inhibe etmektedir (negatif 'feedback') ancak uzamış ATP stimülasyonu bu inhibisyonu geçersiz kılmaktadır. Aktive olmuş panneksin 1, P2X7 için por oluşturmaktadır. Bu por NLRP2 ile bağlantılıdır. Pannexin 1'in uyarılması ATP çıkışına neden olmakta, NLRP2, ASC ve kaspaz 1 proteinlerinin yaklaşmasını uyarak NLRP2 inflamazom aktivasyonu ile sonuçlanan konformasyonel değişiklikleri tetiklemektedir. Buna ek olarak muhtemelen artmış intrasellüler ATP NACHT domainindeki Walker-A motifine bağlanarak NLRP2 oligomerizasyonuna yol açmaktadır. Kaspaz 1, muhtemelen potasyum çıkışının indüklemesi sonucu oto-proteoliz ile aktive olmaktadır. Aktif kaspaz 1 pro IL-1β'i bölmektedir. Astrositlerden salıverilen aktif IL-1β ise hücre membranındaki IL-1 reseptörüne bağlanarak oto ve parakrin inflammatuar cevabı uyarmaktadır (15).

Astrositlerin KYD sonrası ortaya çıkan inflamasyonda rol oynadığına dair kanıtlar mevcuttur. Familial hemiplejik migren 1 (FHM1) fare modelinde bazal düzeyde astrosit ve mikroglia aktivasyonunun olduğu gösterilmiştir (7). Özellikle NLRP3'ün astrositlerde aktivasyonunun olmadığına gösterilmesi ancak astrositlerin ortaya çıkan inflamasyonda yeri olduğunu gösteren kanıtlar dolayısı ile KYD'de farklı bir inflamazom üyesinin bu süreçte rolü olabileceği düşünülmüştür (53). Aynı zamanda NLRP2'nin aktivasyonunda ana uyarıcı ATP'dir ve KYD'nin uyarımının ortama ATP salınmasına neden olması yine panneksin 1 ve pürinerjik reseptörlerden P2X7'nin ortaya çıkan inflamatuvar yanıtta rolü olduğunu bilmesi, NLRP2'nin nöron-glia iletişimde ve ortaya çıkan inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde rolü olabileceği hipotezini doğurmuştur. Literatürde KYD'nin tetiklediği nöro-parainflamasyonda astrositik inflamazom yolağının rolü incelenmemiştir. Astrositik inflamazom yolağının ve özellikle NLRP2'nin genetik ve farmakolojik manipülasyonlar ile inhibe edilmesinin KYD oluşumu üzerine ve ortaya çıkan inflamatuvar yanıt üzerine etkisi henüz bilinmemektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

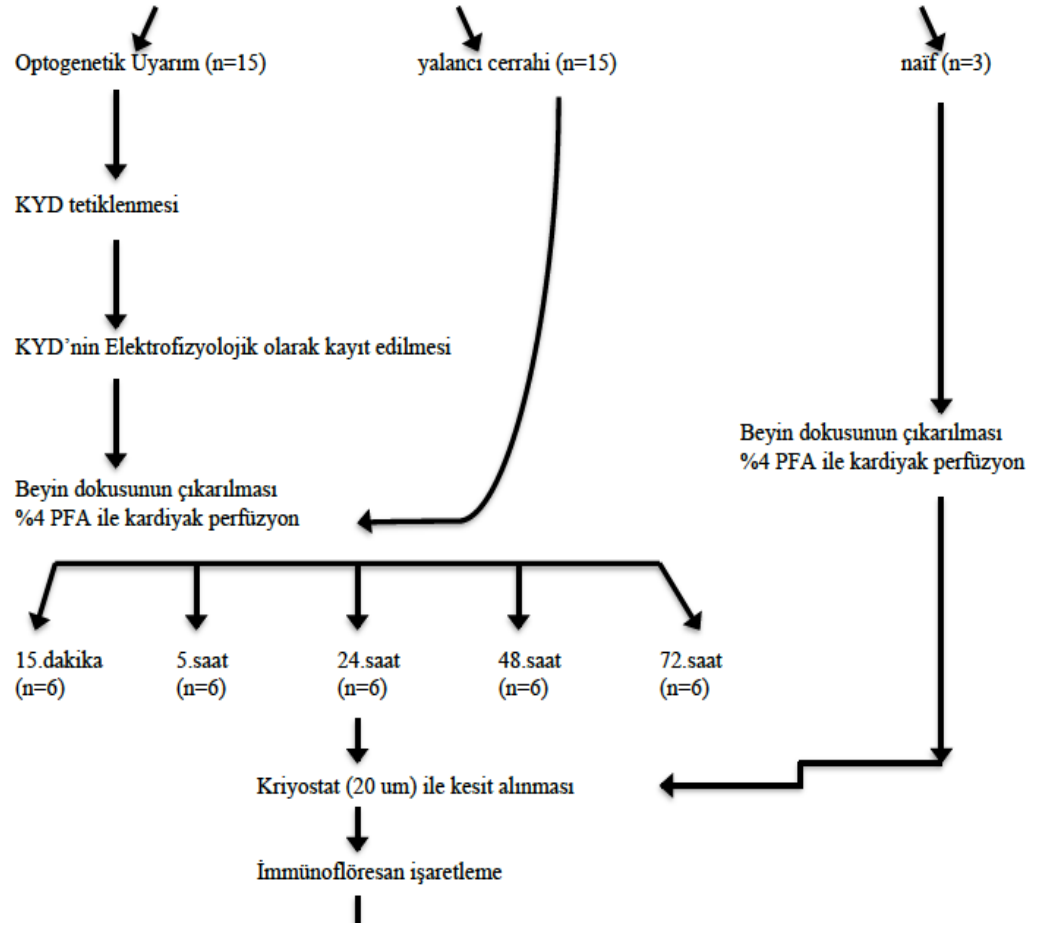
3.1 Deney Hayvanlarının Barındırılması

Deney hayvanları standart barınma koşullarında yiyecek ve suya serbest erişecek şekilde, 12 saatlik aydınlık ve karanlık döngüsünde, 22 ± 3 °C oda sıcaklığında ve %40-60 nem de barındırılmıştır.

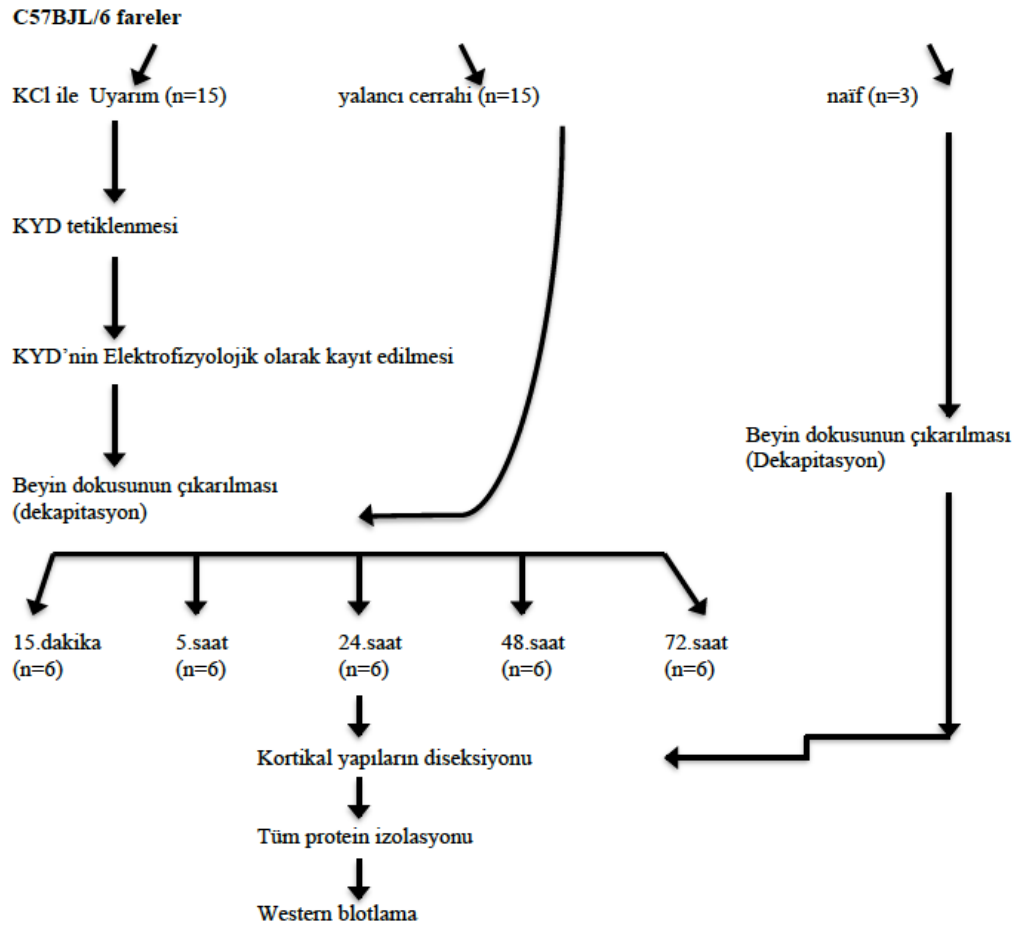
Tüm çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü Beyin Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiş olup, deneyler Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (2019/46). Bu çalışmada dişi ve erkek karışık olarak 33 C57BL/6J Thy1-ChR2-YFP), 33 C57BL/6J (Thy1-ChR2^{-/-}-YFP littermate) ve 36 C57BL/6J fare kullanılmıştır (Şekil 3.1, Şekil 3.2).

3.2 Anestezi ve Yaşamsal Bulguların Takibi

Cerrahi işlem öncesinde ve cerrahi sırasında izofluran (%4 indüksiyon, %1,75 idame) ile anestezi sağlanmıştır. Yeterli anestezi derinliğinin sağlanıp sağlanmadığını kontrol etmek için ayak sıkıştırma yöntemi kullanılmıştır. Deney hayvanları cerrahi işlemler için sterotaksik çerçevede (Digital Lab Standart Stereotaxic Frame, Stoelting, ABD), dış kulak yollarından ve burunlarından sabitlenecek şekilde yerleştirilmiştir. Deney boyunca farelere 2 L/dk oksijen desteği sağlanmış ve fareler spontan solunuma devam edecek şekilde takip edilmiştir. Rektal prob yardımıyla farelerin vücut sıcaklığı monitörize edilerek homeotermik battaniye ile $37 \pm 0,5$ °C'de olacak şekilde tutulmuştur (Kent Scientific, ABD). Deney sırasında aralıklı olarak ayak sıkıştırma yöntemi ile anestezi derinliği kontrol edilmiştir.



Şekil 3.1 Tez sırasında immünoflöresan işaretleme için yapılan deneylerin özeti.



Şekil 3.2 Tez sırasında western blot için yapılan deneylerin özeti.

3.3 Optogenetik Uyarım Yapılacak Farelerin Genotiplemesi

Deneyler optogenetik olarak uyarılabilen transgenik fareler (C57BL/6J Thy1-ChR2-YFP) ve kontrol grubu olarak C57BL/6J (Thy1-ChR2^{-/-}-YFP ‘littermate’) farelerde planlanmıştır.

Protokol;

Genotipleme için sütten kesilen farelerin kulaklarından alkolle temizlendikten sonra doku parçaları alınmış ve aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir;

a. Numune Alımı ve DNA İzolasyonu:

- 75 µl 25 mM NaOH/0,2 mM EDTA ependorf tüpe eklenir.
- Farelerin kulaklarının uç kısmından cerrahi makas ile yaklaşık 2 mm’lik parça kesilip ependorf tüpteki 25 mM NaOH/0,2 mM EDTA içine alınır.

- Tüpler 98 °C’de 1 saat inkübe edilir (Diğer adımı yapmaya hazır olana kadar sıcaklık 15 °C’ye düşürülüp bekletilebilir).
- Tüplere 75 µl 40 mM Tris HCl (pH 5,5) eklenir.
- 4000 rpm’de 3 dakika santrifüj yapılır.
- Süpernatant kısmı alınıp ayrı bir tüpe aktarılır. Kısa süreli +4 °C’de, uzun süreli -20 °C’de saklanır.

b. İzole edilen DNA’ların miktar tayini ve konsantrasyonlarının eşitlenmesi

- İzole edilen DNA örneklerinden kısa süreli vorteks sonrası 1 µl örnek alınıp nanodrop cihazında konsantrasyon ölçümü yapılır.

c. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

- Konsantrasyonları 2,5 ng/µl olarak eşitlenen örneklerin PCR işlemi için aşağıda belirtildiği şekilde reaksiyon bileşenleri hazırlanır:

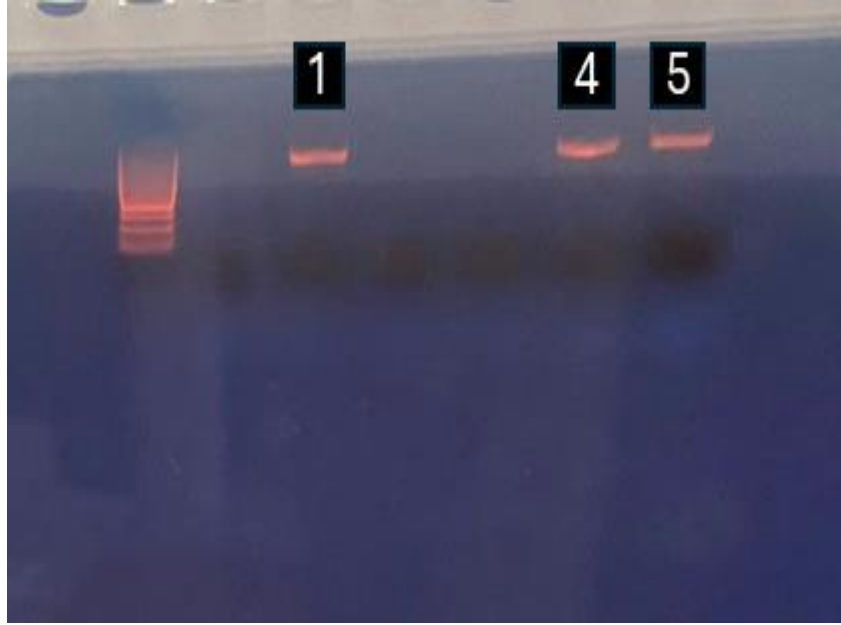
Reaksiyon Bileşenleri	1X	10X
Hot Start Taq 2X Master Mix (BioLabs M0496S)	12,5 µl	125 µl
Forward primer	5,0 µl	50 µl
Reverse primer	5,0 µl	50 µl
H ₂ O	0,5 µl	5 µl
DNA	2,0 µl	-

- PCR master miks, ‘forward’ primer, ters primer ve H₂O içeren karışım 10X olarak hazırlanarak PCR tüplerine 23,0 µl olarak dağıtılır ve her DNA örneği için ilgili tüpe 2,0 µl DNA örneği eklenir ve aşağıdaki PCR koşullarında reaksiyon gerçekleştirilir:

Sıcaklık	Süre	
94 °C	3 dakika	
94 °C	30 saniye	x35
60 °C	1 dakika	
72 °C	1 dakika	
72 C	5 dakika	

d. Agaroze Jel Elektroforez

- %1,5 konsantrasyonda TAE buffer ile agaroz solüsyonu hazırlanır, mikrodalgada agaroz çözülene kadar ısıtılır.
- Mikrodalgadan alınan solüsyon biraz soğutulur ve içine 7-8 µl EtBr eklenir (Normalde 100 ml solüsyona 5 µl EtBr olacak şekilde konur, daha net görüntü için 7-8 µl konulabilir).
- Hazırlanan solüsyon tarakları yerleştirilmiş jel aparatına dökülür ve donmaya bırakılır.
- Donan jel elektroforez tankına yerleştirilir. PCR'dan alınan ürünler 10 µl örnek + 10 µl yükleme boyası ('orange dye') olacak şekilde karıştırılıp kuyucuklara yüklenir ve DNA'lar yürütülür.
- Elektroforez sonrası bant görülen örnekler Thy-1⁺ olarak belirlenir (
- Şekil 3.3).



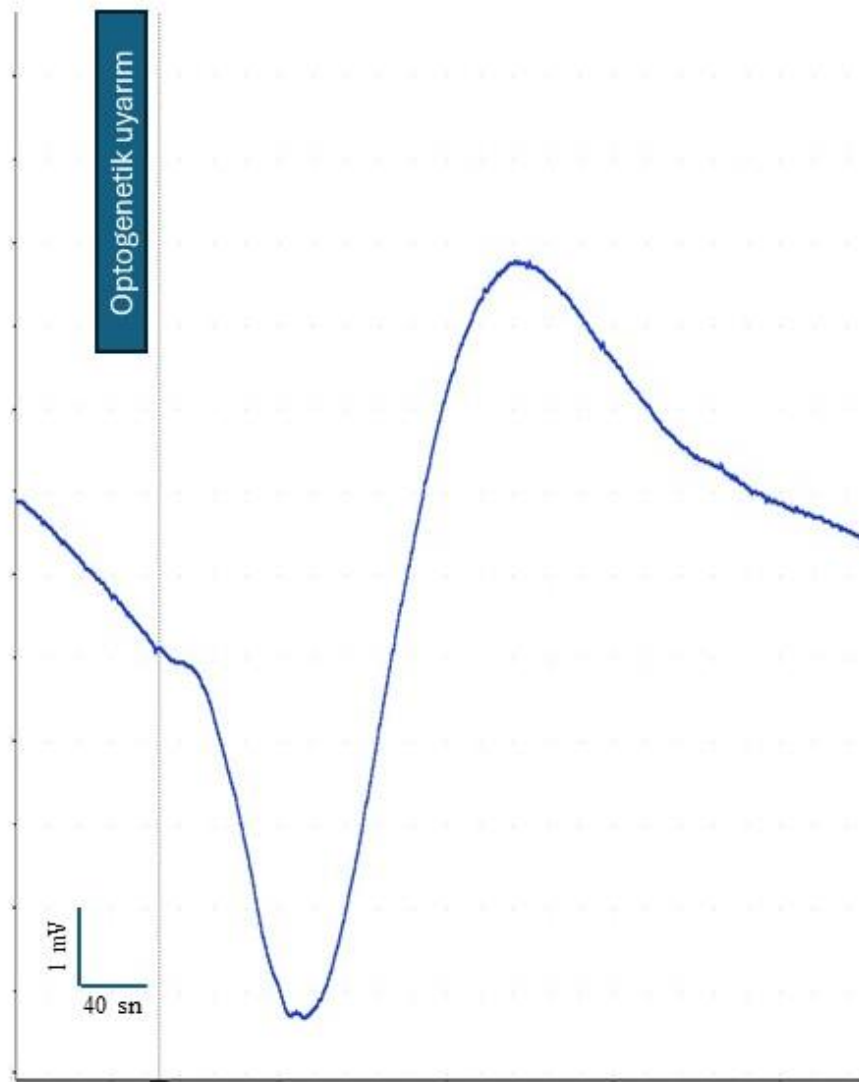
Şekil 3.3 Thy1-ChR2-YFP genotipi taşıyan farelerin belirlenmesi.

Thy1-ChR2-YFP soldan sağa doğru kontrol, negatif kontrol ve 5 fareye ait DNA örnekleri kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez sonrası band saptanması örneğin Thy1-ChR2 genotipi taşıdığını ifade etmektedir. Bu örnekleme 1, 4 ve 5 no'lu farelerin Thy1-ChR2 genotipi taşıdığı gösterilmiştir.

3.4 Optogenetik Yolla Kortikal Yayılan Depolarizasyon Dalgasının Uyarımı ve Beyin Dokusunun Eldesi

Deneyler izofluran anestezisi altında yapılmıştır. Thy1-ChR2-YFP transgenik ve 'littermate' fareler anestezisi uygulamasını takiben stereotaksik çerçeveye yerleştirilmiş ve stereomikroskop (Zeiss SV6) altında cerrahi işlemler gerçekleştirilmiştir. Önce orta hatta bir cilt kesisi yapılarak bregma, frontal ve pariyetal kemikler ortaya konulmuştur. Elektrofizyolojik kayıt için pariyetal kemik yüksek hızlı drill ile inceltirilmiştir. İnceltme esnasında serum fizyolojik ile kemik soğutulmuştur. İnceltile kemik bölgesi işaretlenmiş ve bir adet Ag-AgCl₂ pellet elektrot kraniyum üzerine indirilmiştir. Topraklama için bir adet Ag-AgCl₂ disk elektrot ense kaslarının arasına yerleştirilmiştir. Elektrotlar Powerlab veri kazanım sistemine bağlanmıştır. Elektrofizyolojik kayıt başlatılmış ve labchart programı ile fizyolojik kaydın kalitesi kontrol edilmiştir. Kayıt stabil hale geldiğinde bir adet optogenetik uyarı frontal kemik üzerinden 450 nm dalga boyutunda ve 4 mW gücünde ışık şiddetine sahip lazer kaynağı ile, 400 µm çapında 0,48 nümerik aperatür ile yapılmıştır. Uyarı 50 mJ

şiddetinde 10 saniye süre ile uygulanmış ve kortikal yayılan depolarizasyon dalgasının elektrofizyolojik kaydı alınmıştır (Şekil 3.4) KYD oluşumunu takiben 15 dakika daha spontan KYD gelişimi açısından elektrofizyolojik kayıt devam ettirilmiş ve bu sürenin sonunda kayıt sonlandırılmıştır.



Şekil 3.4 Optogenetik uyarım sonucu kaydedilen Kortikal Yayılan Depolarizasyon dalgasının örneği.

Thy1-ChR2-YFP farede 450 nm dalga boyuna sahip lazer ışığı, 400 μ m çapında ve 0,48 nümerik apertürüne sahip bir fiberoptik kablo aracılığıyla, farelerin sağ frontal kemiği üzerine yerleştirilerek (bregmanın 1 mm anterioru, 1 mm lateraline) uygulanmıştır. Kortikal yayılan depolarizasyon dalgasını tetiklemek için daha önce laboratuvarımızda saptanan eşik değerinin üzerinde (supraeşik değeri) olan 50 mW, 10 sn süre ile uyarım verilmiştir. Ag-AgCl₂ elektrot ile elektrofizyolojik olarak kaydedilmiştir. Elektrot sağ pariyetal kemik üzerine (bregmanın sağ 4 mm posterior, 3 mm lateraline) yerleştirilmiştir.

Uyarımı takiben belirlenen zaman noktalarında deney sonlandırılmış, 5, 24, 48 ve 72 saatte beyin dokusu elde edilmesi planlanan deneylerde ise kesi bölgesi suture edilerek fare anesteziden uyandırılmış ve ilgili zaman diliminde kloralhidrat ile tekrar anestezi uygulanmıştır. Aynı şekilde kontrol (sham) grubunda da KYD uyarımı dışındaki tüm basamaklar uygulanmıştır. Naif grupta ise 12-16 haftalık, 20-25 gr ağırlığında transgenik (n=3) fare kullanılmıştır. Naif farede anestezi dışında hiçbir işlem uygulanmadan perfüzyona geçilmiştir.

Farelerde kardiyak perfüzyon, deney planına göre uyarımı takiben 15. dakika, 5., 24., 48. ve 72. saatte yapılmıştır. Tüm gruplarda beyin dokusu çıkarıldıktan sonra %4 PFA'da 24 saat, ardından %30 sukroz çözeltisi içinde 48 saat kriyoproteksiyon için bekletilmiş, ardından kriyomikrotomla (Leica CM 1100) 20 nm kalınlıkta koronal kesitler alınmıştır.

3.5 İmmünoflöresan İşaretleme

İmmünoflöresan analizlerde kullanılmak üzere her zaman noktası için n=3 olacak şekilde deney grupları planlanmıştır (Tablo 3. 1).

Lam üzerine alınan kesitler işlem başlamadan önce oda sıcaklığında TBS altında 5 dakika bekletilmiştir. Kesitler ilk önce 80° derecede 10 dakika sitrat solüsyonu içinde sıcak su banyosunda muamele edilmiştir. Çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığına gelmesi için yaklaşık 30 dakika bekletilmiştir. Ardından 10 dakika %0,2'lik Triton X içeren TBS ile muamele edilerek permeabilizasyon yapılmıştır. Takiben 0,3M glisin ve %10'luk normal keçi serumu (NGS) içeren blokaj solüsyonu ile 75 dakika bloke edilmiştir. Daha sonra blokaj solüsyonu içinde 1/100 NLRP2 (15182-1-AP Proteintech) içeren solüsyonda +4 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben kesitler 3 defa 5'er dakika TBS ile yıkanmış ardından keçi anti tavşan sekonder antikor (1/200 Goat Anti Rabbit Alexa fluoro 488 Abcam-ab150077) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Üç defa 5'er dakika TBS ile yıkamayı takiben Hoechst-33258 ile kapatılmış ve konfokal mikroskopi ile görüntüler alınmıştır. İşaretlenen hücreleri tanımlayabilmek için ikili işaretleme yapılmıştır. Bu deneylerde nöronların işaretlenmesinde NeuN (1/150, Milipore MAB377), astrositler için ise S100β (1/150, Atlas antibodies MAB03629) kullanılmıştır. İkili işaretleme

yapılan deneylerde Hoechst basamağından önce kesitler +4°C’de 24 saat ilgili antikor ile, yıkamayı takiben uygun sekonder (Goat anti Mouse Cy3, Jackson ImmunoResearch) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Basamaklar arasında TBS ile 3 kez 5’er dakikalık yıkama yapılmıştır.

Tablo 3. 1 İmmünoflöresan işaretleme için yapılan deneylerde zaman noktalarına göre fare sayısı ve dağılımı

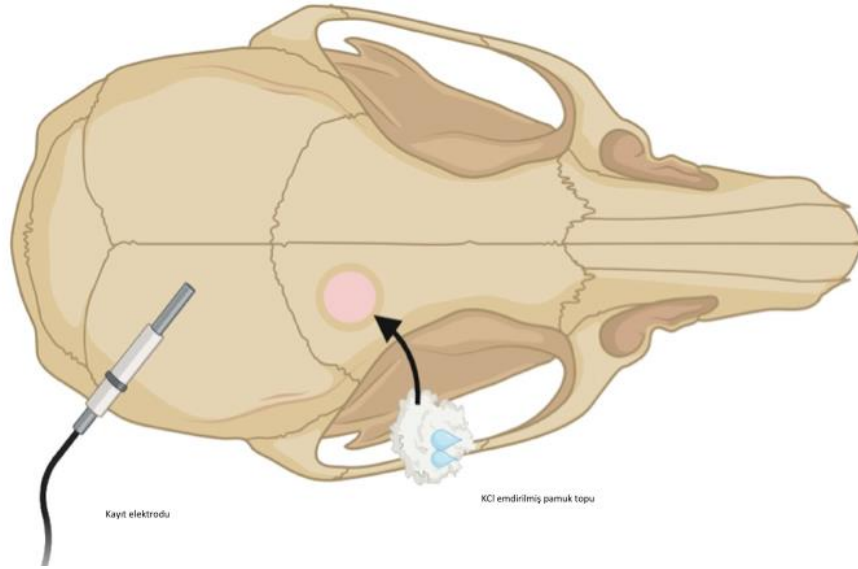
DENEY	Sham (‘littermate’)	Thy1-ChR2-YFP Tg
Naif	n=3	n=1
15 dakika sonra beyin eldesi	n=3	n=3
5 saat sonra beyin eldesi	n=3	n=3
24 saat sonra beyin eldesi	n=3	n=3
48 saat sonra beyin eldesi	n=3	n=3
72 saat sonra beyin eldesi	n=3	n=3

3.6 Western Blotlama için Beyin Eldesine Yönelik Yapılan Deneyler

Western blot analizlerinde kullanılmak üzere her zaman noktası için gruplarda n=3 olacak şekilde deneyler planlanmıştır (Tablo 3. 2).

Bu deneylerde denek olarak C57/BL6J fareler kullanılmıştır. Bunun nedeni optogenetik transgenik fare üretiminin yavaş olması nedeniyle yeterli sayıda farenin uygun zamanda temin edilememesi, laboratuvarında başka projelerde de bu transgenik farelerin kullanılıyor olması ve farklı KYD uyarım yöntemi kullanılarak NLRP2 inflamazom cevabının incelenmesinin planlanmış olmasıdır. KYD dalgasının tetiklenmesi için optogenetik yöntem dışında farklı bir yöntem kullanılmıştır. Bu dönemde laboratuvarında denenen, cerrahi olarak minimal invaziv girişimlerin kullanıldığı, kafa kemiğinde delik (burrhole) açılmaksızın yeterli inceltme yapıldıktan sonra KCl ile KYD uyarımının sağlandığı yöntem tercih edilmiştir (Şekil 3.5). Bu süreçte Tablo 3. 2’de belirtilen deney gruplarından Western Blotlama analizi için korteks dokuları elde edilmiştir.

Deneyler izofluran anestezisi altında yapılmıştır. C57/BL6J fareler anestezisi uygulamasını takiben stereotaksik çerçeveye yerleştirilmiş ve stereomikroskop (Zeiss SV6) altında cerrahi işlemler gerçekleştirilmiştir. Önce orta hatta bir cilt kesisi yapılarak bregma, frontal ve pariyetal kemikler ortaya konulmuştur. Frontal korteks üzerindeki 2-3 mm büyüklüğünde bir bölge incelenmiştir. Elektrofizyolojik kayıt için ise pariyetal kemik yüksek hızlı drill ile incelenmiştir. İnceltme esnasında serum fizyolojik ile kemik soğutulmuştur. İncelenen kemik bölgesi işaretlenmiş ve bir adet Ag-AgCl₂ pellet elektrot kraniyum üzerine indirilmiştir. Topraklama için bir adet Ag-AgCl₂ disk elektrot ense kaslarının arasına yerleştirilmiştir. Elektrotlar Powerlab veri kazanım sistemine bağlanmıştır. Elektrofizyolojik kayıt başlatılmış ve labchart programı ile fizyolojik kaydın kalitesi kontrol edilmiştir. Kayıt stabil hale geldiğinde frontal bölgedeki incelenmiş alana KYD indüklemek amacıyla 1 M KCl emdirilmiş pamuk topu yerleştirilmiştir. Tek KYD elde etmek için pamuk topu KYD oluşumunu takiben kaldırılmış ve alan serum fizyolojik ile yıkanmıştır, oluşan KYD dalgası veri kazanım ve analiz sistemi (Powerlab, ADInstruments) ile kaydedilmiştir. Devamında spontan KYD oluşumuna karşı kayıt, ilk KYD'yi takiben 15 dakika daha devam ettirilmiştir. Sham gruplarında KCl yerine serum fizyolojik emdirilmiş pamuk topu incelenmiş kemik bölgesine yerleştirilmiş ve 15 dakika boyunca elektrofizyolojik olarak spontan KYD oluşmadığını görmek üzere kayıt alınmıştır.



Şekil 3.5 KCl ile yapılan KYD uyarımı denek düzeneği.

Bu düzende kemik intact olacak şekilde frontal bölgede yüksek hızlı drill ile inceltme yapılmaktadır. İnceltilen bölgeye KCl emdirilmiş pamuk topları yerleştirilmekte ve KYD oluşumu elektrofizyolojik olarak takip edilmektedir. KYD oluşumunu takiben alan serum fizyolojik ile temizlenmekte böylece tekrarlayan KYD gelişimi önlenmeye çalışılmaktadır. Sham gruplarında KCl yerine serum fizyolojik emdirilmiş pamuk topu inceltilmiş bölgeye yerleştirilmektedir.

Tablo 3. 2 Western Blot Görüntüleme için yapılan deneylerin zaman noktalarına göre denek sayısı ve dağılımı.

DENEY (C57 fare)	Sham	KYD
15 dakika sonra beyin eldesi	n=3	n=3
5 saat sonra beyin eldesi	n=3	n=3
24 saat sonra beyin eldesi	n=3	n=3
48 saat sonra beyin eldesi	n=3	n=3
72 saat sonra beyin eldesi	n=3	n=3
Naif (n=3)		

Uyarımı takiben belirlenen zaman noktalarında deney sonlandırılmış, 5, 24, 48 ve 72 saatte beyin dokusu elde edilmesi planlanan deneklerde ise kesi bölgesi sütüre edilerek fare anesteziden uyandırılmış ve ilgili zaman diliminde kloralhidrat ile tekrar anestezi uygulanmış ve beyin dokusu elde edilmiştir. Beyin dokusu eldesinde denek dekapite edilmiş, hızlıca beyin dokusu çıkarılmış, buz üstünde ipsilateral ve kontrateral olmak üzere serebral hemisferlerden korteks bölgesi ayrılmıştır. Naif denekte ise sadece anestezisi uygulanarak aynı yöntemle beyin dokusu elde edilmiştir.

Elde edilen korteks dokusu tartılarak doku yaşı ağırlığı solüsyonun %30'u olacak şekilde 1/100 proteaz inhibitörü ve homojenizasyon tamponu RIPA (radioimmünopresipitasyon assay) eklenerek, buz üzerinde olacak şekilde sonikatör yardımı ile homojenize edilmiştir. Kullanılan RIPA solüsyonu 150 mM NaCl, %1 Triton X-100, %0,5 deoksikolik asit, %0,1 SDS, ve 50 mM pH 8,0 olan tris solüsyonu içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bu işlem sonrası örnekler 30 dakika buz üzerinde bekletilmiş, ardından +4°C'de 14000 RPM'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant ayrılmıştır. Elde edilen süpernatantlar epandorflara alınıp ölçümler yapılana kadar saklanmak üzere -80°C'ye kaldırılmıştır.

Bu deneyler sonucunda elde edilen beyinlerden hazırlanan örneklerde protein konsantrasyonunun tayini bisinkoninik asit (BCA) tahlili ile yapılmıştır. BCA analizi için ticari kit kullanılmıştır (Thermo Scientific™, 23225). Ticari kit üreticisinin yönergelerince örnekler ve distile su içinde belli konsantrasyonlarda hazırlanan albümin standartları kitin çalışma solüsyonuyla karıştırılıp 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra spektrofotometre yardımıyla 562 nm'deki absorbansları ölçülmüştür. Standart proteinlerin absorbans-konsantrasyon eğrileri Excel programıyla çizilip eğrinin formülü çıkartılmıştır. Bu formül yardımıyla her bir örnekteki protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

Total protein konsantrasyonu 30 µg olacak şekilde örnek hacmi belirlenmiştir. Örnekler poliakrilamid jele yüklenmiş ve 90 V altında 1,5 saat süresince elektroforez yapılmıştır. Transferde ıslak transfer yöntemi kullanılmıştır. Jel içerisinde kütlelerine göre ayrılmış proteinler, metanol ile aktive edilen PVDF (poliviniliden diflorür) membranlara 20 V elektriksel akım altında ıslak transfer yöntemiyle aktarılmıştır. %0,1 Tween-20 içeren tris tamponlu fosfat (TBS) içinde hazırlanan %5 yağsız süt tozu ile 1 saat oda sıcaklığında bloke edildikten sonra membranlar anti-NLRP2 (1/500) primer antikorlarıyla (15182-1-AP, Proteintech) 1,5 saat oda sıcaklığında, ardından +4°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün yıkama sonrasında 1:5000 derişiminde sekonder antikör ile 37°C'de 1 saat ve takibinde 1,5 saat oda sıcaklığında muamele edilmiş ve yıkama işleminden sonra güçlendirilmiş kemilüminesans (Super Signal West-Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific™, 34096) substratıyla birleştirilerek membranlar Kodak görüntüleme istasyonunda

görüntülenmiştir. Aynı örneklerde internal standard olarak β -aktine (1:5000; Sigma A5441) ait bant ölçümleri de yapılmıştır.

3.7 Elde Edilen Görüntülerin Analizi

İmmünoflöresan işaretleme yapılan kesitler Leica TCS SP8 konfokal lazer taramalı mikroskop ile (Leica, Wetzlar, Almanya) incelenmiş 2048×2048 çözünürlükte görüntüler elde edilmiştir.

Neun-NLRP2 ve s100 β -NLRP2 olacak şekilde ikili işaretleme yapılan kesitlerden her örnekten 2'şer görüntü elde edilmiştir. Bu görüntülerde NLRP2 (+), NeuN (+) hücreler ve Hoechst (+) hücre çekirdekleri manuel olarak sayılmış ve kayıt edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerde ise NLRP2 (+) hücrelerin NeuN (+) hücrelere oranı ile NLRP2 (+) hücrelerin Hoechst (+) hücrelere oranları alınarak karşılaştırma yapılmıştır.

Western Blotlama tekniği ile elde edilen ve Kodak görüntüleme istasyonunda elde edilen membran görüntülerinden NLRP2 molekül ağırlığına uygun olan bantlar seçilmiştir. FIJI/ImageJ (National Institute of Health, ABD) program kullanılarak dansitometrik analizleri yapılmış ve internal standarda (β aktin) göre oranı olarak ifade edilmiştir.

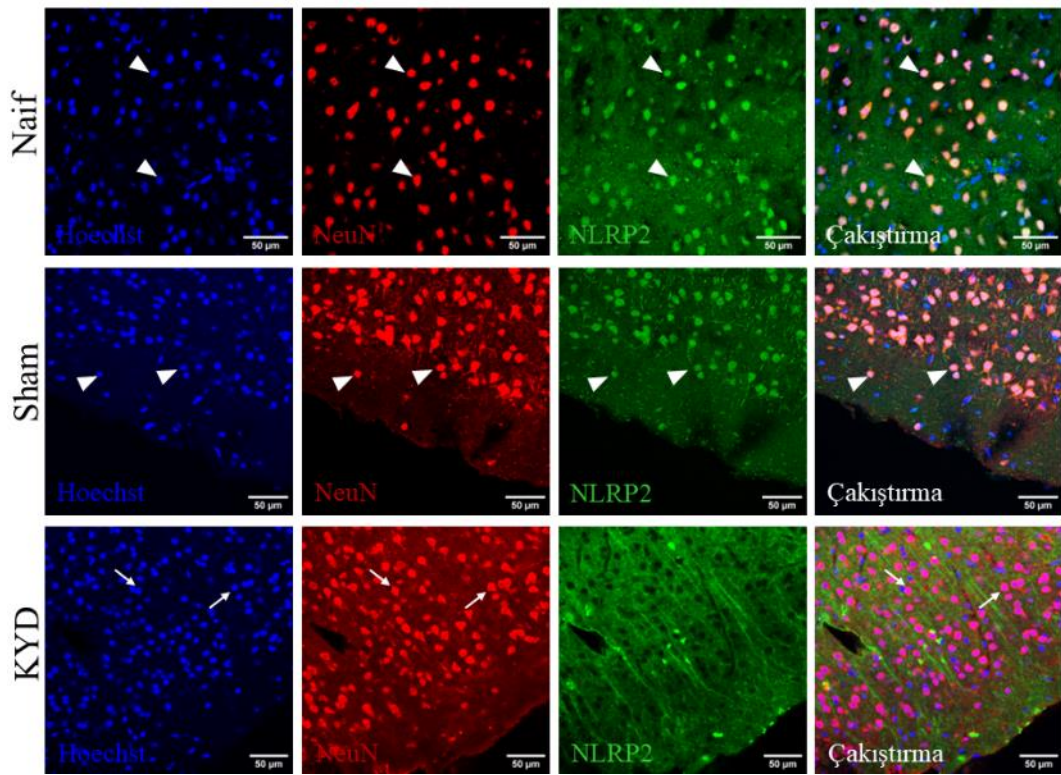
3.8 İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel analizler için IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 20 kullanılmıştır. Analizlerde ikiden fazla bağımsız grup kıyaslandığında normal dağılan veri grupları için tek yönlü varyans analizi (ANOVA), normal dağılmayan veri grupları için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Bu testlerde anlamlı sonuç bulunması durumunda, uygun post-hoc testler uygulanmıştır. Normal dağılan verilerin homojenliği Levene testiyle belirlendikten sonra homojen verilerde Tukey, homojen olmayan verilerde Tamhane testi ile post-hoc analiz yapılmıştır. Normal dağılmayan veri grupları ve iki bağımsız değişken kıyaslandığında Mann Whitney U testi uygulanmıştır. Tüm testlerde p değerinin 0,05 den küçük olması anlamlı olarak kabul edilmiştir. Post-hoc testler sırasında anlamlılık düzeyinin belirlenmesinde Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır.

4. SONUÇLAR

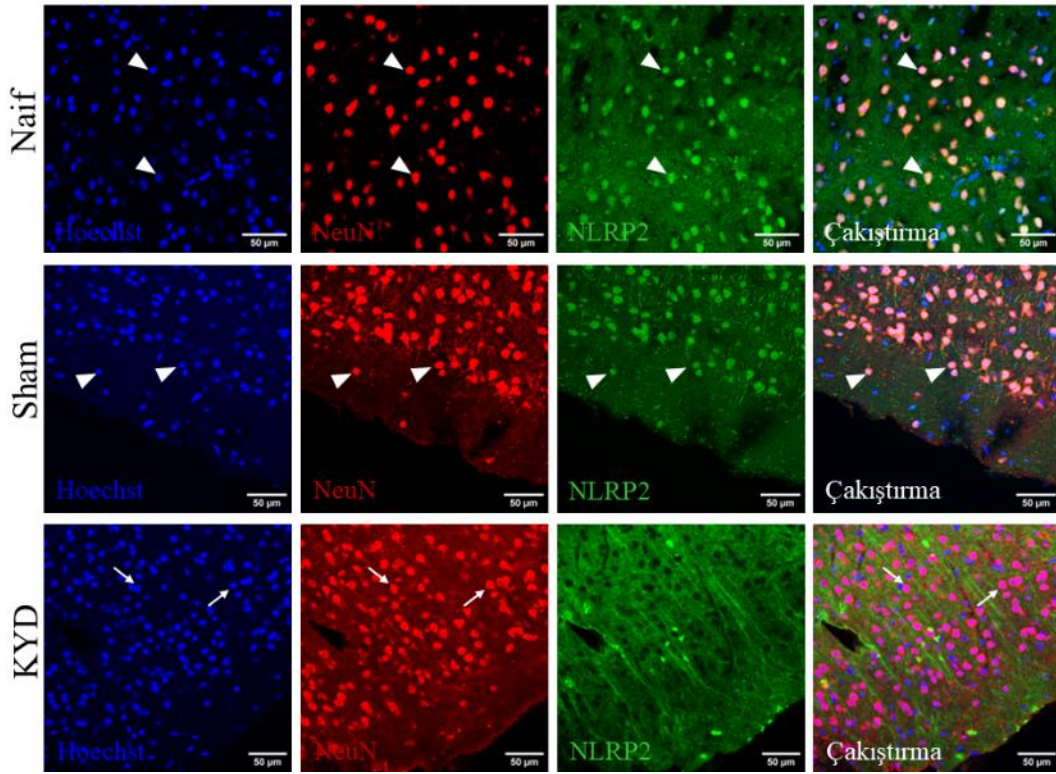
4.1 NLRP2 ifadenmesinin immünofloresan yöntem ile gösterilmesi

Bu çalışmada, fare beyinlerinde optogenetik olarak indüklenen tek kortikal yayılan depolarizasyonun (KYD) ardından NLRP2'nin immünoreaktivitesi araştırılmıştır. Başlangıçta NLRP2'nin ekspresyon paterni immünofloresan işaretleme yöntemiyle incelenmiştir. Erken dönemde (15. dk) NLRP2'nin hücrel immünoreaktivitesi, kontrol ve naif grup beyinlerinin kortikal ve subkortikal bölgelerinde belirgin olarak saptanmıştır. Bu immünoreaktivite,



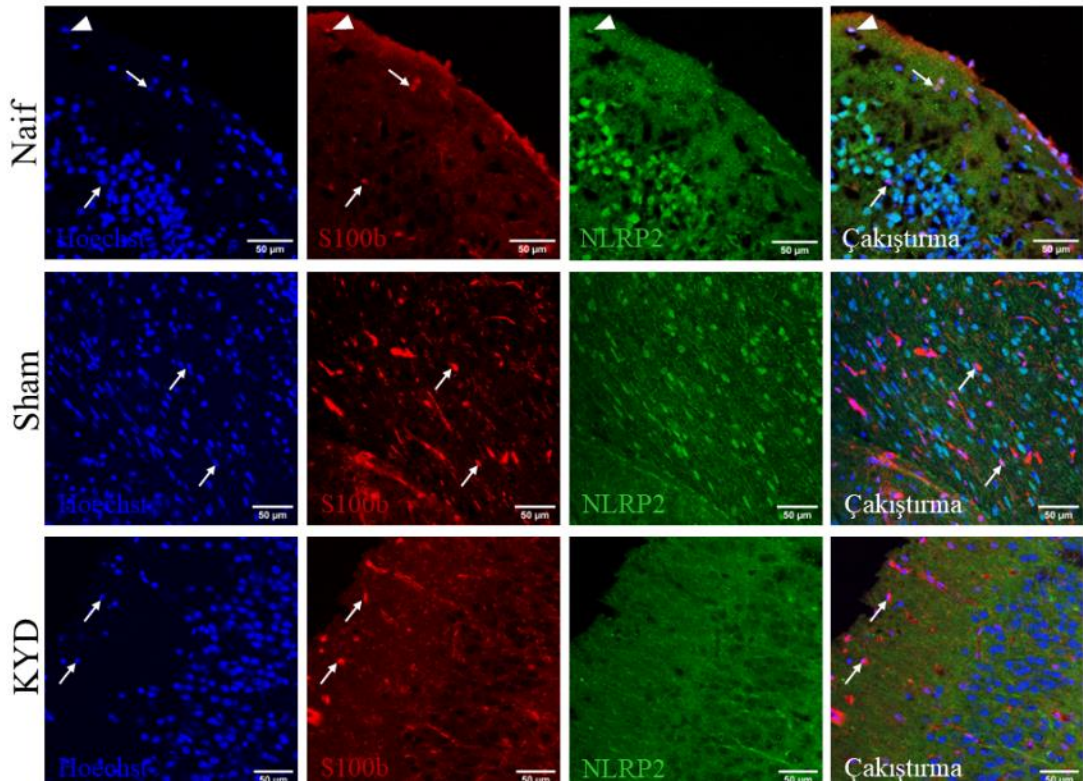
Şekil 4.1’de gösterildiği üzere KYD grubundaki kesitlerde dikkate değer bir azalma sergilemiştir.

Daha sonra, NLRP2 ekspresyonunun hücrel özelliğini tanımlamak için ikili işaretleme deneyleri yapılmıştır. Sonuçlar, NLRP2’yi ifade eden hücrelerin çoğunluğunun, bir nöronal belirteç olan NeuN ile kolokalizasyon sergilediğini, daha küçük bir alt kümenin ise Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterildiği gibi bir astrosit belirteci olan S100 β ile kolokalizasyon gösterdiğini ortaya koymuştur.



Şekil 4.1 NLRP2 immünoreaktivitesinin NeuN (+) hücrelerde KYD'den sonraki 15. dakikada gösterilmesi.

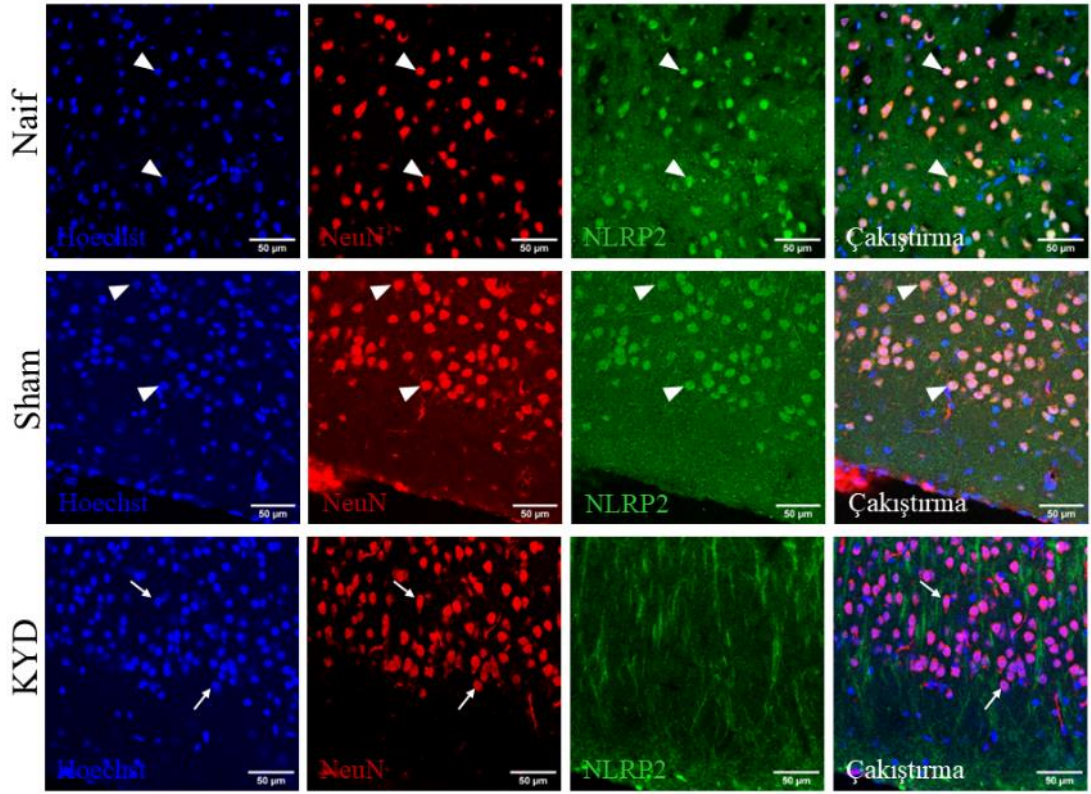
Thy1-ChR2-YFP fare beyinlerinde (naif ve KYD grubu) ve 'littermate' sham grubunda NeuN (kırmızı) ve NLRP2 (yeşil) ile ikili işaretleme yapılmıştır. Hoechst (mavi) çekirdek işaretlemesi için kullanılmıştır. Naif grup (üst sıra) ve kontrol grup (orta sıra) beyin görüntüleri hücreler NLRP2 işaretlenmesini göstermiş olup, tek (ok) KYD sonrası alınan (alt sıra) kesitlerde bu işaretlemenin belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir (ince ok). Naif ve Sham kesitinde nöronal işaretleme (NeuN) ve NLRP2 yüksek oranda ko-lokalizasyon göstermektedir (Ok başı; NLRP2 ile çakışma gösteren hücreleri göstermekte, ince ok; ise çakışma olmayan hücreleri göstermektedir).



Şekil 4.2 NLRP2 immünoaktivitesinin s100 β (+) hücrelerde KYD'den sonraki 15. dakikada gösterilmesi.

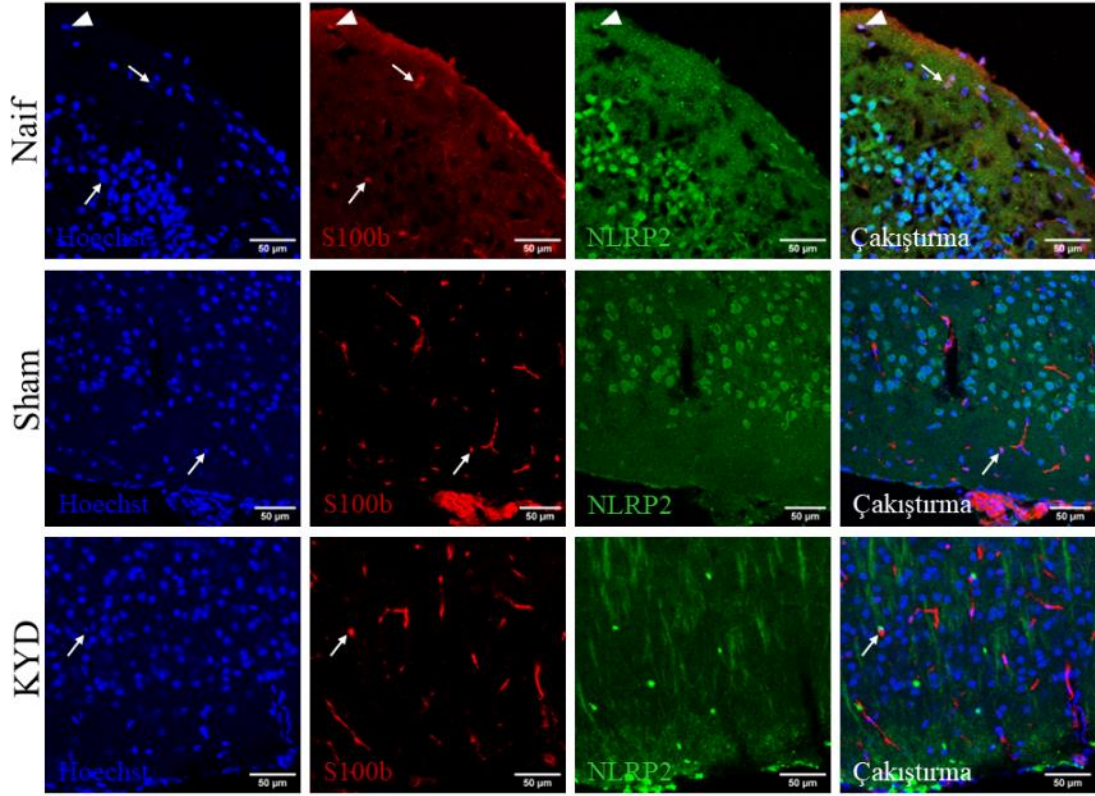
Thy1-ChR2-YFP fare beyinlerinde (naif ve KYD grubu) ve 'littermate' sham grubunda S100b (kırmızı) ve NLRP2 (yeşil) ile ikili işaretleme yapılmıştır. Hoechst (mavi) çekirdek işaretlemesi için kullanılmıştır. Naif grup (üst sıra) ve kontrol grup (orta sıra) beyin görüntüleri hücreler NLRP2 işaretlenmesini göstermiş olup, tek KYD sonrası alınan (alt sıra) kesitlerde bu işaretlemenin belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. S100b pozitif astrositler ile NLRP2 örtüşmesi çok azdır (Ok başı; NLRP2 ile çakışma gösteren hücreleri göstermekte, ince ok; ise çakışma olmayan hücreleri göstermektedir).

Çalışmamızda optogenetik yolla indüklenen tek KYD sonrasında farklı zaman noktalarında elde edilen beyin dokularından alınan kesitlerde NLRP2 immünoaktivitesi incelenmiştir. Yapılan immünofloresan işaretlemelerde 5. saat (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4) ve 24. saatte (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5) elde edilen beyin kesitlerinde erken dönemde (15. dk) görüldüğü üzere NLRP2 immünoaktivitesinde belirgin azalma bu zaman noktalarında da aynı şekilde devam etmiştir. İlginç olarak 48. saatte (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7) ve 72. saatteki (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9) işaretlemelerde ise NeuN (+) hücrelerde özellikle NLRP2 ifadenmesinin diğer zaman noktalarına göre arttığı naif ve sham grubuna benzer bir özellik gösterdiği izlenmiştir.



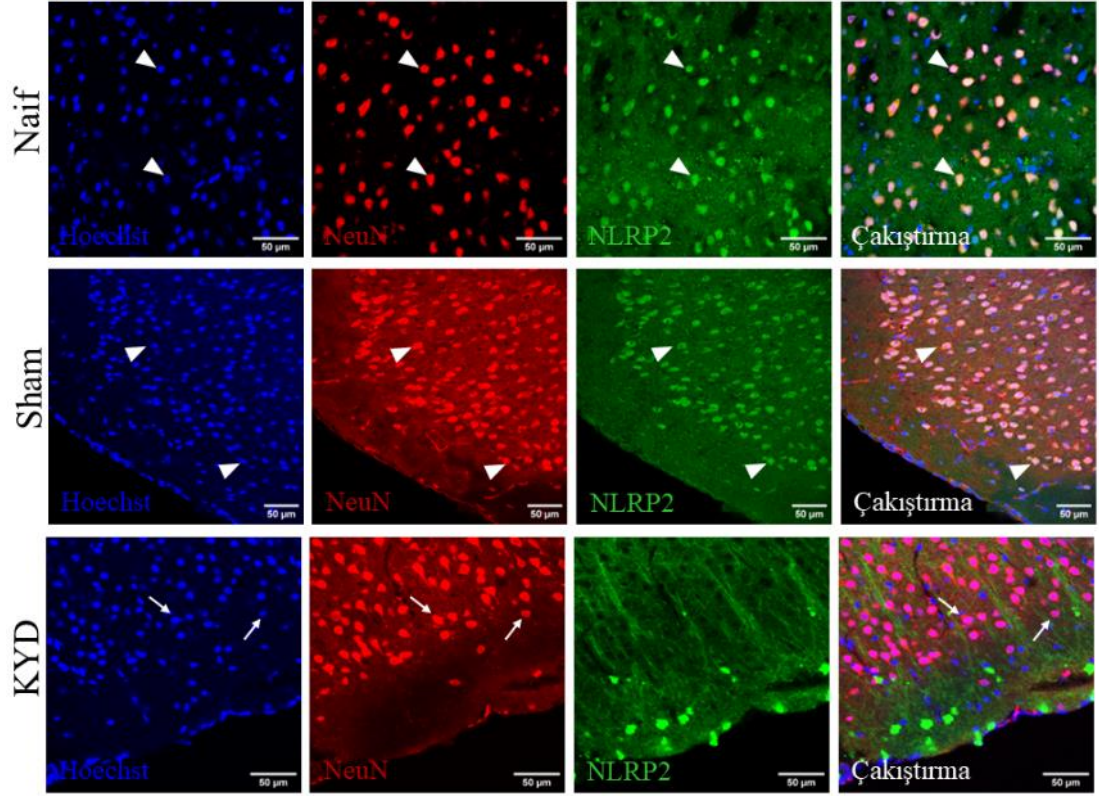
Şekil 4.3 NLRP2 immünoaktivitesinin NeuN (+) hücrelerde KYD'den sonraki 5. saatte gösterilmesi.

Thy1-ChR2-YFP fare beyinlerinde (naif ve KYD grubu) ve 'littermate' sham grubunda NeuN (kırmızı) ve NLRP2 (yeşil) ile ikili işaretleme yapılmıştır. Hoechst (mavi) çekirdek işaretleme için kullanılmıştır. Naif (üst sıra) ve kontrol kesitinde (orta sıra), NLRP2 ve NeuN işaretlemede hücrelerin tama yakın kolokelize olduğu saptanmıştır. Tek KYD sonrası alınan (alt sıra) kesitlerde bu işaretlemenin belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir (Ok başı; NLRP2 ile çakışma gösteren hücreleri göstermekte, ince ok; ise çakışma olmayan hücreleri göstermektedir).



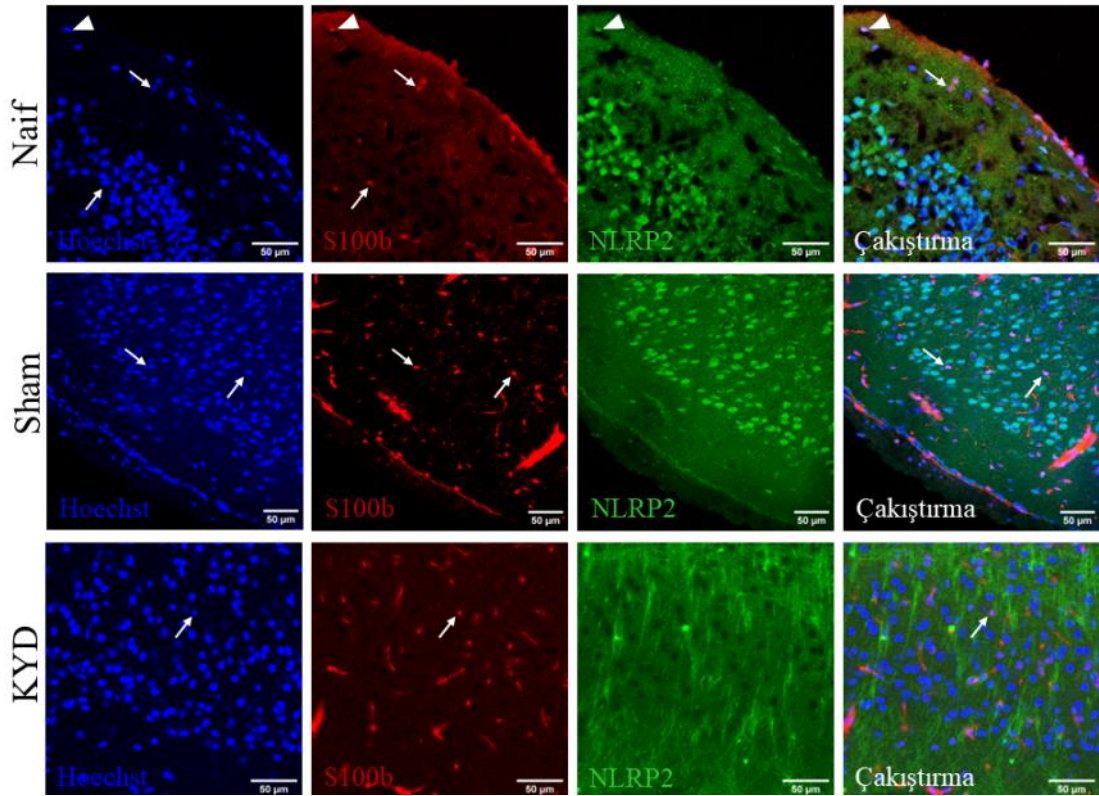
Şekil 4.4 NLRP2 immünoaktivitesinin s100 β (+) hücrelerde KYD'den sonraki 5. saatte gösterilmesi.

Thy1-ChR2-YFP fare beyinlerinde (naif ve KYD grubu) ve 'littermate' sham grubunda S100 β (kırmızı) ve NLRP2 (yeşil) ile ikili işaretleme yapılmıştır. Hoechst (mavi) çekirdek işaretlemesi için kullanılmıştır. Naif (üst sıra) ve kontrol (orta sıra) beyin görüntüleri hücresel NLRP2 işaretlenmesini göstermiş olup tek KYD sonrası alınan (alt sıra) kesitlerde bu işaretlemenin belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. S100b pozitif astrositler ile NLRP2 örtüşmesi çok azdır (Ok başı; NLRP2 ile çakışma gösteren hücreleri göstermekte, ince ok; ise çakışma olmayan hücreleri göstermektedir).



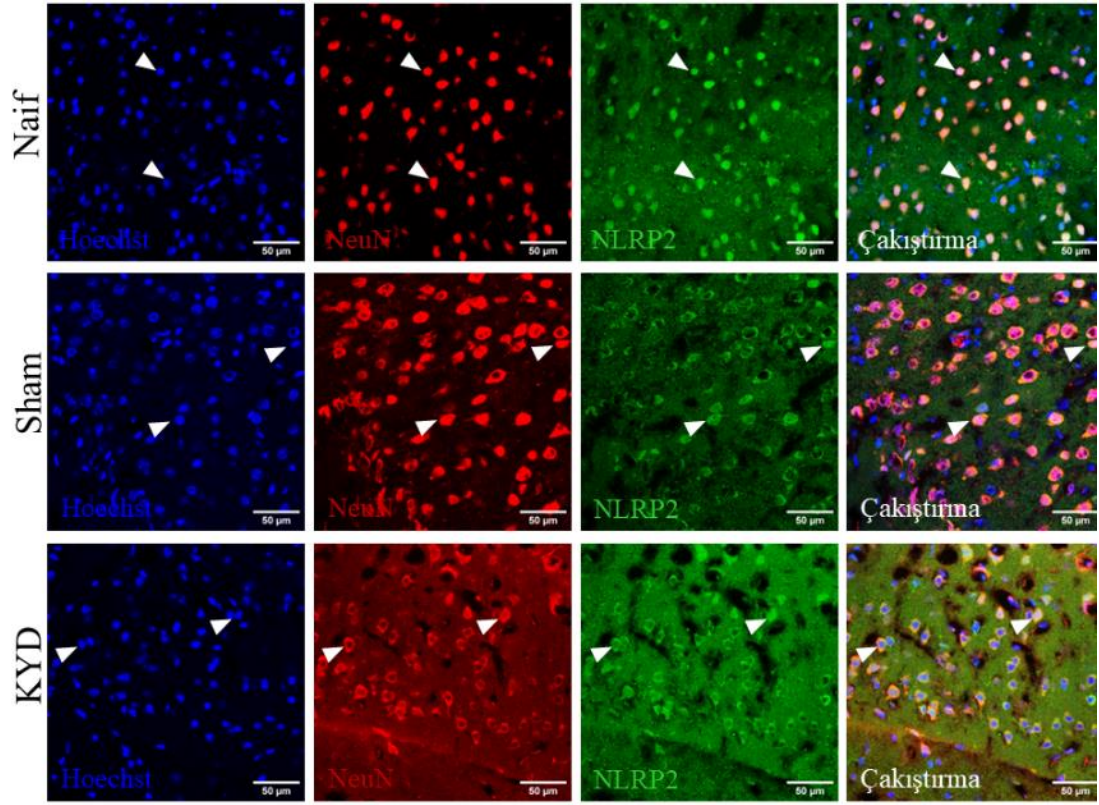
Şekil 4.5 NLRP2 immünoaktivitesinin NeuN (+) hücrelerde KYD'den sonraki 24. saatte gösterilmesi.

Thy1-ChR2-YFP fare beyinlerinde (naif ve KYD grubu) ve 'littermate' sham NeuN (kırmızı) ve NLRP2 (yeşil) ile ikili işaretleme yapılmıştır. Hoechst (mavi) çekirdek işaretlemesi için kullanılmıştır. Naif (üst sıra) ve kontrol (orta sıra) beyin görüntüleri hücreler NLRP2 işaretlenmesini göstermiş olup, tek KYD sonrası alınan (alt sıra) kesitlerde bu işaretlemenin belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir (Ok başı; NLRP2 ile çakışma gösteren hücreleri göstermekte, ince ok; ise çakışma olmayan hücreleri göstermektedir).



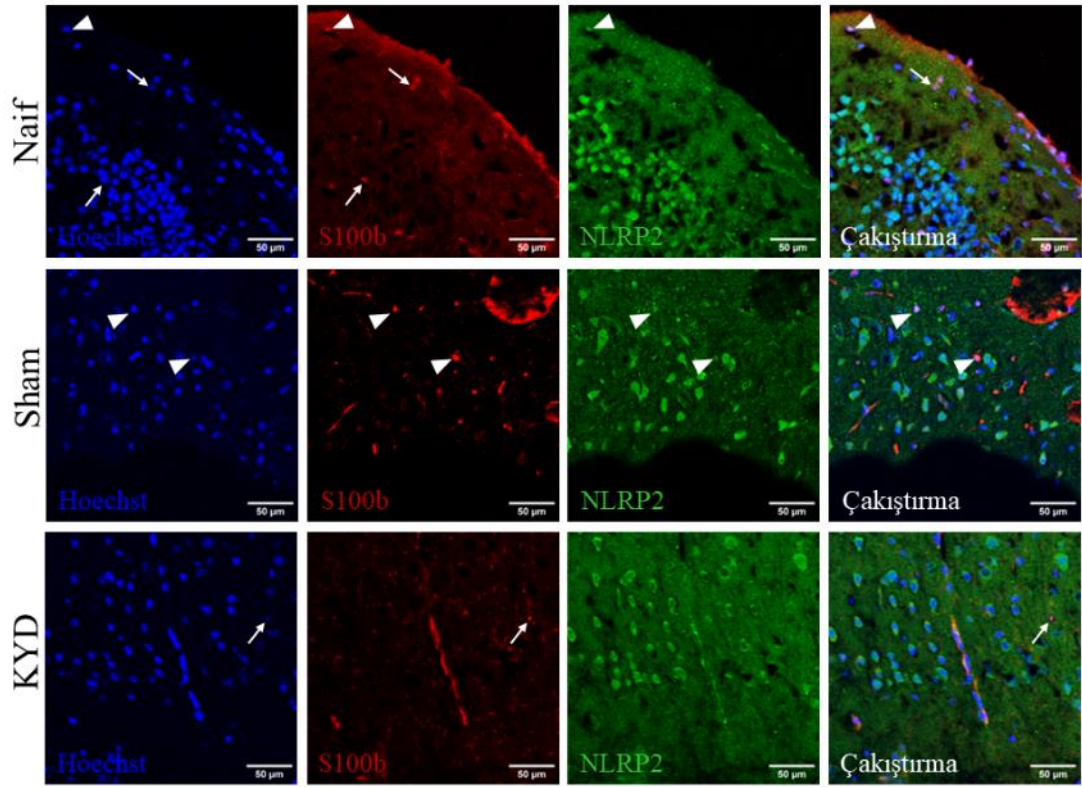
Şekil 4.6 NLRP2 immünoreaktivitesinin s100 β (+) hücrelerde KYD'den sonraki 24. saatte gösterilmesi.

Thy1-ChR2-YFP fare beyinlerinde (naif ve KYD grubu) ve 'littermate' sham S100 β (kırmızı) ve NLRP2 (yeşil) ile ikili işaretleme yapılmıştır. Hoechst (mavi) çekirdek işaretlemesi için kullanılmıştır. Naif (üst sıra) ve kontrol (orta sıra) beyin görüntüleri hücresel NLRP2 işaretlenmesini göstermiş olup, S100 β pozitif hücrelerde NLRP2 kolokalizasyonunun son derece az olduğu, tek KYD sonrası alınan (alt sıra) kesitlerde ise NLRP2 işaretlemesinin belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir (Ok başı; NLRP2 ile çakışma gösteren hücreleri göstermekte, ince ok; ise çakışma olmayan hücreleri göstermektedir).



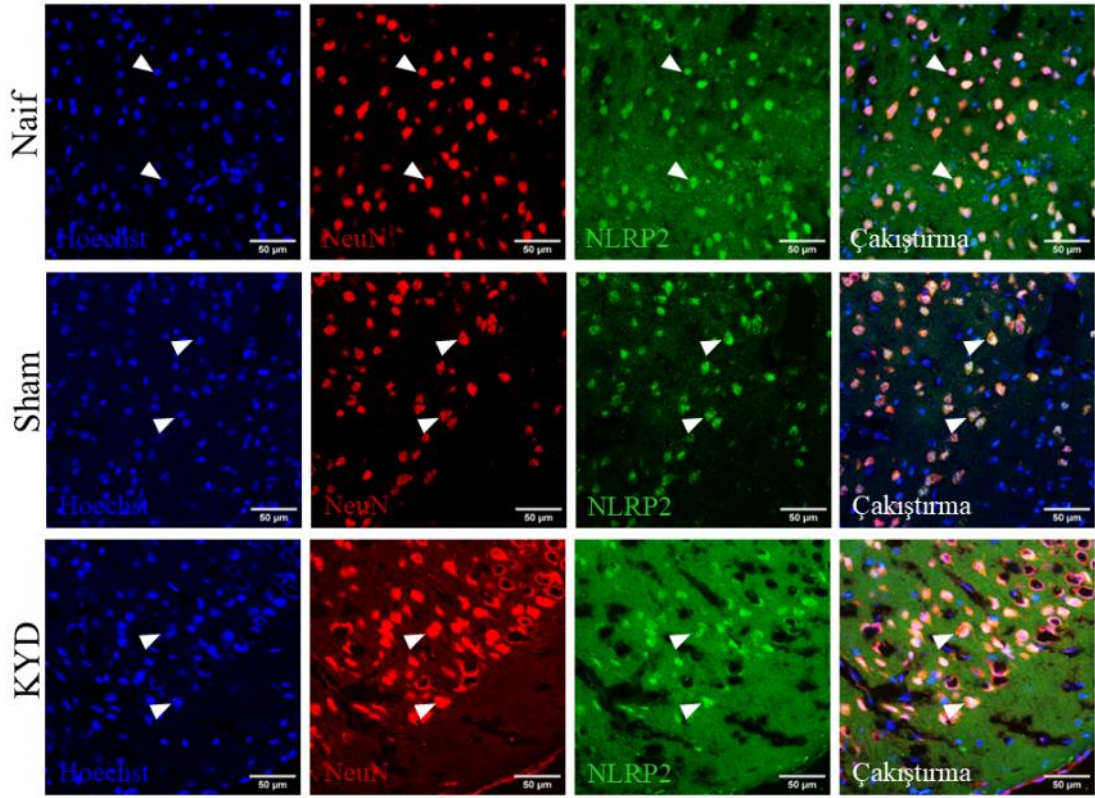
Şekil 4.7 NLRP2 immünoaktivitesinin NeuN (+) hücrelerde KYD'den sonraki 48. saatte gösterilmesi.

Thy1-ChR2-YFP fare beyinlerinde (naif ve KYD grubu) ve 'littermate' sham NeuN (kırmızı) ve NLRP2 (yeşil) ile ikili işaretleme yapılmıştır. Hoechst (mavi) çekirdek işaretlemesi için kullanılmıştır. Tek KYD sonrası alınan (alt sıra) kesitlerde bu işaretlemenin diğer zaman noktalarına göre artış göstererek naif (üst sıra) ve kontrol (orta sıra) örneklerle benzediği gözlenmiştir. Yine NLRP2 immünoaktivitesinin NeuN pozitif hücrelerle büyük oranda kolokalize olduğu saptanmıştır (Ok başı; NLRP2 ile çakışma gösteren hücreleri göstermekte, ince ok; ise çakışma olmayan hücreleri göstermektedir).



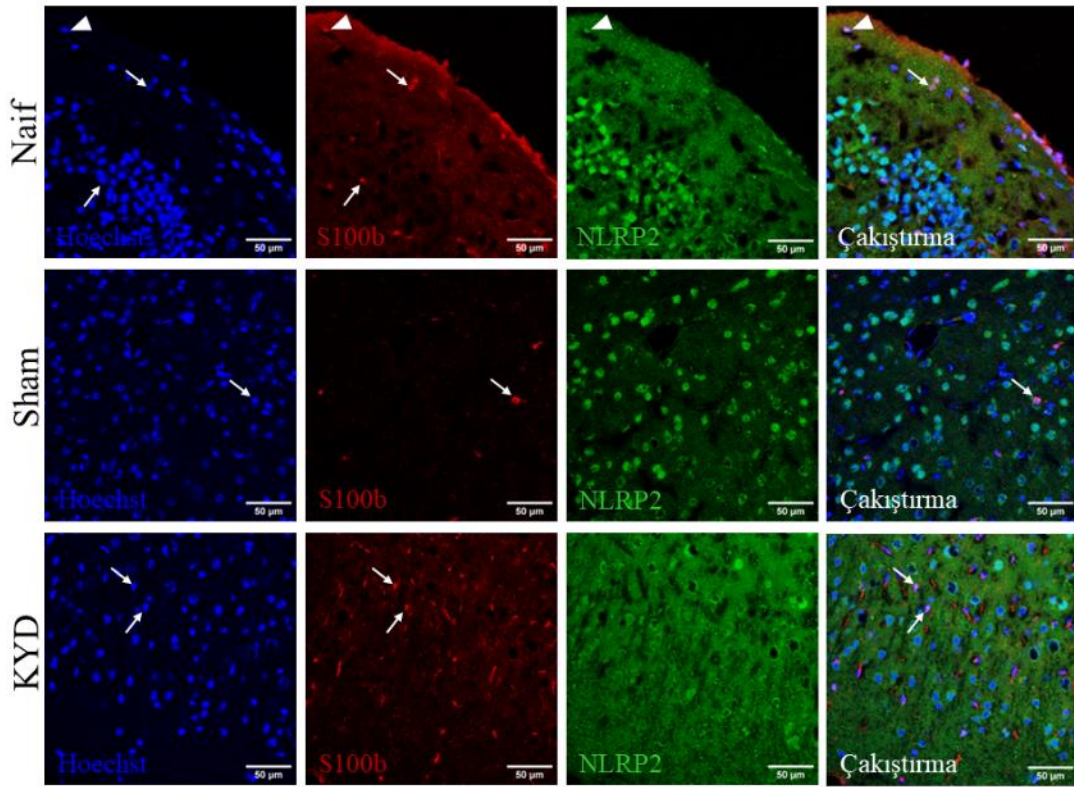
Şekil 4.8 NLRP2 immünoreaktivitesinin s100β (+) hücrelerde KYD'den sonraki 48. saatte gösterilmesi

Thy1-ChR2-YFP fare beyinlerinde (naif ve KYD grubu) ve 'littermate' sham S100β (kırmızı) ve NLRP2 (yeşil) ile ikili işaretleme yapılmıştır. Hoechst (mavi) çekirdek işaretlemesi için kullanılmıştır. Tek KYD sonrası alınan (alt sıra) kesitlerde bu işaretlemenin diğer zaman noktalarına göre artış göstererek naif (üst sıra) ve kontrol (orta sıra) örneklerine benzediği gözlenmiştir. S100β pozitif astrositler ile NLRP2 örtüşmesi çok azdır (Ok başı; NLRP2 ile çakışma gösteren hücreleri göstermekte, ince ok; ise çakışma olmayan hücreleri göstermektedir).



Şekil 4.9 NLRP2 immünoaktivitesinin NeuN (+) hücrelerde KYD'den sonraki 72. saatte gösterilmesi.

Thy1-ChR2-YFP fare beyinlerinde (naif ve KYD grubu) ve 'littermate' sham NeuN (kırmızı) ve NLRP2 (yeşil) ile ikili işaretleme yapılmıştır. Hoechst (mavi) çekirdek işaretlemesi için kullanılmıştır. Tek KYD sonrası alınan (alt sıra) kesitlerde bu işaretlemenin diğer zaman noktalarına göre artış göstererek naif (üst sıra) ve kontrol (orta sıra) örneklerine benzediği gözlenmiştir. NLRP2 immünoaktivitesinin NeuN pozitif hücrelerle büyük oranda kolokalize olduğu saptanmıştır (Ok başı; NLRP2 ile çakışma gösteren hücreleri göstermekte, ince ok; ise çakışma olmayan hücreleri göstermektedir).



Şekil 4.10 NLRP2 immünoaktivitesinin s100β (+) hücrelerde KYD'den sonraki 72. saatte gösterilmesi.

Thy1-ChR2-YFP fare beyinlerinde (naif ve KYD grubu) ve 'littermate' sham S100β (kırmızı) ve NLRP2 (yeşil) ile ikili işaretleme yapılmıştır. Hoechst (mavi) çekirdek işaretlemesi için kullanılmıştır. Tek KYD sonrası alınan (alt sıra) kesitlerde bu işaretlemenin diğer zaman noktalarına göre artış göstererek naif (üst sıra) ve kontrol (orta sıra) örneklerine benzediği gözlenmiştir. S100β pozitif astrositler ile NLRP2 örtüşmesi çok azdır (Ok başı; NLRP2 ile çakışma gösteren hücreleri göstermekte, ince ok; ise çakışma olmayanları göstermektedir).

4.2 NLRP2 (+) hücrelerin zaman noktalarına göre oranlarının belirlenmesi

Naif hayvanlardan elde edilen kesitlerinde NeuN (+) hücrelerdeki NLRP2 pozitiflik oranı $72,1 \pm 1,5$ iken, bu oran KYD sonrasında incelenen kesitlerde 48. saatte $69,7 \pm 11,6$ 72. saatte $76,4 \pm 4,7$ olarak saptanmıştır. Naif ile KYD sonrası 48 ve 72. Saat kesitlerinde nöronal hücrelerde NLRP2 ifadesinde anlamlı farklılık saptanmamıştır.

NLRP2 (+) hücreleri kantitatif olarak değerlendirebilmek amacı ile elde edilen görüntülerden NLRP2 (+), NeuN (+) ve Hoechst (+) hücreler sayılmıştır. Her kesitte eşit sayıda hücre çekirdeği olmadığından kesitlerde elde edilen sayımlar oransal olarak değerlendirilmiştir. Bunun için NLRP2 (+) / NeuN (+) ve NLRP2 (+) / Hoechst (+) hücre oranları hesaplanmıştır ve istatistiksel değerlendirmeler bu oranlar üzerinden yapılmıştır. Hücre oranlarının gruplara göre dağılımı aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir (Tablo 4. 1 ve Tablo 4. 2). NLRP2 (+) / NeuN (+) ve NLRP2 (+) / Hoechst (+) hücre oranları aynı zaman noktasındaki KYD ve sham grupları arasında karşılaştırıldığında 15. dk, 5. saatte ve 24. saatte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p<0,05$). 48 ve 72. saatte bu fark kaybolmakta, KYD grubu ile kontrol grubu arasında NLRP2 pozitif hücre oranları benzerlik göstermektedir (Tablo 4.1, Tablo 4.2).

Tablo 4. 1 Sham ve KYD gruplarında NLRP2 (+) / NeuN (+) oranı.

	Sham (ort$\pm$SS)	KYD (ort$\pm$SS)	p değeri
Naif (opto+)	72,1 $\pm$ 1,5		
Naif (opto-)	75,7 $\pm$ 15,4		
15 dk	81,1 $\pm$ 6,3	1,8 $\pm$ 1,0	0,011*
5 saat	55,2 $\pm$ 18,7	1,8 $\pm$ 0,6	0,05*
24 saat	86,2 $\pm$ 3,2	4,9 $\pm$ 2,3	0,044*
48 saat	73,8 $\pm$ 15,7	69,7 $\pm$ 11,6	0,631
72 saat	75,1 $\pm$ 11,4	76,4 $\pm$ 4,7	0,806

NLRP2 (+) / NeuN (+) hücre oranı değerleri ortalama $\pm$ standart sapma olarak belirtilmiştir. Nöronlarda NLRP2 pozitiflik oranı aynı zaman noktasındaki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KYD'den sonraki 15. dakika, 5. ve 24. saat gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmıştır. İkili grup karşılaştırmalarına ait p değerleri son sütunda verilmiştir. * istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

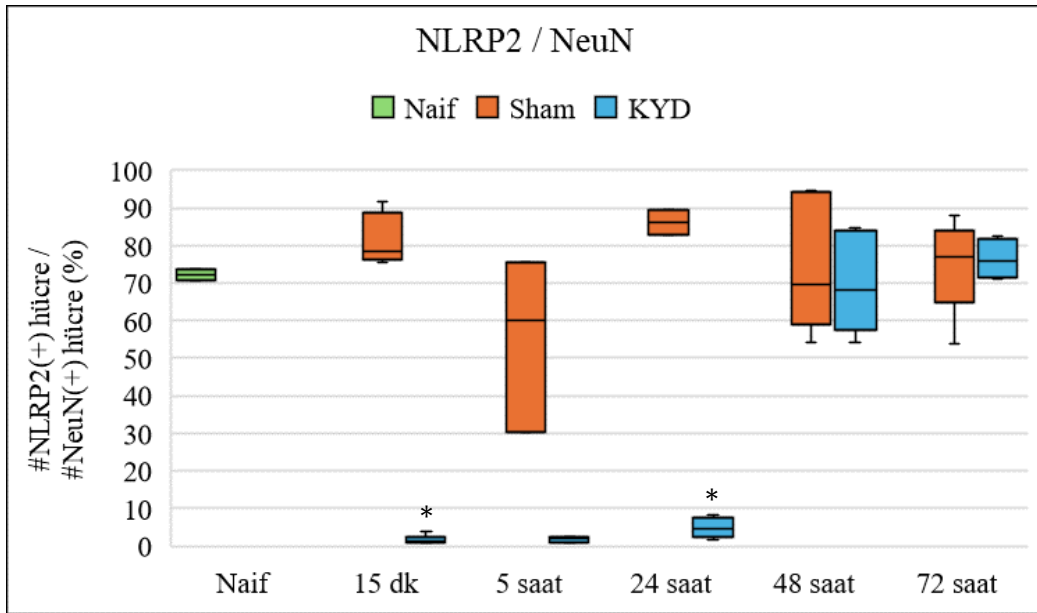
Tablo 4. 2 Sham ve KYD gruplarında NLRP2 (+) / Hoechst (+) hücre oranı

	Sham (ort±SS)	KYD (ort±SS)	p değeri
Naif (opto+)	55,6±1,0		
Naif (opto-)	43,9±8,4		
15 dk	62,2±2,9	1,4±0,8	0,011*
5 saat	38,2±15,8	1,4±4,0	0,05*
24 saat	68,3±4,9	3,9±1,9	0,046*
48 saat	51,2±8,2	49,7±23,9	0,631
72 saat	53,6±6,4	50,2±4,3	0,462

NLRP2 (+) / Hoechst (+) hücre oranı değerleri ortalama±standart sapma olarak belirtilmiştir. Tüm hücrelerde NLRP2 pozitiflik oranı aynı zaman noktasındaki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KYD'den sonraki 15. dakika, 5. ve 24. Saat gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmıştır. İkili grup karşılaştırmalarına ait p değerleri son sütunda verilmiştir. * istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

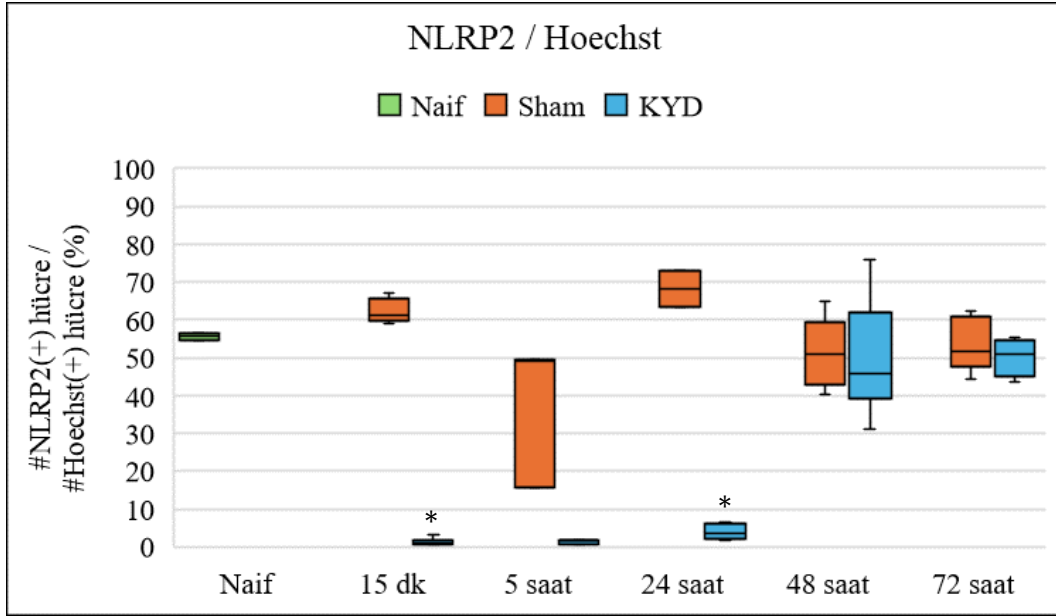
Hücre oranları tüm gruplar arasında karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Kruskal-Wallis $p=0,001$). Naif hayvanlarla, 15. dakika ($p=0,046$), ve 24. saat ($p=0,044$) kesitlerinde ile NLRP2 (+) / NeuN (+) hücre oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde NLRP2 ifadenmesinde azalma var iken, 5. saat ($p=0,083$) örnekleri ile arasında ise anlamlıya yakın olacak derecede fark saptanmıştır. Naif grup ile 48 ve 72. saat örnekleri arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla $p=0,505$ ve $p=0,355$)(Şekil 4.11).

Naif hayvanlarla 15. dk ($p=0,044$), ve 24. saat ($p=0,046$) kesitlerinde tüm hücre çekirdeklerinin işaretlendiği Hoechst boyamalarında, NLRP2 (+) / Hoechst (+) hücre oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde NLRP2 ifadenmesinde azalma var iken , 5. saat ($p=0,083$) örnekleri ile arasında ise anlamlıya yakın olacak derecede fark saptanmıştır. Naif beyinlerin KYD sonrası 48 ve 72. saat örnekleriyle aralarında anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla $p=0,505$ ve $p=0,165$) (Şekil 4.12).



Şekil 4.11 Zaman noktalarına göre NLRP2 (+) / NeuN (+) hücre oranları.

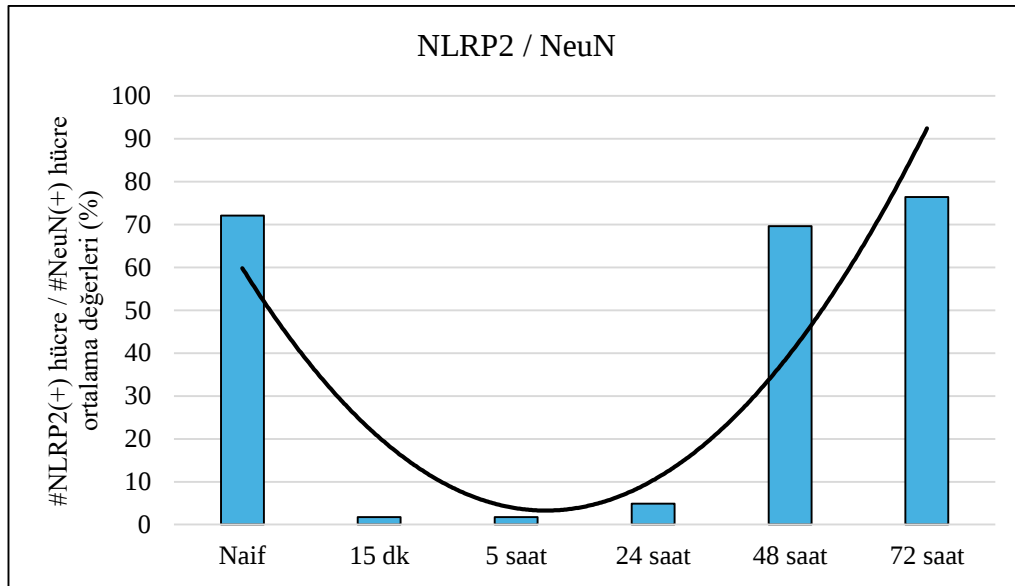
Hücre oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Gruplar karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Naif grup ile yapılan ikili grup karşılaştırmalarında bu farkın 15. dk ve 24. saatteki hücresel ekspresyon farklılığından kaynaklandığı istatistiksel olarak gösterilmiştir ($p < 0,05$). 5. saatteki NLRP2 ekspresyonundaki azalmanın ise anlamlılığa yakın olduğu görülmüştür. KYD'den 48 ve 72 saat sonra NLRP2 immünoaktivitesi naif gruba benzemiştir.



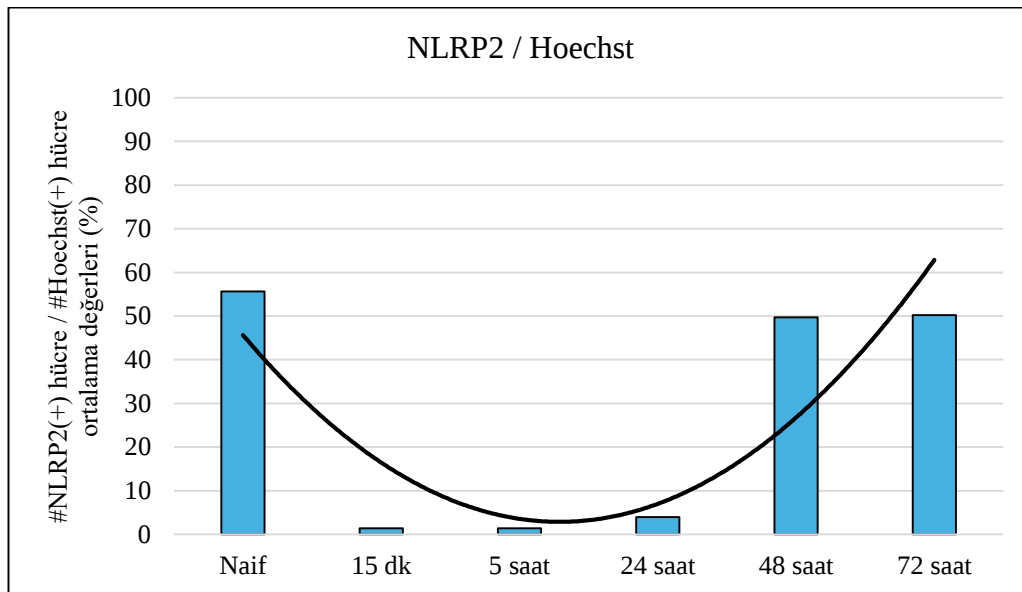
Şekil 4.12 Zaman noktalarına göre NLRP2 (+) / Hoechst (+) hücre oranları.

Hücre oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Gruplar karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Naif grup ile yapılan ikili grup karşıştırmalarında bu farkın 15. dk ve 24. saatteki hücresel ekspresyon farklılığından kaynaklandığı istatistiksel olarak gösterilmiştir ($p < 0,05$). 5. saatteki NLRP2 ekspresyonundaki azalmanın ise anlamlılığa yakın olduğu görülmüştür. KYD'den 48 ve 72 saat sonra NLRP2 immünoreaktivitesi naif gruba benzemiştir.

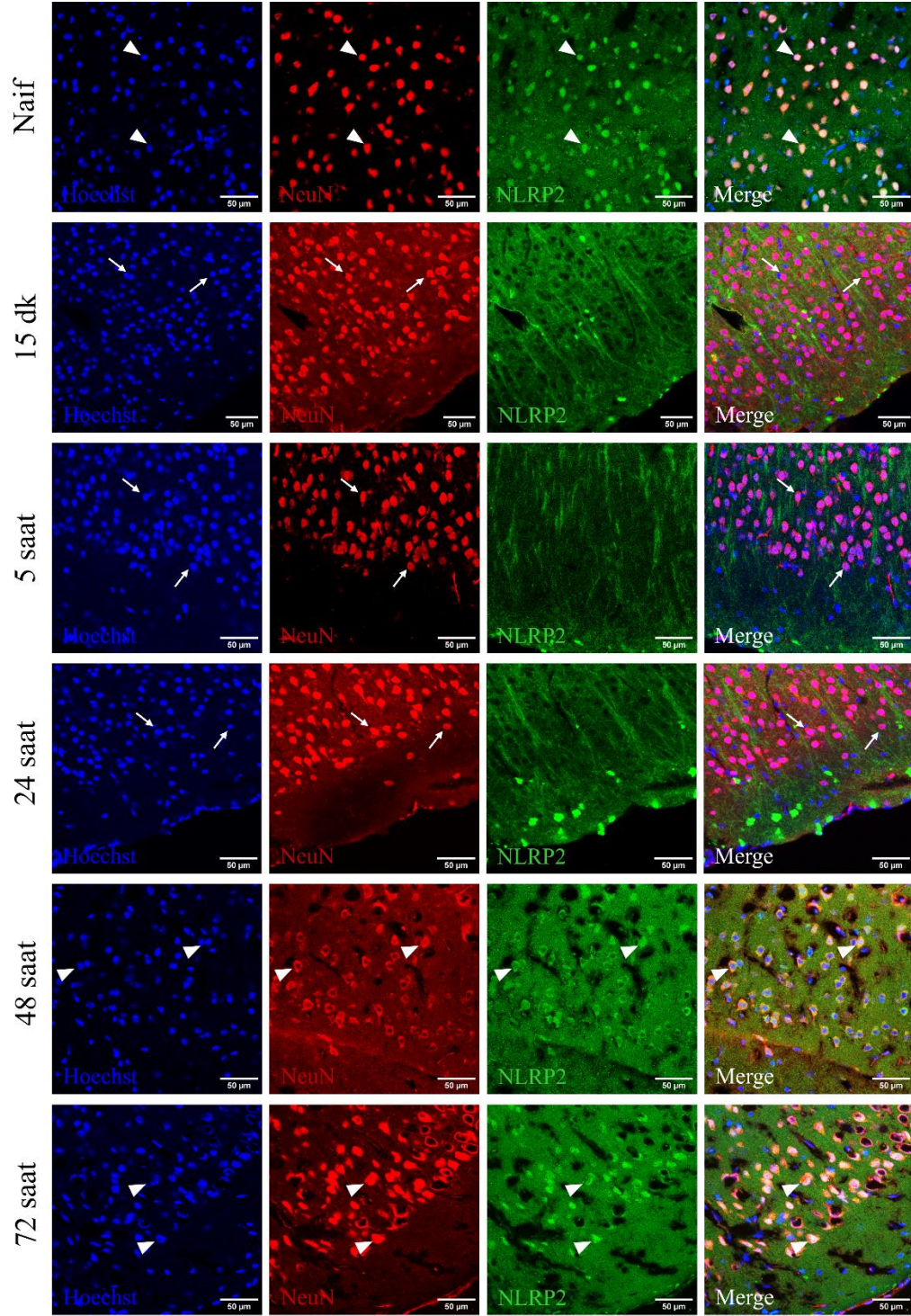
NLRP2 (+) / NeuN (+) ve NLRP2 (+) / Hoechst (+) hücre ortalamalarının trend analizi yapıldığında 15. dakikadan itibaren hücre sayılarında düşüş olduğu ve 24. saatten sonra yükselme gösterdiği izlenmiştir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).



Şekil 4.13 Zamana göre NLRP2 (+) / NeuN (+) hücre sayılarının değişim trendi (Jonckheere-Terpstra Test) ($p < 0.00001$)



Şekil 4.14 Zamana göre NLRP2 (+) / Hoechst (+) hücre sayılarının değişim trendi (Jonckheere-Terpstra Test) ($p < 0.00001$)



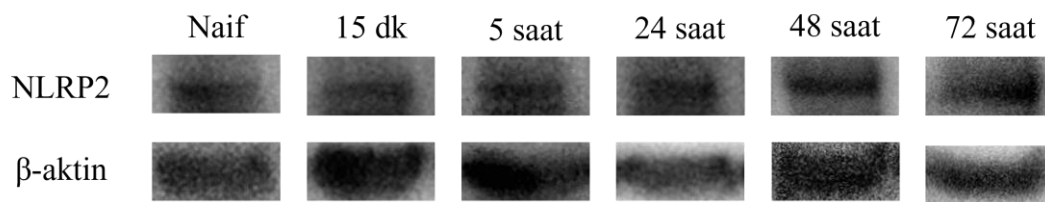
Şekil 4.15 NLRP2 immünoaktivitesinin s100 β (+) hücrelerde KYD sonrası zamansal değişimi.

NeuN (kırmızı) ve NLRP2 (yeşil) ile ikili işaretleme yapılmıştır. Hoechst (mavi) çekirdek işaretlemesi için kullanılmıştır. Naif beyinde işaretlenen NLRP2 inflamazomu KYD sonrası 15. dk, 5. saat ve 24. saatte yok denecek kadar azalmakta, KYD'den 48 ve 72 saat sonra ise tekrar ortaya çıkmaktadır. NLRP2

immunoreaktivitesinin nöron belirteci olan NeuN ile kolokalize olduğu da izlenmektedir.

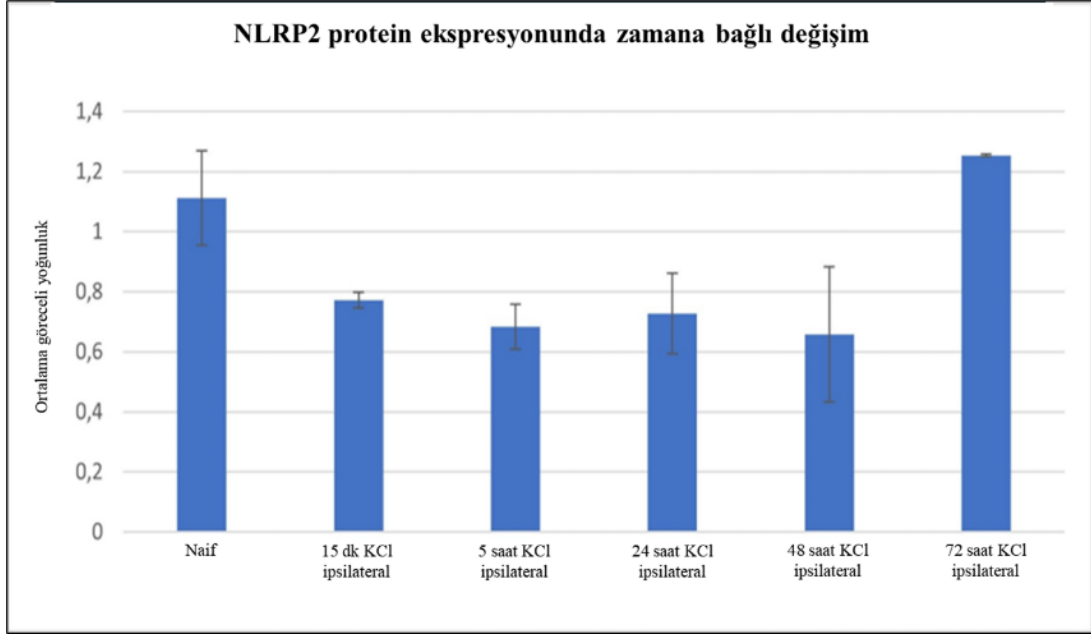
4.3 Western Blotlama ile elde edilen protein analizleri

Western Blotlama için C57/BL6 farelerde KCl ile KYD tetiklenmiş ve yine 5 farklı zaman noktasında KYD ile ipsilateral korteks dokuları elde edilmiştir. NLRP2 protein işaretlenmesi için yapılan Western blotlama sonrası elde edilen jel görüntülerinden birer örnek Şekil 4.16'de yer almaktadır.



Şekil 4.16 Western Blotlama ile NLRP2 ve β-aktin için elde edilen bant örnekleri.

Western Blotlama ile yapılan ölçümlerde NLRP2 bant görüntüleri internal kontrol olan β-aktin bantlarına oranlanmıştır. Gruplar arasında NLRP2 düzeyi açısından anlamlı fark saptanmamakla beraber, naif hayvanlarda diğer gruplara göre ortalama göreceli yoğunluk düzeylerinde hafif bir yükseklik gözlenmiştir ve 72. saatte yapılan ölçümlerde de yine istatistiksel olarak fark olmamakla birlikte yaklaşık olarak naif hayvanlarda ölçülen seviyeye geldiği saptanmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 Western Blotlama ile deney gruplarında NLRP2 düzeylerinin karşılaştırılması.

KYD ile ipsilateral korteksten elde edilen örneklerden yapılan ölçümlerde naif hayvanlarda saptanan ortalama göreceli yoğunluk 15 dk, 5 saat, 24 saat ve 48 saatte daha düşük iken, 72 saatte naif grubuna benzerdir. Ancak ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

5. TARTIŞMA

Migren toplumda yaygın olarak görülen bir baş ağrısı sendromudur. Baş ağrısı dışında beraberinde birçok nörolojik, gastrointestinal ve emosyonel değişiklikler de eşlik eder. Ataklar sıklıkla puberte sonrası, genç erişkinlik döneminde başlangıç gösterir (1). Şiddetli ve uzun süreli ataklar nedeni ile günlük aktiviteleri etkileyebilmekte ve dizabilite nedeni olabilmektedir. Özellikle genç erişkin çağı hastalığı olduğundan migrenin ekonomik ve sosyal yükü son derece önemlidir. Migren atakları genetik, çevresel, metabolik, hormonal faktörler ve kullanılan ilaçlarla tetiklenebilmektedir (21). Ek olarak inme, miyokard enfarktüsü, epilepsi, depresyon ve anksiyete gibi birçok ko-morbid hastalık ile ilişkilidir (1). Bu nedenlerle migren hastalığının patofizyolojisini anlamaya ve yeni tedavi hedefleri geliştirmeye yönelik yeni çalışmaların yapılması elzemdir.

Migren patofizyolojisi tam olarak ortaya konulamamakla birlikte trigeminovasküler sistem aktivasyonu ve bunun tetiklediği inflamasyonun önemli rol oynadığı düşünülmektedir (1). TCC, TG ve buradan talamus, hipotalamus, beyinsapı ve kortekse projekte olan sinir lifleri migren atağı sırasında ortaya çıkan semptomlarla yakın ilişki göstermektedir (1).

KYD ise migren aurasının elektrofizyolojik bir karşılığı olarak kabul edilmekte ve baş ağrısının başlamasında parankimal nöroinflamatuvar sinyaller üzerinden rolü olduğu düşünülmektedir. KYD sırasında ilgili beyin alanındaki hücrelerin tamamına yakınında membran depolarizasyonu olmaktadır. Bu süreç hücreden masif K^+ ile, glutamat başta olmak üzere nörotransmitter ve nöromodülatörlerin çıkışı, buna karşılık Na^+ , Ca^{+2} , H_2O girişi ile ilişkilendirilmiştir (1). KYD oluşumunu takiben nöronal panneksin 1 megakanallarının açıldığı ve bunun sonucunda kaspaz-1 aktivasyonunun ve IL-1 β ve HMGB1 salıverilmesinin gerçekleştiği gösterilmiştir (2, 14, 33). Bu nöronal reaksiyon çevredeki astrositlerde NF- κB 'nin çekirdeğe translokasyonuna ve COX ve iNOS gibi inflamatuvar genlerin transkripsiyonuna ve glia limitansı oluşturan astrositik ayaklardan AA ve potasyumun perivasküler alana çıkışına neden olmakta ve bu kaskadın meningeal damarların çevresindeki trigeminal sinirleri aktive edebileceği düşünülmektedir (5). Deneysel modellerin yanı sıra migren hastalarında yapılan PET-

MRG çalışmalarında dada beyinde yaygın olarak artmış inflamatuvar aktivitenin varlığı gösterilmiştir (34). Bu durum bel ağrısı olan hastalarda saptanmamıştır.

Nöroinflamasyonun, migren, ağrı, nörodejeneratif bozukluklar ve serebral iskemi gibi birçok nörolojik hastalığın patogeneğinde altta yatan anahtar bir mekanizma olduğu öne sürülmektedir. NOD benzeri reseptör (NLR) ailesi doğal bağışıklık sisteminin bir parçasıdır, çok sayıda üyesi farklı patofizyolojik süreçlerde tanımlanmış olsa da, NLRP2 de dahil olmak üzere hastalıklardaki rolleri kesin olarak ortaya konulmamıştır (40). Genellikle NLR ailesi uyarıldığında inflamazom oluşturarak proinflamatuvar yanıtı neden olmaktadır. Özellikle NLRP2 diğerleri arasında en az çalışılan inflamazom üyesidir.

Bu çalışmanın amacı, tek bir KYD'yi takiben ortaya çıkan nöro-parainflamasyonda NLRP2'nin ekspresyon paternini ve değişikliklerini aydınlatmaktır. Bizim çalışmamızda bulgularımız, KYD'den sonra immünoreaktivitede fark edilebilir bir değişimle birlikte, nöronlarda NLRP2'nin bazal düzeyde ekspresyonunu göstermiştir. Daha az miktarda nöronal ekspresyon ve yaygın astrositik özellikleri öne süren önceki araştırmaların aksine, sonuçlarımızda özellikle naif ve kontrol (sham) gruplarında NeuN (+) hücrelerde belirgin NLRP2 ekspresyonu gösterilmiştir (15, 16, 50, 52, 54). Özellikle, KYD'yi takiben erken dönemde (15 dk, 5 ve 24 st) NLRP2 immünoreaktivitesinde belirgin bir azalma saptanmıştır.

Minkiewicz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda, NLRP2'nin astrositik ekspresyonunun ve bunun ATP ile indüklenen panneksin ve P2X7 reseptör uyarımı ile inflamatuvar ve proinflamatuvar kaskadları aktive eden ilişkisini gösterilmiştir. Buna ek olarak Zhang, Sun, Cheon ve arkadaşları farklı modellerde NLRP2'nin astrositik ekspresyon özelliklerini destekler sonuçlar bulmuşlardır (15, 16, 50, 52, 54). Farklı hastalık modellerinde yapılan bu çalışmalarda Sun ve arkadaşları deneysel serebral iskemi modelinde NLRP2'nin rolünü incelemiştir (16). İn vivo bir modelde santral sinir sisteminde NLRP2 ekspresyonu olup olmadığı ve hangi bölgelerde eksprese edildiğini inceleyen bu çalışmada, bazalde NLRP2'nin total beyin örneklerinde eksprese olduğunu, korteks, hipokampus ve striatum karşılaştırıldığında hipokampüste daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır (16). Hücre kültüründe yapılan deneylerde ise astrositlerde en fazla olmak üzere nöronlarda (PC12 hücre) az miktarda eksprese

edildiği, mikrogliyalarda (BV2 hücreler) ise hemen hiç eksprese edilmediği gözlemlenmiştir (16). Bu bulgular bizi, deneysel migren modellerinde gözlenen proinflamatuvar özellikler ve uyarım mekanizmalarındaki benzerliklerin varlığını göz önüne almamıza ve NLRP2 ile KYD arasındaki potansiyel bağlantıyı araştırmaya yöneltmiştir.

Bizim çalışmamızın sonuçları literatürden farklılık göstermiş, diğer çalışmalarda ağırlıklı olarak gözlemlenen astrositik özelliklerin aksine, kortikal ve subkortikal beyin bölgelerinde NLRP2'nin belirgin bir nöronal ekspresyon paterni olduğunu ortaya koymuştur. Buna benzer olarak Matsuka ve arkadaşları da, inflamatuvar ağrı aşırı duyarlılığı modelinde yaptıkları çalışmada dorsal kök gangliyonlarında nöronal NLRP2 ekspresyonunu tanımlamışlardır (17). Ancak bizim çalışmamız, Matsuka ve arkadaşlarının seramid kaynaklı doku inflamasyonunu takiben artan reaktiviteye ilişkin gözlemlerinin aksine, KYD sonrasında NLRP2 immünoreaktivitesinde bir azalma olduğunu ortaya koymuştur (17). Aynı şekilde çalışmamızda farklı zaman noktalarında elde ettiğimiz örneklerde de (5. ve 24. saatte) immünoreaktivitede azalma devam etmiştir. Ancak Matsuka ve arkadaşlarının çalışmasında NLRP2 seramid indüksiyonundan iki gün sonra tespit edilmiştir (17). Çalışmamızda da bu bulgulara dayanarak zaman noktalarının NLRP2 ekspresyonunu KYD indüksiyonundan sonra erken bir zamandaki değişikliği göstermesinin aradaki farka neden olabileceği düşünülerek zaman noktaları uzatılmıştır ve 48. saatten itibaren NLRP2 ifadenmesinde tekrar artış olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar bize NLRP2'nin KYD etkisi ile hücreden salıverilmiş olabileceğini düşündürtebilir. İmmünoflöresan işaretleme ile saptadığımız bu fark Western blotlama ile yapılan protein analizinde de bir trend olarak saptanmış ancak istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamıştır. Western jel görüntülerinde yapılan analizlerde naif grupta rölatif olarak diğer gruplara göre NLRP2 proteinini yüksek olarak gözlenmiş ve 72 saatte naif ile benzer düzeyler saptanmıştır. Gruplarda denek sayısının 3 olması, WB analizinde tüm korteksin kullanılması, hücre ayırımı yapılmaması ve doku içine salıverilen NLRP2'nin toplam NLRP2 olarak ölçülmesi nedeni ile bu farklılıkları gösterememiş olabileceğimizi düşünmekteyiz.

Bir başka spekülâtif yaklaşım ise şu şekilde açıklanabilir: İnflamazom kompleks elemanlarının aynı hücrede bulunduğu ve uyaran veya hücre tipine ve ortamın durumuna göre (homeostatik denge) bir araya gelerek hücre içinde farklı inflamazom kompleksleri oluşturduğu bilinmektedir. KYD sonrasında nöronlarda NLRP3 inflamazom aktivasyonu gösterilmiştir. Bu çalışmamızda ise NLRP2'nin KYD sonrası nöronlarda erken dönemde azaldığı saptanmıştır. Bu sonuç inflamazom kompleks elemanlarının KYD sonrasında NLRP3 inflamazom oluşumu yönünde kullanılması ve bu nedenle NLRP2'nin naif beyin düzeyinden yani bazalde nöronda bulunduğu seviyeden daha az ifadelenmesi şeklinde yorumlanabilir. Bu durumu ortaya koymak üzere KYD sonrası elde edilen beyin kesitlerinde NLRP2 ve NLRP3'ün ikili işaretlenmesi ile inflamazom kompleks elemanlarının bazılarının (PYD, LRR gibi) üçlü işaretleme yapılarak yüksek çözünürlüklü ('airy scan' mikroskop, elektron mikroskop) görüntüleme teknikleri ile incelenmesi yeni araştırmaların konusu olabilir.

Bu çalışma bildiğimiz kadarıyla literatürde migren aurası korelatı olarak kabul edilen KYD sonrası ortaya çıkan parankimal nöroinflamasyonda NLRP2 inflamazomunun zamansal değişimini inceleyen ilk çalışmadır. Çalışmamızda invaziv olmayan bir yöntem olan optogenetik uyarmı yöntemi ile tetiklenen tek KYD sonrası literatürün aksine NLRP2 inflamazom immünoreaktivitesinin nöronlarda olduğu, astrositlerde neredeyse hiç olmadığı saptanmıştır. Bu immünoreaktivite zamansal olarak değişim göstermektedir. KYD sonrası erken dönemde azalırken, 48 ve 72. saatte naif beyin seviyesine yaklaşmıştır. Bir başka KYD tetikleme yöntemi ile (1 M KCl uygulaması) Western blotlama analizleri için deneyler yapılmış ve immünohistokimya ile benzer ancak istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir sonuç elde edilmiştir.

Kortikal yayılan depolarizasyon sonrası ortaya çıkan baş ağrısı davranışlarını ve nöroinflamasyonu inceleyen bir çalışmada FHM1 mutant farelerde optogenetik olarak KYD indüklendikten sonra baş ağrısı ile ilişkilendirilen yüz ifadeesi değişikliği ve HMGB1 ekspresyonuna bakılmıştır (55). Bu çalışmada yabancı farelerde 24. saatte başa ғrısı ile ilişkili davranış skorları normale dönerken FHM1 mutant farelerde ise 48. saatte normale dönmüştür. HMGB1 ekspresyonlarına bakıldığında hem yabancı hem mutant farelerde ipsilateral HMGB1 düzeyleri 48. saatte azalma göstermiştir (55).

Yine aynı çalışmada HMGB1 ekspresyonunun FHM1 mutant farelerde kontrlatelateral hemisferde de yükseldiğini göstermiştir ki bu mutant farelerde daha önceki çalışmalarda vurgulandığı üzere nöronal hipereksitabilite ile ilişkili olabilir (14, 55). Bu zamansal değişim bizim zamansal değişimimiz ile örtüşmektedir. Ortaya çıkan inflamatuvar yanıtın süresi uyarım yöntemi ya da transgenik farenin genetik özellikleri ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

NLRP2'nin immün yanıt üzerine etkileri kesin olarak bilinmemektedir. Uyarıcı ve hücre farklılıkları da yanıtları değiştirmektedir. NLRP2'nin inflamasyon üzerine etkilerinden bir diğeri ise NLRP3 aktivasyonunun negatif düzenleyicisi olduğu yönündedir (56). Bostancı ve ark. periodontal hastalıklarda yaptıkları çalışmalarında bazal hücrelerde NLRP2 düzeyi yüksek iken *P. gingivalis* ile uyarım sonrasında NLRP3 ve IL-1 β ve IL-18 düzeyleri artarken, ASC düzeyi değişmemiş, NLRP2 düzeylerinde ise düşüş saptamışlardır (56). Nöronal NLRP3'ün KYD sonrası aktive olduğunu gösteren çalışmalar ile bu verileri beraber değerlendirirsek, NLRP2 ekspresyonunda gözlemlediğimiz bu azalma, KYD modelinde de NLRP2'nin NLRP3'ün negatif düzenleyicisi olarak rol alabileceğini düşündürmektedir (6).

NLRP2'nin farmakolojik veya genetik manipülasyonu ile inflamasyondaki rolünü belirlemek mümkün olabilir. NLRP2'nin zamansal dinamiklerini ve manipülasyonlarını araştıran gelecekteki araştırmalar, KYD'nin tetiklediği inflamatuvar yanıtlardaki rolü konusunda değerli bilgiler sunabilir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları:

- Optogenetik uyarım yapılabilen transgenik hayvan üretimindeki problemler ve zamansal kısıtlılıklar nedeni ile planlanan sayıya ulaşılamamıştır.
- Bu çalışmada NLRP2 nin ifadenme özellikleri incelenmiştir. Ancak yolaktaki diğer inflamatuvar moleküller (IL-1 β , Nf- κ B gibi) üzerine etkisine yönelik incelemeler mevcut çalışmamızda yoktur. Bu yolak üzerindeki etkilerin ileriki çalışmalarda yapılması planlanmıştır.
- NLRP3 ifadenmesi ile NLRP2 ilişkisinin gösterilmesi için aynı hücrede

ikili incelemeler faydalı olacaktır.

- NLRP2'nin farklı dokularda yapılan çalışmalarda cinsiyete göre değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Bizim çalışmamızda gruplar belirlenirken hem erkek hem dişi fareler kullanılmıştır, ancak denek sayıları iki cinsiyet arasında karşılaştırma yapılabilecek sayıda değildir. Santral sinir sisteminde cinsiyetler arasında ifadenme farklılığı olup olmadığını göstermek ölçümleri değerlendirmede yol gösterici olabilir.
- Genetik ya da farmakolojik manipülasyon ile NLRP2'nin ifadenmesindeki değişikliğin KYD gelişim sürecine etkisi, incelenmesi gereken bir diğer konudur. Bu çalışmada intrakortikal siRNA enjeksiyonu ile NLRP2'yi baskılayarak KYD gelişimi üzerine etkisini incelemeyi planlamamıza rağmen deney süreçlerinde ortaya çıkan aksamalar ve süre kısıtlılığı nedeni ile deneylerin bu aşaması gerçekleştirilememiştir. Ancak sonraki çalışmalarda bu deneylerin yapılması planlanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada optogenetik uyarım ile oluşturulan tek KYD sonrasında NLRP2 immünoreaktivitesindeki değişiklik literatürde ilk kez incelenmiştir. Naif ve kontrol gruplarında bazal seviyede NeuN pozitif nöronal hücrelerde NLRP2 inflamazom ekspresyonu izlenmiştir.
- Literatürün aksine S100b pozitif astrositlerde belirgin bir ifadenme gözlenmemiştir.
- KYD uyarımını takiben erken dönemde (15 dk, 5 ve 24 st) NLRP2 immünoreaktivitesinin belirgin olarak azaldığı saptanmıştır.
- Tek KYD ile ortaya çıkan yanıt paterninin zamanlamasının belirlenmesine yönelik farklı zaman noktalarında ölçümler tekrarlanmış ve 48. ve 72. saatte immünoflüoresan işaretlemelerde NLRP2 ifadenmesinde artış olduğu ve naif beyindeki ifadenmeye benzediği gözlenmiştir.
- Bu durum NLRP2'nin KYD sonrası erken dönemde salıverilmiş olabileceğini düşündürmektedir.
- KYD sonrası nöronlarda NLRP3 inflamazom artışı ile ters olan bu çalışma sonucu NLRP2'nin NLRP3'ün negatif düzenleyicisi olabileceği yönünde bir sonuç olarak yorumlanabilir.
- Daha ileri araştırmalarla NLRP2'nin farmakolojik veya genetik manipülasyonu ile inflamasyondaki rolünü belirlemek mümkün olabilir.
- NLRP2'nin zamansal dinamiklerini ve manipülasyonlarını araştıran sonraki çalışmalar, KYD'nin tetiklediği inflamatuvar yanıtlardaki rolü konusunda değerli bilgiler sunarak migren patofizyolojisini anlamamıza katkıda bulunabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Ferrari MD, Goadsby PJ, Burstein R, Kurth T, Ayata C, Charles A, et al. Migraine. Nat Rev Dis Primers. 2022;8(1):2.
2. Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, Lule S, Eren-Kocak E, Sen ZD, et al. Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. Science. 2013;339(6123):1092-5.
3. Goadsby PJ, Holland PR, Martins-Oliveira M, Hoffmann J, Schankin C, Akerman S. Pathophysiology of Migraine: A Disorder of Sensory Processing. Physiol Rev. 2017;97(2):553-622.
4. AAP L. Spreading depression of activity in cerebral cortex. J Neurophysiol. 1944;7:159-390.
5. Kursun O, Yemisci M, van den Maagdenberg A, Karatas H. Migraine and neuroinflammation: the inflammasome perspective. J Headache Pain. 2021;22(1):55.
6. Chen PY, Yen JC, Liu TT, Chen ST, Wang SJ, Chen SP. Neuronal NLRP3 inflammasome mediates spreading depolarization-evoked trigeminovascular activation. Brain. 2023;146(7):2989-3002.
7. Magni G, Boccazzi M, Bodini A, Abbracchio MP, van den Maagdenberg AM, Ceruti S. Basal astrocyte and microglia activation in the central nervous system of Familial Hemiplegic Migraine Type I mice. Cephalalgia. 2019;39(14):1809-17.
8. Spekker E, Fejes-Szabo A, Nagy-Grocz G. Models of Trigeminal Activation: Is There an Animal Model of Migraine? Brain Sci. 2024;14(4).
9. Harriott AM, Strother LC, Vila-Pueyo M, Holland PR. Animal models of migraine and experimental techniques used to examine trigeminal sensory processing. J Headache Pain. 2019;20(1):91.
10. Erdener SE, Dalkara T. Modelling headache and migraine and its pharmacological manipulation. Br J Pharmacol. 2014;171(20):4575-94.
11. B. U. Farede Optogenetik Yolla Tetiklenen Kortikal Yayılan Depresyonun Subkortikal Yayılım Mekanizmalarının İncelenmesi: Hacettepe Üniversitesi; 2019.

12. Houben T, Loonen IC, Baca SM, Schenke M, Meijer JH, Ferrari MD, et al. Optogenetic induction of cortical spreading depression in anesthetized and freely behaving mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(5):1641-55.
13. Chung DY, Sadeghian H, Qin T, Lule S, Lee H, Karakaya F, et al. Determinants of Optogenetic Cortical Spreading Depolarizations. *Cereb Cortex.* 2019;29(3):1150-61.
14. Dehghani A, Phisonkunkasem T, Yilmaz Ozcan S, Dalkara T, van den Maagdenberg A, Tolner EA, et al. Widespread brain parenchymal HMGB1 and NF-kappaB neuroinflammatory responses upon cortical spreading depolarization in familial hemiplegic migraine type 1 mice. *Neurobiol Dis.* 2021;156:105424.
15. Minkiewicz J, de Rivero Vaccari JP, Keane RW. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia.* 2013;61(7):1113-21.
16. Sun X, Song X, Zhang L, Sun J, Wei X, Meng L, et al. NLRP2 is highly expressed in a mouse model of ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;479(4):656-62.
17. Matsuoka Y, Yamashita A, Matsuda M, Kawai K, Sawa T, Amaya F. NLRP2 inflammasome in dorsal root ganglion as a novel molecular platform that produces inflammatory pain hypersensitivity. *Pain.* 2019;160(9):2149-60.
18. Ertas M, Baykan B, Orhan EK, Zarifoglu M, Karli N, Saip S, et al. One-year prevalence and the impact of migraine and tension-type headache in Turkey: a nationwide home-based study in adults. *J Headache Pain.* 2012;13(2):147-57.
19. Ashina M, Katsarava Z, Do TP, Buse DC, Pozo-Rosich P, Ozge A, et al. Migraine: epidemiology and systems of care. *Lancet.* 2021;397(10283):1485-95.
20. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia.* 2018;38(1):1-211.
21. Charles A. The pathophysiology of migraine: implications for clinical management. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):174-82.

22. Tfelt-Hansen PC, Koehler PJ. One hundred years of migraine research: major clinical and scientific observations from 1910 to 2010. *Headache*. 2011;51(5):752-78.
23. Takizawa T, Qin T, Lopes de Morais A, Sugimoto K, Chung JY, Morsett L, et al. Non-invasively triggered spreading depolarizations induce a rapid pro-inflammatory response in cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2020;40(5):1117-31.
24. Charles AC, Baca SM. Cortical spreading depression and migraine. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(11):637-44.
25. Hansen JM, Baca SM, Vanvalkenburgh P, Charles A. Distinctive anatomical and physiological features of migraine aura revealed by 18 years of recording. *Brain*. 2013;136(Pt 12):3589-95.
26. Ayata C. Pearls and pitfalls in experimental models of spreading depression. *Cephalalgia*. 2013;33(8):604-13.
27. Frimpong-Manson K, Ortiz YT, McMahon LR, Wilkerson JL. Advances in understanding migraine pathophysiology: a bench to bedside review of research insights and therapeutics. *Front Mol Neurosci*. 2024;17:1355281.
28. Harriott AM, Takizawa T, Chung DY, Chen SP. Spreading depression as a preclinical model of migraine. *J Headache Pain*. 2019;20(1):45.
29. Karan AA, Gerasimov KA, Spivak YS, Suleymanova EM, Vinogradova LV. Inflammatory response of leptomeninges to a single cortical spreading depolarization. *J Headache Pain*. 2024;25(1):113.
30. Ghaemi A, Alizadeh L, Babaei S, Jafarian M, Khaleghi Ghadiri M, Meuth SG, et al. Astrocyte-mediated inflammation in cortical spreading depression. *Cephalalgia*. 2018;38(4):626-38.
31. Erdener SE, Kaya Z, Dalkara T. Parenchymal neuroinflammatory signaling and dural neurogenic inflammation in migraine. *J Headache Pain*. 2021;22(1):138.
32. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*. 2016;139 Suppl 2(Suppl 2):136-53.

33. Kaya Z, Belder N, Sever-Bahcekapili M, Donmez-Demir B, Erdener SE, Bozbeyoglu N, et al. Vesicular HMGB1 release from neurons stressed with spreading depolarization enables confined inflammatory signaling to astrocytes. *J Neuroinflammation*. 2023;20(1):295.
34. Albrecht DS, Mainero C, Ichijo E, Ward N, Granziera C, Zurcher NR, et al. Imaging of neuroinflammation in migraine with aura: A [(11)C]PBR28 PET/MRI study. *Neurology*. 2019;92(17):e2038-e50.
35. Yang MF, Ren DX, Pan X, Li CX, Xu SY. The Role of Astrocytes in Migraine with Cortical Spreading Depression: Protagonists or Bystanders? A Narrative Review. *Pain Ther*. 2024.
36. Zhang T, Xing F, Qu M, Yang Z, Liu Y, Yao Y, et al. NLRP2 in health and disease. *Immunology*. 2024;171(2):170-80.
37. Mamik MK, Power C. Inflammasomes in neurological diseases: emerging pathogenic and therapeutic concepts. *Brain*. 2017;140(9):2273-85.
38. Chou WC, Jha S, Linhoff MW, Ting JP. The NLR gene family: from discovery to present day. *Nat Rev Immunol*. 2023;23(10):635-54.
39. Ravichandran KA, Heneka MT. Inflammasomes in neurological disorders - mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Neurol*. 2024;20(2):67-83.
40. Ducza L, Gaal B. The Neglected Sibling: NLRP2 Inflammasome in the Nervous System. *Aging Dis*. 2023.
41. Xu Z, Kombe Kombe AJ, Deng S, Zhang H, Wu S, Ruan J, et al. NLRP inflammasomes in health and disease. *Mol Biomed*. 2024;5(1):14.
42. Paik S, Kim JK, Silwal P, Sasakawa C, Jo EK. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(5):1141-60.
43. Chiarini A, Armato U, Gui L, Dal Pra I. "Other Than NLRP3" Inflammasomes: Multiple Roles in Brain Disease. *Neuroscientist*. 2024;30(1):23-48.
44. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023-.

45. Mu J, Wang W, Chen B, Wu L, Li B, Mao X, et al. Mutations in NLRP2 and NLRP5 cause female infertility characterised by early embryonic arrest. *J Med Genet.* 2019;56(7):471-80.
46. Wu GQ, Liao YJ, Qin ZQ, He LR, Chen YC, Zeng YX, et al. PYRIN domain of NALP2 inhibits cell proliferation and tumor growth of human glioblastoma. *Plasmid.* 2010;64(1):41-50.
47. Li T, Li X, Mao R, Pan L, Que Y, Zhu C, et al. NLRP2 inhibits cell proliferation and migration by regulating EMT in lung adenocarcinoma cells. *Cell Biol Int.* 2022;46(4):588-98.
48. Rossi MN, Pascarella A, Licursi V, Caiello I, Taranta A, Rega LR, et al. NLRP2 Regulates Proinflammatory and Antiapoptotic Responses in Proximal Tubular Epithelial Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:252.
49. Bruey JM, Bruey-Sedano N, Newman R, Chandler S, Stehlik C, Reed JC. PAN1/NALP2/PYPAF2, an inducible inflammatory mediator that regulates NF-kappaB and caspase-1 activation in macrophages. *J Biol Chem.* 2004;279(50):51897-907.
50. Zhang M, Wu Y, Gao R, Chen X, Chen R, Chen Z. Glucagon-like peptide-1 analogs mitigate neuroinflammation in Alzheimer's disease by suppressing NLRP2 activation in astrocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2022;542:111529.
51. Fontalba A, Gutierrez O, Fernandez-Luna JL. NLRP2, an inhibitor of the NF-kappaB pathway, is transcriptionally activated by NF-kappaB and exhibits a nonfunctional allelic variant. *J Immunol.* 2007;179(12):8519-24.
52. Cheon SY, Kim EJ, Kim SY, Kim JM, Kam EH, Park JK, et al. Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 Silencing on Astroglial Inflammasomes in an Experimental Model of Ischemic Stroke. *Neuroscience.* 2018;390:218-30.
53. Gustin A, Kirchmeyer M, Koncina E, Felten P, Losciuto S, Heurtaux T, et al. NLRP3 Inflammasome Is Expressed and Functional in Mouse Brain Microglia but Not in Astrocytes. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130624.

54. Zhang Q, Sun Y, He Z, Xu Y, Li X, Ding J, et al. Kynurenine regulates NLRP2 inflammasome in astrocytes and its implications in depression. *Brain Behav Immun.* 2020;88:471-81.
55. Dehghani A, Schenke M, van Heiningen SH, Karatas H, Tolner EA, van den Maagdenberg A. Optogenetic cortical spreading depolarization induces headache-related behaviour and neuroinflammatory responses some prolonged in familial hemiplegic migraine type 1 mice. *J Headache Pain.* 2023;24(1):96.
56. Bostanci N, Emingil G, Saygan B, Turkoglu O, Atilla G, Curtis MA, et al. Expression and regulation of the NALP3 inflammasome complex in periodontal diseases. *Clin Exp Immunol.* 2009;157(3):415-22.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 80

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 27.08.2019 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2019/08
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2019/46
KARAR NUMARASI	: 2019/08- 01
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 27.08.2024
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Hülya Karataş KURŞUN
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Doç. Dr. Eda Derle ÇİFTÇİ
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	:
DİĞER YARDIMCI	: Dr. Burak UZAY, Dr. Canan Çakır AKTAŞ
ARAŞTIRMACILAR	:
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	:
SAYISI	: 120 Adet C57BL/6J wild-type Fare (8-12 Hafta)

Üniversitemiz Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Hülya Karataş KURŞUN'un araştırma yürütücüsü olduğu 2019/46 kayıt numaralı "*Kortikal Yayılan Depolarizasyon ile Tetiklenen Nöro-parainflamasyonda Astrositik İnflamazom Yolağının Rolü*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU İMZA SİRKÜLERİ

TOPLANTI TARİHİ : 27.08.2019 (SALI)
TOPLANTI SAYISI : 2019/08
TOPLANTI SAATİ : 13.30
PROJE NUMARASI : 2019/46
KARAR NUMARASI : 2019/08-01

 Prof. Dr. Sema ÇALIŞ (Başkan)	(İZİMLİ) Prof. Dr. Nüket Örnek BÜKEN (Üye)	 Prof. Dr. M. Yılmaz SARA (Üye)
 Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR (Üye)	 Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI (Üye)	 Prof. Dr. Abdullah C. AKMAN (Üye)
 Prof. Dr. Ersoy KONAŞ (Üye)	 Prof. Dr. Aytekin AKYOL (Üye)	 Doç. Dr. Meltem TUNCER (Üye)
 Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR (Üye)	 Doç. Dr. M. Alper ÇETİNKAYA (Üye)	 Dr. Öğr. Üyesi Banu Cahide TEL (Üye)
 Mevlüt ÖKSÜZOĞLU (Üye)	 Serdar ÇAKIROĞLU (Üye)	 Avukat Yasemin ÖZSELÇUK (Üye)

NLRP2 Immunoreactivity in Mouse Brain After Cortical Spreading Depolarization

Eda DERLE^{1,2}, Buket DÖNMEZ DEMİR¹, Melike SEVER BAHÇEKAPILI², Canan ÇAKIR AKTAŞ², Onur Çağın GÜRLEK², Beyza TÜRKEN², Hülya KARATAŞ KURŞUN²

¹Bağkent University Faculty of Medicine, Department of Neurology, Ankara, Turkey

²Hacettepe University, Institute of Neurological Sciences and Psychiatry, Ankara, Turkey

ABSTRACT

Introduction: The objective of this study is to elucidate the expression pattern and alterations of NLRP2 following a single cortical spreading depolarization (CSD).

Method: Brain tissue was obtained by cardiac perfusion at the 15th minute after CSD in optogenetically inducible Thy1-ChR2-YFP (n=3) mice. NLRP2 expression was examined in the obtained brain tissue sections by immunofluorescence staining and compared with NLRP2 expression pattern in the sections obtained from the control group (n=3) and naive mice (n=1). The cellular source of NLRP2 is demonstrated by dual staining with NeuN and S100β.

Results: Cellular immunoreactivity of NLRP2 was evident in the cortical and subcortical regions of sham and naive group brains. This immunoreactivity exhibited a notable reduction in CSD-induced brains. The majority of cells expressing NLRP2 exhibited colocalization with NeuN, a neuronal marker, while a smaller subset demonstrated merging with S100β, an astrocyte marker.

Conclusion: This study revealed the decreased immunoreactivity of NLRP2 after single CSD in early period.

Keywords: Cortical spreading depolarization, inflammasome, inflammation, migraine, NLRP2

Cite this article as: Derle E, Dönmez Demir B, Sever Bahçekapılı M, Çakır Aktaş C, Gürlek OC, Türken B et al. NLRP2 Immunoreactivity in Mouse Brain After Cortical Spreading Depolarization. Arch Neuropsychiatry 2024, Jul 20. doi: 10.29399/npa.28688 [Epub ahead of print].

INTRODUCTION

The NOD-like receptor (NLR) family, a subset of pattern recognition receptors within the innate immune system, includes NLR pyrin domain-containing 2 (NLRP2). While the precise role of NLRP2 in immune responses remains incompletely understood, numerous studies indicate its involvement as an astrocytic inflammasome, contributing to inflammatory responses in various disease models such as cerebral ischemia, pain, and depression (1-3). Conversely, there are indications of its anti-inflammatory effects through the regulation of nuclear factor-κB (NF-κB) in different systems (2).

Additionally, prior research has highlighted the activation of NLRP2 by ATP through pannexin channels and purinergic receptors on astrocytes, resulting in an inflammatory cascade (1). This process has been implicated in various pathological conditions, including cerebral ischemia, pain, and depression (2,3). The dual nature of NLRP2, exerting both pro-inflammatory effects as an astrocytic inflammasome and anti-inflammatory effects through NF-κB regulation, underscores its complexity and multifaceted role in immune responses (2).

In the context of the cortical spreading depolarization model, which is accepted as the experimental model of migraine aura, where ATP-mediated astrocytic stimulation has been documented, the potential involvement of NLRP2 as a mediator in this stimulation and the

Highlights

- Inflammation is proposed as a key mechanism underlying the pathogenesis of migraine.
- NLRP2 may play a role in migraine pathogenesis
- NLRP2 may also express in neuronal cells besides astrocytes.
- NLRP2 immunoreactivity decreases very early time after CSD.

subsequent inflammatory response emerges as a crucial aspect of investigation (4,5). By exploring changes in NLRP2 immunoreactivity in a single optogenetically induced cortical spreading depolarization model at a very early time point, this study aims to contribute valuable insights into the intricate mechanisms underlying NLRP2's participation in neuroinflammatory processes. Such understanding holds promise for uncovering therapeutic targets and strategies to modulate NLRP2-associated responses in neurologic disorders.

Correspondence Address: Eda Derle, Bağkent Üniversitesi Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalı, E blok Bahçelievler, Ankara, Turkey • E-mail: edaderle@hotmail.com

Received: 21.12.2023, **Accepted:** 08.05.2024, **Available Online Date:** 20.07.2024

©Copyright 2024 by Turkish Association of Neuropsychiatry - Available online at www.noropskiyatrisi.com

METHOD

Animals

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Hacettepe University (2019/46). All animals had free access to food and water and were housed in groups under diurnal lighting conditions (12-h light-12-h dark cycle) at 22±3°C and 40–60% humidity.

Optogenetic induction of CSD stimulation is minimally invasive and minimizes procedure-associated inflammatory reactions. For optogenetic induction, we used Thy1-ChR2-YFP mice which express channelrhodopsin-2 on cortical neurons and can be stimulated by laser light ($n=3$) and negative littermates as sham group ($n=3$), C57BL/6j ($n=1$) as a naive group, aged 12–16 weeks, 20–25 gr weighing. Oxygen saturation, pulse rate, and body temperature were monitored via an oximeter (The LifeSense® VET Pulse Oximeter, Nonin Medical Inc., USA).

Optogenetic Stimulation of Cortical Spreading Depolarization

Isoflurane was used for induction and maintenance of anesthesia during surgery and CSD induction experiments. Thy1-ChR2-YFP transgenic and littermate mice were placed in a stereotaxic frame following anesthesia and surgical procedures were performed under a stereomicroscope (Zeiss SV6). First, a skin incision was made in the midline, and bregma, frontal, and parietal bones were exposed. For electrophysiological recording, the parietal bone was thinned with a high-speed drill. During thinning, the bone was cooled with physiological saline. The thinned bone area was marked and an Ag-AgCl₂ pellet electrode was lowered onto the cranium. For grounding, an Ag-AgCl₂ disc electrode was placed between the neck muscles. Electrodes were connected to the Powerlab data acquisition system. Electrophysiological recording was started and the quality of the physiological recording was checked with the Labchart program. When the recording became stable, an optogenetic stimulation was made with a fiberoptic cable placed on the frontal bone. Laser source with a wavelength of 450 nm was adjusted to a light intensity of 4 mW, and a 0.48 numerical aperture with a diameter of 400 µm. Stimulation was applied at an intensity of 50 mJ for 10 seconds and an electrophysiological recording of the cortical spreading depolarization wave was recorded.

In the sham group, the surgical procedure was the same as the experiment group except for the laser stimulation. Furthermore, no procedure was applied on naive mouse except anesthesia. Cardiac perfusion in mice was performed at the 15th minute following the recording of CSD. Then the brain tissue was removed in all groups and kept in 4% PFA for 24 hours and then in 30% sucrose solution for 48 hours for cryoprotection. After that, 20 nm thick coronal sections were taken on a cryomicrotome (Leica CM 1100).

Immunofluorescence Staining

Sections were placed in citrate solution (PH=6) in hot water at 80°C for 10 minutes and then allowed to cool down to room temperature. Then washed twice for 5 minutes (TBS + 0.025% triton X) and incubated for 10 minutes for permeabilization (TBS + 0.2% Triton X). The slices were incubated with blockage solution (0.3 M glycine with 10% normal goat serum) for 75 minutes, followed by the primary antibody for 48 hours (1/100 NLRP2 antibody, Proteintech 15182-1-AP). After the incubation, slices were rinsed with washing solution 3 times for 5 minutes and with secondary antibody (1/200 Goat Anti Rabbit Alexa fluoro 488 Abcam-ab150077) for 1 hour. For double staining, slices were incubated with NeuN (1/150 Millipore MAB377) and S100β (1/150 atlas antibodies MAB03629) overnight at +4°C and 1 hour at room temperature with secondary antibody (1/200 goat anti-mouse cy3). The sections were washed three times in between every step, incubated with Hoechst-33258 solution, and then covered with a coverslip.

All slices were investigated with a Leica TCS SP8 confocal laser scanning microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and the images were obtained with a resolution of 2048 × 2048 pixels.

RESULTS

In this study, we explored the immunoreactivity of NLRP2 15 minutes following the optogenetically induced single cortical spreading depolarization (CSD) in mouse brains. Initially, we scrutinized the expression pattern of NLRP2 in mouse brain sections through immunofluorescence staining. Notably, discernible cellular immunoreactivity of NLRP2 was evident in the cortical and subcortical regions of sham and naive group brains. Intriguingly, this immunoreactivity exhibited a notable reduction in CSD-induced brains, as illustrated in Figure 1.

Subsequently, to elucidate the cellular identity of NLRP2 expression, double immunostaining experiments were conducted. The results revealed that the majority of cells expressing NLRP2 exhibited colocalization with NeuN, a neuronal marker, while a smaller subset demonstrated merging with S100β, an astrocyte marker, as depicted in Figure 2. This dual staining approach provided valuable insights into the specific cellular populations expressing NLRP2 in response to optogenetically induced single CSD, shedding light on the potential involvement of both neurons and astrocytes in the observed immunoreactivity changes.

DISCUSSION

Inflammation is proposed as a key mechanism underlying the pathogenesis of various neurological diseases, encompassing migraine, pain, neurodegenerative disorders, and cerebral ischemia. Inflammasomes, integral components of the innate immune system, activate proinflammatory cascades. While numerous members of the NOD-like receptor (NLR) family have been identified in different pathophysiological processes, the understanding of their roles in diseases, including NLRP2, remains insufficient (3). Especially NLRP2 is the least studied inflammasome type among others.

The objective of this study was to elucidate the expression pattern and alterations of NLRP2 following a single CSD. Surprisingly, our findings indicated basal-level expression of NLRP2 in neurons, with a discernible shift in immunoreactivity after CSD. In contrast to prior research suggesting a less abundant neuronal expression and prevalent astrocytic features, our results demonstrated marked NLRP2 expression in NeuN (+) cells, particularly in the naive and sham groups (1,6–9). Notably, there was a pronounced reduction in NLRP2 immunoreactivity following CSD, challenging the previously reported astrocytic predominance in studies.

Noteworthy studies by Zhang, Sun, Cheon, and Minkiewicz et al. underscored the astrocytic expression of NLRP2 and its association with ATP-induced pannexin and P2X7 receptor stimulation, activating inflammasome and proinflammatory cascades (1,6–9). These findings prompted us to explore the potential link between NLRP2 and CSD, considering its plausible role in the proinflammatory features observed in experimental migraine models.

Intriguingly, our study deviates from previous reports, demonstrating a marked neuronal expression pattern of NLRP2 in cortical and subcortical brain regions, contrary to the astrocytic features predominantly observed in other studies. This distinction aligns with Matsuka et al.'s identification of neuronal NLRP2 expression in dorsal root ganglia during an inflammatory pain hypersensitivity model (10). However, our study revealed a reduction in NLRP2 immunoreactivity after CSD, in contrast to Matsuka et al.'s observations of increased reactivity following ceramide-induced tissue inflammation (10). Nevertheless, in this study, NLRP2 was

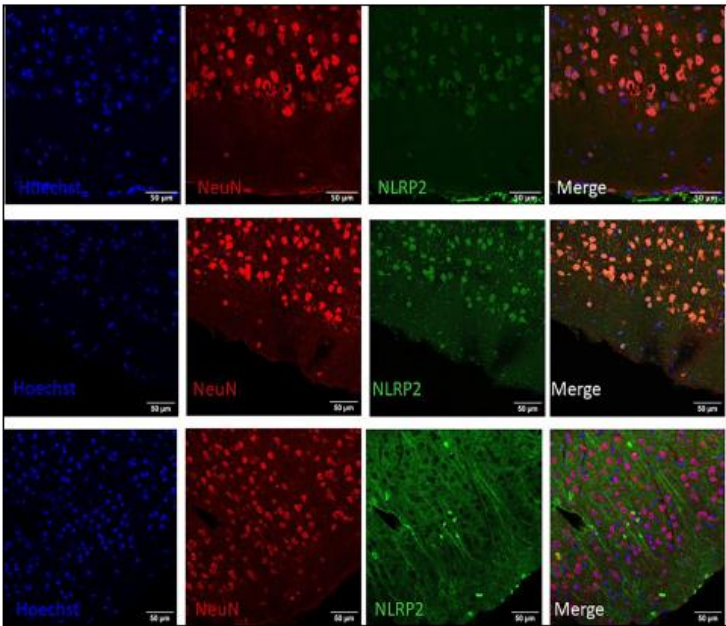


Figure 1. Representative images of NLRP2 immunoreactivity. Double staining with NeuN (red) and NLRP2 (green) was performed. Hoechst (blue) was used for nuclear counterstain. Naïve group (upper row) and sham group (mid row) images showed cellular NLRP2 staining patterns which were diminished in the cortical spreading depolarization brain (lower row). Neuronal marker (NeuN) and NLRP2 colocalizations are seen in merged images.

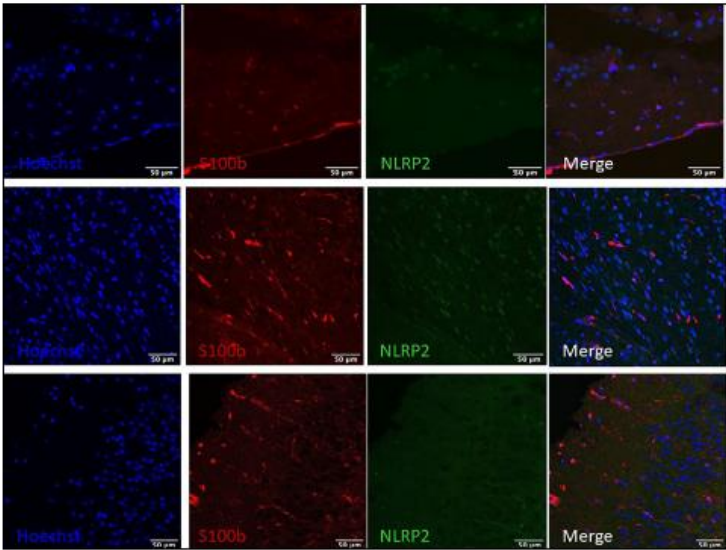


Figure 2. Representative images of NLRP2 immunoreactivity. Double staining with S100b (red) and NLRP2 (green) was performed. Hoechst (blue) was used for nuclear counterstain. NLRP2 immunopositivity was barely seen in S100b positive astrocytes (merged images).

detected two days after ceramide induction. In our study, we detected NLRP2 expression at a very early time point after CSD induction (10). Considering the timing of response patterns elicited by stimulation, further investigations may unravel the expression and activation intervals of NLRP2. Pharmacologic or genetic manipulation of NLRP2 presents a promising avenue for understanding its role as a potential limiting factor in inflammation, possibly through NF- κ B regulation. Future research exploring the temporal dynamics and manipulations of NLRP2 could offer valuable insights into its involvement in the inflammatory responses triggered by CSD.

Ethics Committee Approval: This animal study was approved by Hacettepe University, Animal Experiments Ethics Committee (Approval No: 2019/46)

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept- ED, HK; Design- ED, HK; Supervision- ED, HK; Resource- ED, HK; Materials- ED, HK; Data Collection and/or Processing- ED, HK, BDD, MSB, CCA, OCG, BT; Analysis and/or Interpretation- ED, HK; Literature Search- ED; Writing- ED, HK; Critical Reviews- ED, HK.

Conflict of Interest: The authors declared that there is no conflict of interest.

Financial Disclosure: The study is financed by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project no: TSA 2020-18568)

REFERENCES

1. Minkiewicz J, de Rivero Vaccari JP, Keane RW. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia*. 2013;61(7):1113–1121. [\[Crossref\]](#)
2. Zhang T, Xing F, Qu M, Yang Z, Liu Y, Yao Y, et al. NLRP2 in health and disease. *Immunology*. 2024;171(2):170–180. [\[Crossref\]](#)
3. Ducza L, Gaál B. The neglected sibling: NLRP2 inflammasome in the nervous system. *Aging Dis*. 2024;15(3):1006–1028. [\[Crossref\]](#)
4. Kursun O, Yemisci M, van den Maagdenberg AMJM, Karatas H. Migraine and neuroinflammation: the inflammasome perspective. *J Headache Pain*. 2021;22(1):55. [\[Crossref\]](#)
5. Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ordemir Y, Lule S, Eren-Kocak E, Sen ZD, et al. Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science*. 2013;339(6123):1092–1095. [\[Crossref\]](#)
6. Zhang Q, Sun Y, He Z, Xu Y, Li X, Ding J, et al. Kynurenine regulates NLRP2 inflammasome in astrocytes and its implications in depression. *Brain Behav Immun*. 2020;88:471–481. [\[Crossref\]](#)
7. Zhang M, Wu Y, Gao R, Chen X, Chen R, Chen Z. Glucagon-like peptide-1 analogs mitigate neuroinflammation in Alzheimer's disease by suppressing NLRP2 activation in astrocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2022;542:111529. [\[Crossref\]](#)
8. Cheon SY, Kim EJ, Kim SY, Kim JM, Kam EH, Park JK, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 silencing on astroglial inflammasomes in an experimental model of ischemic stroke. *Neuroscience*. 2018;390:218–230. [\[Crossref\]](#)
9. Sun X, Song X, Zhang L, Sun J, Wei X, Meng L, et al. NLRP2 is highly expressed in a mouse model of ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;479(4):656–662. [\[Crossref\]](#)
10. Matsuoka Y, Yamashita A, Matsuda M, Kawai K, Sawa T, Amaya F. NLRP2 inflammasome in dorsal root ganglion as a novel molecular platform that produces inflammatory pain hypersensitivity. *Pain*. 2019;160(9):2149–2160. [\[Crossref\]](#)

EK-3: Tez Çalışması Orjinallik Raporu



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Eda DERLE CİFTÇİ
Ödev başlığı: Eda Derle Temel Nöronilim Doktora Tezi
Gönderi Başlığı: Eda tez metin 20.6.başlıklarla son güncelleme üstünde çalışıl...
Dosya adı: Eda_tez_metin_20.6.başlıklarla_son_güncelleme_üstünde_çalı...
Dosya boyutu: 63.69M
Sayfa sayısı: 99
Kelime sayısı: 15,536
Karakter sayısı: 105,523
Gönderim Tarihi: 26-Tem-2024 01:41ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2422697988



Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme kondu: 26-Tem-2024 13:45 +03

NUMARA: 2422697988

Kelime Sayısı: 15536

Gönderildi: 1

Eda tez metin 20.6.başlıklarla son güncelleme... Eda
DERLE CİFTÇİ tarafından

Kaynağa göre Benzerlik	
Benzerlik Endeksi	
%7	
Internet Sources:	%6
Yayınlar:	%5
Öğrenci Ödevleri:	%3

alıntılar dahil et

bibliyografayı dahil et

küçük eşleşmeleri çıkar

mod: **raporu hızlı görüntüle (klasik)**

yazdır

yenile

İndir

1% match (06-Oca-2023 tarihli internet)

<http://acikerisim.ikcu.edu.tr>

1% match (20-Haz-2024 tarihli internet)

<https://acikerisim.hacettepe.edu.tr/items/e867cf5e-a061-4b8b-900d-7fd5c4fac95c/full>

<1% match (28-Eki-2022 tarihli internet)

<http://acikerisim.ikcu.edu.tr>

<1% match (24-Eyl-2022 tarihli internet)

https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/489568/yokAcikBilim_10270685.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

<1% match (05-Eki-2022 tarihli internet)

https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/428023/yokAcikBilim_10213401.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

<1% match (30-Eyl-2022 tarihli internet)

https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/452019/yokAcikBilim_10169752.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

<1% match (02-Ara-2023 tarihli internet)

<https://docplayer.biz.tr/89353160-Ozet-yuksekk-lisans-tezi-salmonella-typhimurium-da-stj-fimbriyal-operonu-aktive-edilmis-mutantların-genetik-analizi-deniz-yuksel-ankara-universitesi-fe.html>

<1% match (30-Kas-2023 tarihli internet)

<http://docplayer.biz.tr>

<1% match (31-May-2024 tarihli internet)

<http://docplayer.biz.tr>

<1% match (25-Haz-2024 tarihli internet)

<http://docplayer.biz.tr>

<1% match (Ariöz, Burak İbrahim. "Melatonin 'in Mikroglial Hücrelerde İnflamazom Aktivasyonu Üzerine Etkisi", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024)

[Ariöz, Burak İbrahim. "Melatonin 'in Mikroglial Hücrelerde İnflamazom Aktivasyonu Üzerine Etkisi", Dokuz Eylül Üniversitesi \(Turkey\), 2024](#)

<1% match (13-Ara-2022 tarihli internet)

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2021.648570/full>

<1% match (15-Eki-2022 tarihli internet)

9. ÖZGEÇMİŞ