

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KORTİKAL YAYILAN DEPRESYONUN TETİKLEDİĞİ
NÖROİNFLAMASYONUN ÇÖZÜLMESİ VE BUNUN MİGREN BAŞ AĞRISI
PATOFİZYOLOJİSİNDEKİ YERİ**

Zeynep KAYA

**Temel Nörolojik Bilimler Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2019**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KORTİKAL YAYILAN DEPRESYONUN TETİKLEDİĞİ
NÖROİNFLAMASYONUN ÇÖZÜLMESİ VE BUNUN MİGREN BAŞ AĞRISI
PATO FİZYOLOJİSİNDEKİ YERİ**

Zeynep KAYA

Temel Nörolojik Bilimler Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Turgay DALKARA

ANKARA

2019

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KORTİKAL YAYILAN DEPRESYONUN TETİKLEDİĞİ NÖROİNFLAMASYONUN
ÇÖZÜLMESİ VE BUNUN MİGREN BAŞ AĞRISI PATOFİZYOLOJİSİNDEKİ YERİ

Zeynep KAYA

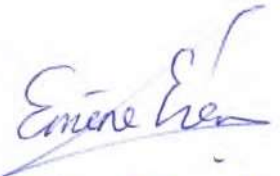
Danışman: Prof. Dr. Turgay DALKARA

Bu tez çalışması 25.07.2019 tarihinde jürimiz tarafından "Temel Nörolojik Bilimler Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Bülent ELİBOL
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Doç. Dr. Emine EREN KOÇAK
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Doç. Dr. Hülya KARATAŞ KURŞUN
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Esra ERDEMLİ
(Ankara Üniversitesi)




Üye: Ş. Remzi ERDEM
(Başkent Üniversitesi)



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

28 Ağustos 2019


Prof. Dr. Diclehan DRHAN

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 Üniversitesi'ne 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 tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- X Enstitü yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

26 /08 / 2019

Zeynep KAYA

“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 internette 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 tezlere 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, Prof. Dr. Turgay DALKARA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesi'ne göre yazıldığını beyan ederim.



Zeynep KAYA

TEŞEKKÜR

Doktora tezimi dünyaya geldiğimden beri daha iyi bir insan olmam için çabalayan ilk öğretmenim, ablam Dr. Gülsen Bahar Öğüçoğlu'na adıyorum.

Bilim insanı olmak istediğimi anlayıp nörobilime gönül verdiğim ilk andan itibaren bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, bilime karşı tutkusuyla bana ilham veren, beni cesaretlendiren, desteğini daima yanımda hissettiğim danışmanım Prof. Dr. Turgay Dalkara'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Onun öğretileri yaşamım boyunca kulağымda olacak.

Sorularımı içtenlikle yanıtlayan, bilgi birikimlerini çekinmeksizin paylaşan değerli hocalarım Doç. Dr. Emine Eren Koçak, Doç. Dr. Hülya Karataş Kurşun ve Prof. Dr. Müge Yemişçi Özkan'a teşekkürü borç bilirim. Bilimsel ve teknik destekleriyle bu tezin hayata geçmesini sağlayan başta Dr. Buket Demir ve Dr. Sinem Yılmaz Özcan olmak üzere; Dr. Nevin Belder, Dr. Canan Çakır Aktaş, Uzm. Dr. Aslıhan Taşkıran Sağ, Dr. Öğr. Üyesi Evren Erdener ve Dr. Öğr. Üyesi Gül Yalçın Çakmaklı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım, doktora sürecini tüm sıkıntılara rağmen zevkli hale getiren, can dostlarım, parlak genç bilim insanları Burak Uzun ve Gülce Küreli'ye en içten teşekkürü borç bilirim.

Geleceğin değerli bilim insanları olacaklarına inandığım çalışma arkadaşlarım Aslıhan Bahadır Varol ve Ecehan Erk'e keyifli sohbetlerinden; her sıkıştığımız anda yardımımıza koşan teknisyenimiz Mesut Fırat'a ve başta enstitü sekreterimiz Nursel İlikli olmak üzere tüm Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü personeline desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Arkamdaki en büyük, yıkılmaz desteği sağlayan ailem Elife-Kadir Kaya'ya ve sevgili hayat arkadaşım Dr. Doğukan Doğu'ya bana duydukları sonsuz güven ve sabırlarından ötürü en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (TSA-2017-14418) ve TÜBİTAK'a (118S435) teşekkür ederim.

ÖZET

Kaya, Z. Kortikal Yayılan Depresyonun Tetiklediği Nöroinflamasyonun Çözülmesi ve Bunun Migren Baş Ağrısı Patofizyolojisindeki Yeri, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Nörolojik Bilimler Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2019.

Migren şiddetli baş ağrısıyla kendini gösteren, sık görülen bir hastalıktır. Daha etkili tedavilerin geliştirilebilmesi için migren patofizyolojisi daha iyi anlaşılmalıdır. Kortikal yayılan depresyon (KYD), migren aurasının nörofizyolojik karşılığıdır. "KYD'nin tetiklediği, parankimal ve bunu izleyen meningeal inflamatuvar yanıt sonucunda migren baş ağrısı oluşmaktadır" görüşü literatürde giderek kabul görmektedir. KYD ile nöronlarda inflamazom kompleksinin oluşumu, kaspaz-1 aktivasyonu ve *high mobility group box1*'in (HMGB1) saliverilmesi astrositlerde pro-inflamatuvar nükleer faktör kapp B (NF-kapp B) yolağını aktifleştiren ana olaylardır. Çalışmamızda bu steril inflamasyonun çözülmesinin, migren baş ağrısının kendiliğinden sonlanmasında etkili olabileceği hipotezini erkek Swiss albino ırkı fare beyinlerinde iğne batırılmasıyla tek KYD tetikleyerek araştırdık. HMGB1'in KYD ile naif beyne kıyasla tüm kortikal hücrelerin %23±3,0'ünün çekirdeklerinden hemen saliverildiği (n=3), 24 saat içinde ise yerine konmadığı görüldü (%26±1,8; p=0,26, n=3). Nörondan saliverilen ve periferik kana karışan eksozomların HMGB1 taşıdığı gösterildi. Nöronlardaki kaspaz-1 aktivitesinin KYD'den 3 saat sonra azalmaya başladığı saptandı (KYD'den 1, 3 ve 5 saat sonra sırasıyla aktif enzim oranı %11±3,0; 5±0,4 ve 6±1,1; p=0,08; n=3). Nöron dışı hücrelerde NF-kapp B ailesinin sırasıyla inflamasyon çözülmesinde etkili ve pro-inflamatuvar alt birimleri cRel ve p65'in KYD ile hemen aktifleştirdiği; 24 saat sonunda cRel aktivitesinin arttığı, p65'inkin ise azalma eğiliminde olduğu tespit edildi (sırasıyla aktif hücre oranları 15. dakikada ve 24 saatte, cRel için %24±2,5 ve 36±3,0; p65 için %25±2,1 ve 21±3,6; n=3). I-kapp B'nin de inflamasyonun tetiklenmesiyle hücrelerin %33±4,6'sında çekirdeğe göç ettiği görüldü (p=0,002; n=3). Bu bulgular sonucunda nöron dışı hücrelerde KYD ile tetiklenen inflamasyonun, inflamasyonun çözülmesinde rol oynayan süreçlerle birlikte yönetildiği düşünüldü. Ayrıca, cRel'in nöronların %31±3,2'sinde devamlı transkripsiyonel aktivite gösterdiği tespit edildi. Nöronlardaki p65 ve cRel aktivitesinin KYD sonrası sinaptik dikenlerin yapısal düzenlenmesinde etkili olabileceğine dair ön bulgular saptandı. Sonuç olarak KYD'nin tetiklediği inflamatuvar cevap, nöronlarda kaspaz-1 etkinliğinin sönmesi ve astrositlerde anti-inflamatuvar c-Rel ve I-kapp B aktivitesini içeren kompleks bir süreçle yaklaşık 24 saat içinde sonlanmaya başlamaktadır. Tek hücre transkriptom çalışmaları bu olayların hücresel detaylarını ortaya koymak için gereklidir.

Anahtar kelimeler: migren, kortikal yayılan depresyon, nöroinflamasyon, inflamasyon çözülmesi, NF-kapp B.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (TSA-2017-14418) ve TÜBİTAK tarafından (118S435) desteklenmektedir.

ABSTRACT

Kaya, Z. Resolution of Inflammation Triggered by Cortical Spreading Depression and Its Contribution to Migraine Headache Pathophysiology, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Basic Neurological Sciences Program, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2019. Migraine is a common disorder which manifests itself as severe headache. Migraine pathophysiology needs deeper understanding in order to develop more effective treatments. Cortical spreading depression (CSD) is the neurophysiological correlate of migraine aura. The idea that "Migraine pain emerges as a result of CSD-triggered parenchymal and subsequent meningeal sterile inflammatory response" is increasingly accepted. Formation of the inflammasome complex in neurons by CSD, activation of caspase-1 and release of high-mobility group box 1 (HMGB1) are the key events that activate the pro-inflammatory NF-kappa B cascade in astrocytes. We hypothesized that the resolution of this sterile inflammation may have a role in the spontaneous cessation of migraine headache and tested this hypothesis in male Swiss albino mice brain after single CSD introduced by pinprick. HMGB1 was found to be released immediately from the nuclei of $23\pm 3.0\%$ of all cortical cells ($n = 3$), yet not replaced within 24 hours ($26\pm 1.8\%$; $p=0.26$, $n=3$). We showed that HMGB1 carrying exosomes were released from neurons and detectable in the peripheral blood. It was found that the neuronal caspase-1 activity began to decrease 3 hours after CSD (1, 3 and 5 hours after CSD, active enzyme ratio was $11\pm 3.0\%$, 5 ± 0.4 and $6\pm 1.1\%$, respectively; $p=0.08$; $n=3$). In nonneuronal cells, NF-kappa B subunits cRel (effective in resolution phase) and p65 (proinflammatory) were immediately activated by CSD, and within 24 hours cRel activity increased and p65 activity tended to decrease (respectively, active cell ratios 24 ± 2.5 and $36\pm 3.0\%$ for cRel, 25 ± 2.1 and $21\pm 3.6\%$ for p65; $n=3$). I-kappa B was also observed to migrate to $33\pm 4.6\%$ of nonneuronal nuclei after CSD ($p=0.002$; $n=3$). In nonneuronal cells, inflammation triggered by CSD appears to be regulated by a concerted action of pro- and anti-inflammatory processes. Furthermore, in $31\pm 3.2\%$ of neuronal nuclei cRel was constitutively present, and preliminary data suggest that p65 and cRel activity in neurons might play a role in synaptic spine restoration after CSD. In conclusion, the inflammatory response triggered by CSD begins to terminate within 24 hours by fading of neuronal caspase-1 activity, and in astrocytes, by a complex process involving anti-inflammatory c-Rel and I-kappa B activity. Single cell transcriptomics are required for further cellular details.

Key words: migraine, cortical spreading depression, neuroinflammation, inflammation resolution, NF-kappa B.

This study is supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit by (TSA-2017-14418) and by Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK, 118S435).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Migren Baş Ağrısı ve Kortikal Yayılan Depresyon ile İlişkisi	3
2.2. Migren Baş Ağrısı Patofizyolojisinde Kortikal Yayılan Depresyonla Tetiklenen İnflamasyonun Yeri	5
2.3. İnflamasyonun Çözülmesi	7
2.4. Nükleer Faktör-Kappa B Ailesi	8
2.5. HMGB1	13
2.6. Eksozomlar ve KYD ile İlişkisi	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Barındırma Koşulları	19
3.2. Kortikal Yayılan Depresyon Dalgasının Oluşturulması	19
3.2.1. Tek KYD Oluşturulması	20
3.2.2. Birden fazla KYD Oluşturulması	20
3.3. Beyin ve Kan Örneklerinin Eldesi	21
3.4. İmmunofloresan İşaretleme	21
3.4.1. p65, cRel, HMGB1 ve Iba-1 İşaretlemeleleri	22
3.4.2. p65-Neun, cRel-Neun ve I-kappa B-Neun Çifte İşaretlemeleleri	22
3.4.3. p65-S100B ve cRel-MAP2 Çifte İşaretlemeleleri	23

3.4.4. Aktif Kaspaz-1 İşaretleme	23
3.5. İmmünofloresan İşaretleme Verilerinin Sayısal Analizi	24
3.6. Nükleer Proteinlerin Ayrıştırılması	24
3.7. Doku Örneklerinin Lizat Haline Getirilmesi	25
3.8. Beyin Dokusu ve Plazmadan Nöron Kökenli Eksozomların Ayrıştırılması	25
3.8.1. Beyin Dokusu ve Plazmadan Eksozomların Ayrıştırılması	25
3.8.2. Kortikal ve Plazma Eksozomlarının Akış Sitometrisiyle Tayini	26
3.8.3. Plazmadan Nöron Kökenli Eksozomların Ayrıştırılması	28
3.9. Konsantrasyon Tayini	29
3.10. Western Blotlama ve Verilerin Sayısal Analizi	29
3.11. İmmünoelektron Mikroskopi ile HMGB1 İşaretleme	30
3.12. Sayısal Verilerin İstatistiksel Analizi	31
4. BULGULAR	34
4.1. HMGB1 Saliverilmesinin İmmünofloresan İşaretlemeyle Tayini	34
4.2. Total Eksozom İzolasyonu	37
4.3. Nöron Kökenli Eksozomların Periferik Kandan İzolasyonu	40
4.4. Kortikal Eksozomların HMGB1 Taşıdığıın Gösterilmesi	42
4.5. Nöron Kökenli Plazma Eksozomlarının HMGB1 Taşıdığıın Gösterilmesi	43
4.6. HMGB1 Saliverilmesinin İmmünoaltın İşaretlemeyle Gösterilmesi	44
4.7. Kaspaz-1 Aktivitesinin İmmünofloresan İşaretlemeyle İncelenmesi	47
4.8. Kaspaz-1 Aktivitesinin Western Blotlama ile İncelenmesi	50
4.9. KYD ile NF-kappa B p65 ve cRel'in Hücre İçi Yer Değişimleri	53
4.10. KYD ile Tetiklenen İnflamasyonun Çözülmesinde I-kappa B'nin Yeri	69
4.11. KYD ile NF-kappa B Üyelerinin Çekirdeğe Göç Ettiğinin Nükleer Protein Lizatlarında Gösterilmesi	74
5. TARTIŞMA	76
5.1. Nöroinflamasyonun Çözülmesinde HMGB1'in Rolü	77
5.2. Nöroinflamasyonun Çözülmesinde İnflamazom Kompleksinin Rolü	81
5.3. Nöroinflamasyonun Çözülmesinde NF-kappa B'nin Rolü	82
5.4. Nöronlarda NF-kappa B'nin Sinaps Düzenlenmesindeki Rolü	85

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	87
7. KAYNAKLAR	89
8. EKLER	96
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	100

SİMGELER VE KISALTMALAR

ASC	<i>Apoptosis-associated Speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD</i>
BCA	Bisinkoninik Analiz
BOS	Beyin-Omurilik Sıvısı
BSA	Sığır Serum Albümini
CARD	<i>Caspase Activation and Recruitment Domain</i>
COX2	Siklooksijenaz 2
DC	Direkt Kenetli
ECoG	Elektrokortikogram
HMGB1	<i>High Mobility Group Box-1</i>
HRP	Yaban Turpu Peroksidazı
I-kappa B	İnhibitör Kappa B
IL-1β	İnterlökin-1 Beta
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KCl	Potasyum Klorür
KST	Küçük Santrifüj Tüpü
KYD	Kortikal Yayılan Depresyon
LPS	Lipopolisakkarit
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NF-kappa B	Nükleer Faktör Kappa B
NGS	Normal Keçi Serumu
NLR	<i>Nod-Like Receptor</i>
NMS	Normal Fare Serumu
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PET	Pozitron Emisyon Tomografi
PFA	Paraformaldehit
PYD	Pyrin
RAGE	İleri Glikasyon Son Ürünleri
SAK	Subaraknoid Kanama
SH	Standart Hata
SPECT	Tek Foton Emisyonu Bilgisayarlı Tomografi
TAD	Transaktivasyon Bölgesi
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Kortikal yayılan depresyon sırasında görülen serebral kan akımı ve ECoG değişiklikleri.	4
2.2.	İnflamazom kompleksinin yapısı.	6
2.3.	KYD ile nöronlarda tetiklenen inflamasyonu astrositlerde ve meninkslerde oluşan inflamasyon izler.	7
2.4.	Nükleer faktör kappa B transkripsiyon faktörü ailesi alt birimleri.	9
2.5.	Klasik NF-kappa B yolağının aktivasyonu.	10
2.6.	NF-kappa B'nin aktivasyon süresini düzenleyen mekanizmalar.	13
2.7.	HMGB1'in saliverilme mekanizmaları ve bağlandığı reseptörler.	15
2.8.	Eksozomların üretilme ve saliverilme mekanizmaları.	16
3.1.	Tez çalışmaları sırasında yapılan tüm deneysel çalışmaların özeti.	18
3.2.	İğne batırılması yöntemiyle tetiklenen tek KYD dalgasının elektrofizyolojik kaydı.	20
3.3.	Akış sitometrisi verisinin analizi için kullanılan kapılama stratejisi.	28
4.1.	KYD'den 5 ve 24 saat sonra çekirdeğinde HMGB1 içeren hücre oranında değişim olmuyor.	34
4.2.	KYD ile saliverilen HMGB1 24 saat içinde yerine konulmuyor.	35
4.3.	KYD'den 15 dakika (A, B) ve 3 saat (C) sonra ipsilateral kortekste HMGB1 noktasal işaretleniyor.	36
4.4.	Beyin korteksinden eksozomlar başarıyla ayrıştırılabilir.	39
4.5.	Plazmadan nöron kökenli eksozomlar başarıyla ayrıştırılabilir.	41
4.6.	KYD'den sonra kortekste saliverilen eksozomlar HMGB1 içeriyor.	42
4.7.	KYD'den sonra nöronlardan eksozom içinde saliverilen HMGB1 periferik kanda saptanabilir.	43

4.8.	KYD'den 15 dakika sonra ipsilateral kortekste HMGB1 çekirdekten veziküller aracılığıyla salıveriliyor.	45
4.9.	HMGB1 içeren veziküller, KYD'den 3 saat sonra ipsilateral kortekste izlenmeye devam ediyor.	46
4.10.	KYD'den 1, 3, 5 saat sonra ve yalancı cerrahiden 3 saat sonra ipsilateral kortekste aktif kaspaz-1 farklı paternde ve yoğunlukta işaretleniyor.	48
4.11.	KYD'den 1, 3 ve 5 saat sonra ipsilateral kortekste aktif kaspaz-1 işaretlenmesinin hücresel detayları.	49
4.12.	KYD'den 3 saat sonra ipsilateral kortekste kaspaz-1 aktivitesi azalıyor.	51
4.13.	Çoklu KYD'den sonra ipsilateral kortekste cRel aktifleşiyor.	53
4.14.	Tek KYD ile cRel hemen aktifleşiyor.	55
4.15.	KYD ile aktifleşen p65'in aktif durumda olduğu hücre oranında 5 saat boyunca değişiklik olmuyor.	57
4.16.	SOX9 ve S100B ile astrositlerin tümü işaretlenmiyor.	59
4.17.	Tek KYD'den 24 saat sonra ipsilateral kortekste mikroglialar inaktif durumda izleniyor.	60
4.18.	KYD'den 24 saat sonra hem nöron dışı hücrelerde hem nöronlarda cRel aktivasyonu artıyor.	62
4.19.	KYD'den 24 saat sonra hem nöron dışı hücrelerde hem nöronlarda p65 aktivasyonu azalma eğilimi gösteriyor.	64
4.20.	KYD'den 3 saat sonra ipsilateral kortekste hücre uzantıları cRel ve p65 ile belirgin biçimde işaretleniyor.	66
4.21.	KYD'den 3 saat sonra ipsilateral kortekste işaretlenen hücre uzantıları dendritlerdir.	67
4.22.	KYD'den 3 saat sonra cRel ve p65 protein seviyelerinde değişim olmuyor.	68
4.23.	I-kappa B, KYD ile tetiklenen inflamasyonun çözülmesinde rol oynuyor olabilir.	70

- 4.24.** Yalancı cerrahiden 15 dakika, KYD'den 15 dakika ve 5 saat sonra nöronlar ve nöron dışı hücrelerde cRel, p65 ve I-kappa B'nin çekirdekte izlendiği hücrelerin oranını gösteren grafik. 73
- 4.25.** KYD'den 1 saat sonra cRel ve p65 aktifleşerek çekirdeğe göç ediyor. 74

TABLolar

Tablo		Sayfa
2.1.	Başlıca NF-kappa B transkriptleri.	11
3.1.	Çalışmalarda kullanılan önemli kimyasal malzemeler.	32
3.2.	Çalışmalarda kullanılan cihazlar.	33

1.GİRİŞ

Migren baş ağrısı toplumda oldukça sık karşılaşılan, atak sırasında hastalarda sıklıkla yeti yitimine sebep olan nörolojik bir hastalıktır (1). Günümüzde migren tedavisine yönelik birçok ilaç seçeneği bulunmaktadır. Akut tedavi halihazırda ağrı oluşmuşken veya aura varlığında ağrıyı baskılamak için kullanılırken atak sıklığı fazla olan hastalarda profilaktik tedavi yolu izlenmektedir (2). Ancak bu ilaçların her birinin kendine özgü yan etkileri ve ilaç etkileşimleri mevcuttur (2). Daha etkili ve daha az yan etkiye sahip ilaçların geliştirilebilmesi için migren patofizyolojisi daha iyi anlaşılmalıdır.

Kortikal yayılan depresyon (KYD), migren aurasının nörofizyolojik karşılığıdır (3). “KYD’nin tetiklediği, parankimal ve meningeal steril inflamatuvar yanıt sonucunda migren ağrısı oluşur” hipotezi literatürde giderek kabul görmektedir. Ancak migren ağrısını sonlandıran mekanizmalar ve ağrı süresinin kişiler ve ataklar arasında neden farklı olduğu bilinmemektedir.

KYD tarafından nöronlarda panneksin-1 kanallarının açılması üzerine inflamazom kompleksinin oluşumu, kaspaz-1 aktivasyonu ve interlökin 1 beta (IL-1 β) ve *high mobility group box 1* (HMGB1)’in saliverilmesi astrositlerde pro-inflamatuvar NF-kappa B (nükleer faktör kappa B) yolağını aktifleştiren ana olaylardır (4). Astrositlerde oluşan proinflamatuvar transkripsiyon sonucunda siklooksijenaz 2 (COX2) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) gibi enzimlerin indüklenmesi ve astrosit son ayaklarından saliverilen prostaglandinler ve nitrik oksit gibi moleküllerin pial nosiseptörleri aktifleştirmesiyle baş ağrısı duyusu algılanır (3). Migren aurası ile baş ağrısı arasında köprü görevi gören bu steril inflamasyonun çözülmesinin, migren baş ağrısının kendiliğinden sonlanmasında etkili olabileceği tez çalışmamızın temel hipotezidir. Literatürde KYD ve benzeri geçici düzensizliklerin beyinde tetiklediği nöroinflamasyonun çözülmesine/sonlandırılmasına ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır.

NF-kappa B transkripsiyon faktörü ailesi beş farklı alt birimin (p65, p50, cRel, RelB, p52) ikililer halinde bir araya gelmesiyle etkinlik gösterir (5). İçerdiği alt birim ikilisine göre NF-kappaB pro-inflamatuvar (örn. p65/p50) veya anti-inflamatuvar (örn. p50/p50) etki gösterebilir. KYD ile tetiklenen inflamasyonda pro-inflamatuvar alt birimi p65'in etkin olduğu daha önce laboratuvarımızda gösterilmiştir (4). KYD sonrasında aktif ikili profilinin zaman içinde değişerek inflamasyonu başlatan nitelikten baskılayan niteliğe (örneğin p65/p50'den cRel/p50'ye) geçiş yapabileceği ve bunun nöroinflamasyonu söndürebileceğini düşünüyoruz. Ayrıca, inhibitör kappa B'nin inflamatuvar uyarı sonrasında NF-kappa B ikililerinden ayrılarak yıkıldıktan bir süre sonra yeniden sentez edilmesi sonucu çekirdeğe geçerek ikililere bağlanması, inflamasyonun çözülmesinde etkili bir diğer mekanizma olabilir.

NF-kappa B sistemi üzerinde etkili olan HMGB1'in KYD ile nöronal çekirdeklerden salıverildikten sonra nöronlar tarafından geri alınabileceği; bununla beraber nöronlarda kaspaz-1 aktivitesinin zamanla azalarak bu enzimin ürünü olan Il-1 β gibi inflamatuvar moleküllerin salıverilmesinin beraberinde azalacağı; bu iki farklı mekanizmanın astrositlerde pro-inflamatuvar NF-kappa B yolağı üzerindeki uyarıyı azaltmasıyla inflamasyonun çözülmesine katkıda bulunacağı da düşünülebilir. Çalışmamızda KYD'nin tetiklediği nöroinflamatuvar cevabı baskılayabilecek bu olasılıklar fare beyninde araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Migren Baş Ağrısı ve Kortikal Yayılan Depresyon ile İlişkisi

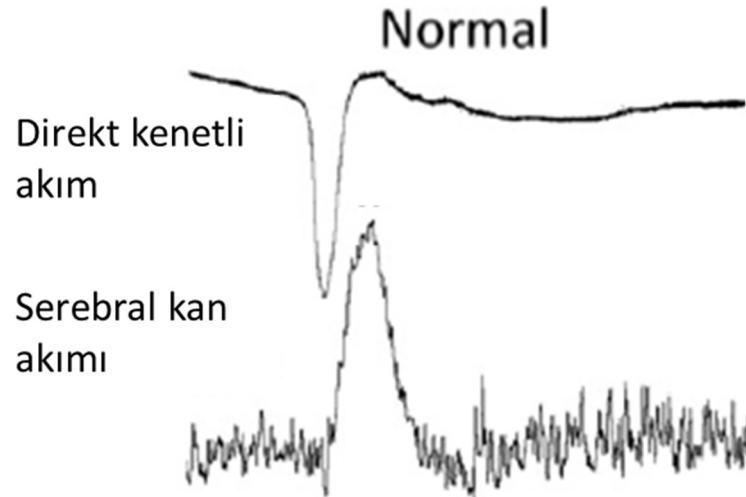
Migren, hastalar tarafından şiddetli baş ağrısı olarak nitelendirilen, ataklar halinde gerçekleşen, ağrıyla beraber çoğunlukla ışık ve sese karşı hassasiyet, mide bulantısı gibi semptomları olan nörolojik bir hastalıktır. 18-65 yaş arası erişkinlerin yarısı ila dörtte üçünde en az yılda bir kez baş ağrısı görülür ve bu kişilerin %30'undan fazlasında baş ağrısının sebebi migrendir (1). Migren aynı zamanda dünyada yeti yitimiyle yaşanan yıllar (*years lived with disability*) sıralamasında 15-49 yaş arası bireylerde ikinci sıradadır (6).

Migren hastalarının üçte birinde baş ağrısından önce "aura" olarak tanımlanan ve en sık görsel olmakla birlikte diğer duyular veya konuşma gibi farklı fonksiyonlarda da bozulmaya yol açan geçici nörolojik semptomlar mevcuttur (1). Bu semptomlar genellikle 20-30 dakika sürer, sonlanır ve 20-60 dakika sonrasında ağrı başlar (7). En sık karşılaşılan görsel migren aurası, zigzaglar halinde yayılan, konveks kenarlı, görme alanında kayba neden olan ışık çakmaları (sintilasyon skotomu) olarak tanımlanır (1).

KYD, beynin korteksinde bir odak noktasından başlayarak dakikada 4-6 mm hızda ilerleyen, nöronların ve glial hücrelerin önce depolarizasyonuna daha sonra uzun süreli baskılanmasına yol açan elektrofizyolojik bir olaydır (8). Hücrelerin aktivasyon ve baskılanmalarına ikincil olarak KYD'nin geçtiği parankimde bölgesel kan akımında önce artış, devamında uzun süreli azalma görülür (Şekil 2.1., (9)). KYD migren aurasının nörofizyolojik karşılığı olarak kabul etmektedir; bununla birlikte kafa travması, inme, subaraknoid kanama (SAK) gibi olaylara da eşlik eder (10).

Hastalarla yapılan pek çok çalışma, KYD ile migren aurası arasındaki ilişkiyi farklı yöntemlerle ortaya koymuştur. Örneğin, görsel migren aurası sırasında oluşan skotom alanının görme korteksi üzerine yansıtılmış hali (11) incelendiğinde yayılma şekli ve hızı açısından KYD ile uyumluluk gösterdiği görülmektedir (12). Onlarca yıl öncesinde dahi migren atağı sırasında hastaların beyinlerinde bölgesel kan akımının önce hiperemik, sonrasında oligemik olduğu ve bu oligeminin yayıldığı sırasıyla tek

foton emisyonu bilgisayarlı tomografi (SPECT) ve pozitron emisyon tomografi (PET) ile gösterilmiştir (13, 14). Yakın dönemde ise hem perfüzyon manyetik rezonans görüntüleme (MRG) hem de kan oksijenlenme seviyesine bağlı MRG sekanslarıyla yapılan fonksiyonel incelemeler, KYD'nin neden olduğu kan akımı değişikliklerinin ve bu değişikliklerin yayılma hızının hayvan modelleriyle örtüştüğüne işaret etmektedir (15, 16). Aynı zamanda spontan migren aurası sırasında manyetoensefalografi ile alan ölçümleri yapan bir çalışmada, kemirgen modellerindeki elektrokortikografik (ECoG) dalgalarda gözlemlenene benzer biçimde direkt akımda bir kayma (Şekil 2.1) saptanmıştır (17). Elektroensefalografik incelemelerin kapasitesi ve saptayabildiği en küçük elektriksel değişikliğin düşük olması sebebiyle migren aurası sırasında rutin EEG ile değişiklik güvenilir bir biçimde henüz gösterilememiştir. Ancak, SAK hastalarından ameliyathane ortamında yerleştirilen elektrotlar yardımıyla alınan ECoG kayıtlarında KYD dalgasının insan beyinde de olduğu elektriksel olarak da gösterilmiştir (18). Bu kanıtların tümü KYD'nin migren aurasının elektrofizyolojik karşılığı olduğunu kanıtlar niteliktedir.



Şekil 2.1. Kortikal yayılan depresyon sırasında görülen serebral kan akımı ve ECoG değişiklikleri. Kortikal yayılan depresyon dalgası direkt kenetli (DC) akımdaki ani negatif kaymayla izlenebilir. Bu kayma, bir grup nörondaki anlık deşarjın göstergesidir. Bu deşarjla uyumlu olarak bölgesel kan akımında bir artış görülür. KYD'nin incelenen nöron grubu üzerinden diğer bölgelere yayılmasıyla bu bölgedeki değişiklikler başlangıç seviyesine döner (9).

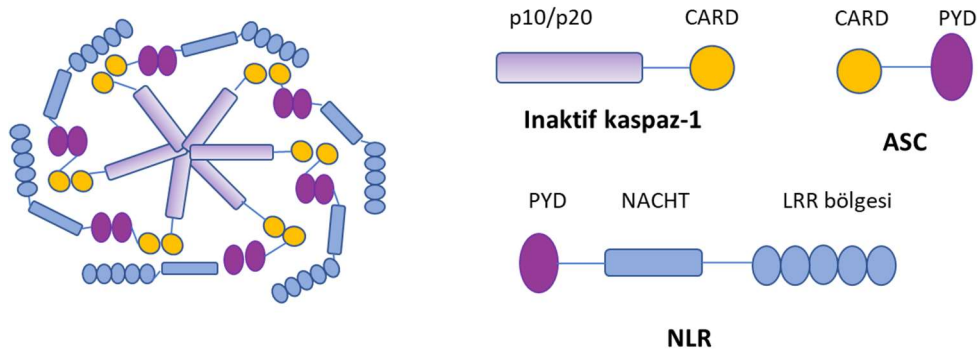
2.2. Migren Baş Ağrısı Patofizyolojisinde Kortikal Yayılan Depresyonla Tetiklenen İnflamasyonun Yeri

Beyin parankimi ağrıya duyarsız olup baş ağrısının algılanabilmesi için meninksler ve meningeal damarların etrafındaki nosiseptörlerin; devamında trigeminal sinir ve trigeminoservikal kompleksin uyarılmasıyla nosiseptif uyarıların üst merkezlere gönderilmesi gerekir (19). Trigeminal sinir uçlarının aktivasyonu meningeal nörojenik inflamasyonu başlatır (20). Bu inflamasyonun en belirgin göstergeleri; ilgili bölgede meningeal hiperemi, plazma ekstrasvazasyonu, inflamatuvar moleküllerin salınması, duradaki mast hücrelerinin degranülasyonu olarak sayılabilir (20). “Trigeminal sinir uçlarındaki inflamasyon beyin içinde kortikal yayılan depresyon gibi nosiseptif bir uyarı sonucunda başlar” hipotezi giderek artan oranda kabul görmektedir (21).

KYD'nin parankimde ve meninkslerde steril bir inflamasyon tetiklediği; bu inflamasyonun ağrının sebebi olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Deneysel çalışmalarda çoklu KYD sonrasında mikrodizileme veya sekanslama yöntemleriyle belli genlerin mRNA düzeylerini inceleyen birkaç çalışmada, inflamasyon ve immün sistemle ilişkili genlerin mRNA düzeylerinde artış bulunmuştur (22-24). Yapılan hayvan çalışmalarında KYD başlangıcından 20 dakika sonra meningeal hiperemi ve plazma ekstrasvazasyonu gözlenmiştir; aradaki bu 20 dakikalık fark hastalarda migren aurası ile ağrı başlangıcı arasında geçen süreye uymaktadır (25). Benzer biçimde deney hayvanlarında, KYD sonrasında trigeminal sinirin içinde ağrı duyusunu taşıyan C liflerinin aktivitesinin 2 kat arttığı gösterilmiştir (26). Atak önleyici tedavide kullanılan valproat, topiramet, amitriptilin gibi ilaçların bir aydan fazla kullanımı ile KYD görülme sıklığı azalmış ve KYD eşiği yükselmiştir (27).

Karataş ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada tek KYD ile nöronlardaki panneksin-1 kanallarının açılmasıyla inflamazom kompleksinin oluştuğu gösterilmiştir (4). İnflamazom kompleksi nod benzeri reseptör (*NLR*) ve adaptör protein ASC'nin (*apoptosis associated speck-like protein containing a CARD*) oluşturduğu iskelete çok sayıda pro-kaspaz-1 enziminin bağlanmasıyla oluşur (28). Aktif inflamazomun pro-

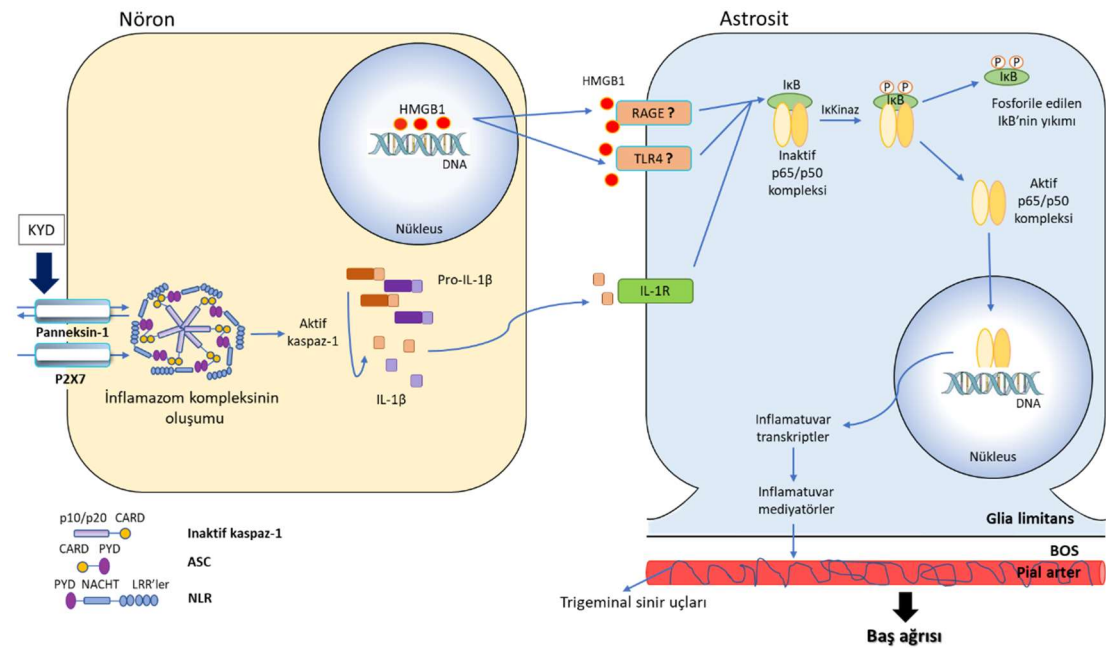
kaspaz- 1'i dimerize olduktan sonra kesmesiyle aktif kaspaz-1 oluşur (Şekil 2.2). KYD ile nöron çekirdeklerinden HMGB1 ve sitoplazmasından aktif kaspaz-1 aracılığıyla aktifleşen IL-1 β 'nın salıverildiği bahsedilen çalışmada gösterilen diğer önemli bulgulardandır (4). Salınan bu moleküllerin astrositlerde pro-inflamatuvar klasik NF-kappa B yolağını aktifleştirdiği; böylece COX2, iNOS gibi inflamatuvar enzimlerin indüklendiği gösterilmiştir. Nihayetinde, meningeal hiperemi ve mast hücre degranülasyonunun tespitiyle meningeal inflamasyonun parankimal inflamasyonu izlediği ortaya konmuştur (Şekil 2.3).



Şekil 2.2 İnflamazom kompleksinin yapısı. Solda kompleks halinde gösterilen inflamazom yapısında inflamatuvar uyarıyı algılayan *nod like receptor* (NLR), inflamatuvar moleküllerin aktifleşmesi için gerekli olan enzim kaspaz-1 ve bu ikisi arasındaki aracı molekül *apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD* (ASC)'yi içerir. NLR, ASC ile ortak pyrin (PYD) bölgeleri üzerinden; kaspaz-1 ise ASC ile ortak *caspase activation and recruitment domain* (CARD) bölgeleri üzerinden etkileşir. Farklı koşullarda, farklı NLR proteinlerine göre farklı inflamazomlar oluşur. (Zeynep Kaya tarafından çizilmiştir.)

Yapılan bir diğer çalışmada ise, P_{2X7} pürinerjik kanallarına antagonist ilaç varlığında, çoklu KYD sonrasında kortekste artan IL-1 β mRNA düzeyinin ve COX2 düzeyinin kontrol düzeyine gerilediği, benzer biçimde trigeminal gangliyonda kontrollere göre kalsitonin geniyle ilişkili peptit seviyesinin ve c-Fos pozitif nöron sayısının azaldığı gösterilmiştir (29). Her iki çalışmada da KYD sonrasında parankimal inflamasyonun tetiklenmesi çeşitli inhibitörlerle engellendiğinde meningeal

inflamasyonun oluşmadığı gösterilerek birbirini izleyen bu olayların meningeal inflamasyonun oluşumundaki kritik önemi kanıtlanmıştır.



Şekil 2.3. KYD ile nöronlarda tetiklenen inflamasyonu astrozitlerde ve meninklerde oluşan inflamasyon izler. Detaylı bilgi için lütfen metne bakınız. (Zeynep Kaya tarafından çizilmiştir.)

Yakın zamanda auralı migren hastaları ve kontroller üzerinde yapılan bir çalışmada katılımcılara [^{11}C] PBR28 enjekte edildikten sonra PET/MRG yapılmıştır (30). Bu madde nöroinflamasyon sırasında glial hücreler tarafından alınmaktadır. Auralı migren hastalarında atak sonrası 15 gün içerisinde yapılan çekimde bu maddenin alımında görülen artış, migren baş ağrısının patofizyolosinde inflamasyonun rolünü destekleyen bulgulara katkıda bulunmaktadır (30).

2.3. İnflamasyonun Çözülmesi

İnflamasyon, organizmanın her türlü enfeksiyöz veya steril hücre hasarına karşı verdiği yanıttır. İnflamasyonun amacı doku homeostazını korumaktır. Herhangi bir sebepten başlayan inflamasyonun erken dönemde amacı, inflamatuvar hücreler ve moleküller yardımıyla söz konusu bölgenin sağ kalımını sağlamaktır (31). Ancak

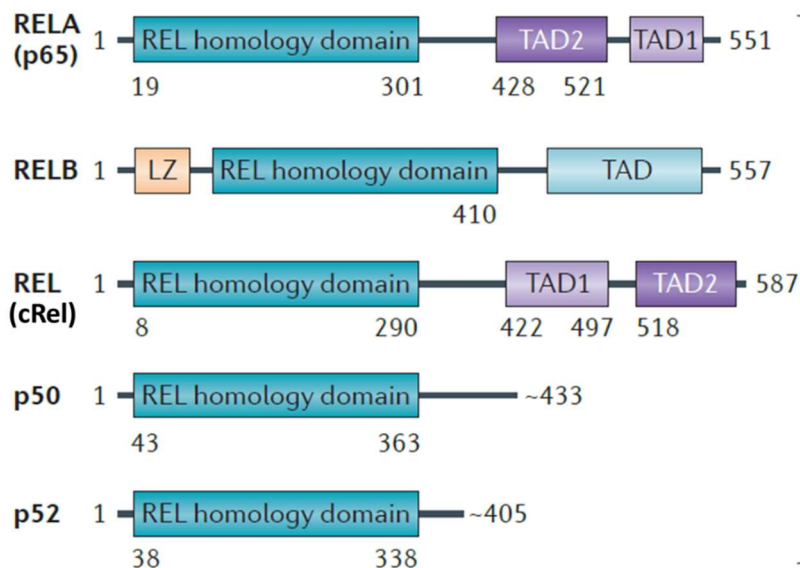
inflamatuvar sürecin kendisinin dokuya zarar vermemesi için birçok farklı mekanizmayla yönetilmesi önemlidir. İnflamasyonun sonlandırılması ve homeostatik duruma geçiş için yürütülen aktif ve oldukça düzenli sürece inflamasyonun çözülmesi adı verilir (32). Bu süreçte varsa dokuyu infiltre eden inflamatuvar hücreler o bölgeden uzaklaşarak, apoptoz yardımıyla kendini imha ederek veya inaktif forma dönerek çözülme sürecini başlatır (31). Aynı zamanda salınan pro-inflamatuvar moleküller (örn. IL-1 β) yerini anti-inflamatuvar moleküllere (örn. IL-10) bırakır. İnflamasyonun çözülmesi bazı durumlarda inflamasyonu takip ederken bazı durumlarda inflamasyonla eş zamanlı başlamaktadır. İnflamasyon çözülmesinin gerçekleşmediği durumlarda kronik inflamatuvar hastalıklar görülebilir (31).

Bir migren atağının süresi genellikle 4-72 saattir (1). Atak süresinin/sıklığının kişiler arasında veya aynı kişide farklı ataklarda neden farklı olduğu ve ağrıyı sonlandıran mekanizmalar bilinmemektedir. KYD ile tetiklenen steril inflamasyonun baş ağrısını başlatabileceğinin kanıtları göz önüne alındığında, bu inflamasyonun çözülmesinin medikal destek olmadan, ağrıyı kendiliğinden sonlandırabileceği ve atak süresindeki farklılıkları açıklayabileceği düşünülmektedir (33). Beyinde patolojik inflamasyonun çözülmesi sırasında inflamasyonu baskılayan moleküllerin aktif olduğu gösterilse de literatürde bu konuda migren baş ağrısı veya KYD'ye özgül bir çalışma bulunmamaktadır (34, 35).

2.4. Nükleer Faktör-Kappa B Ailesi

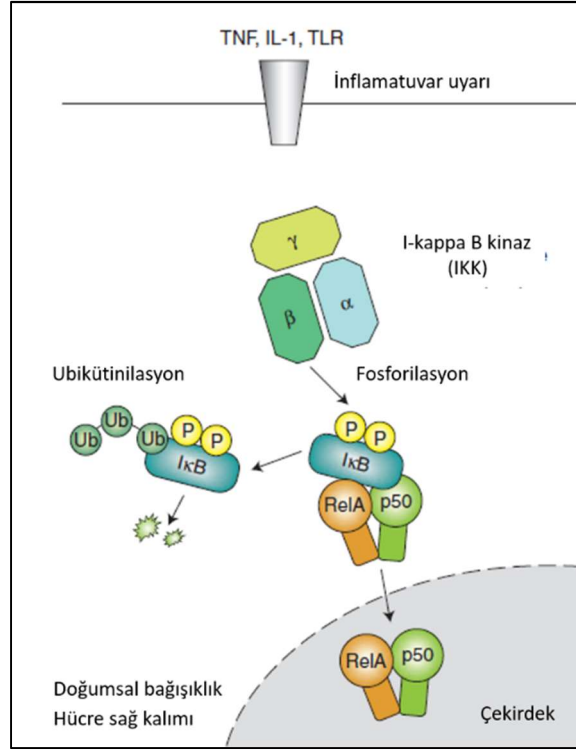
İnflamasyonun oluşma ve çözülme evrelerinde birçok farklı molekül rol oynamaktadır. Anahtar moleküllerden biri nükleer faktör-kappa B (NF-kappa B) ailesidir. NF-kappa B transkripsiyon faktörü ailesi beş alt birimin ikililer halinde bir araya gelmesiyle faaliyet gösterir (5). Bu alt birimler p65 (RelA), cRel (Rel), RelB, p52 (p100) ve p50 (p105)'dir (Şekil 2.4.). Her alt birim yapısında Rel homoloji bölgesi olarak adlandırılan bir bölge bulundurur (5). Bu bölge alt birimin ikili oluşturmasını, hücre çekirdeğine girmesini ve DNA'ya bağlanmasını sağlayan aminoasit dizilerini içeren bölgedir. Transaktivasyon bölgesi; transkripsiyonu başlatan bölgedir ve sadece p65, cRel ve RelB alt birimlerinde bulunur. Bu nedenle bu alt birimlerden birini

içermeyen ikililer (örn. p50/p50) DNA'ya bağlandığında transkripsiyonu başlatmak yerine diğer transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerini düzenler (5).



Şekil 2.4. Nükleer faktör kappa B transkripsiyon faktörü ailesi alt birimleri. NF-kappa B ailesinin beş farklı alt birimi vardır. Her alt birim yapısında ikili oluşturmasını, hücre çekirdeğine girmesini ve DNA'ya bağlanmasını sağlayan aminoasit dizilerini içeren Rel homoloji bölgesi bulundurur. Transaktivasyon bölgesi (TAD) ise transkripsiyonu başlatan bölgedir ve sadece p65, cRel ve RelB alt birimlerinde bulunur. Bu nedenle bu alt birimlerden birini içermeyen ikililer DNA'ya bağlandığında yalnızca diğer transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerini düzenler (5).

Inhibitör kappa B (I-kappa B), ikililerin Rel homoloji bölgesini (dolayısıyla nükleer konumlanma sinyalini) fiziksel olarak kapatır, böylece ikililer çekirdek içine giremez (36). İnflamatuvar bir uyarı sonucunda I-kappa B, I-kappa B kinaz ile fosforile olarak yıkılır ve ikililer serbestleşerek çekirdeğe geçer. NF-kappa B ailesi klasik ve klasik olmayan yolak olmak üzere iki yolak üzerinden aktivite gösterir. Klasik yolak, doğuştan bağışıklık ve hücre sağkalımında rol oynarken klasik olmayan yolak, kazanılmış bağışıklık süreçlerinin gerçekleşmesinde etkilidir. KYD ile indüklenen inflamasyon gibi steril, doğuştan immün yanıt oluşturan durumlarda klasik yolak aktifleşir. Bu yolakta etkili alt birimler p65, p50 ve cRel'dir (Şekil 2.5.) (36) .



Şekil 2.5. Klasik NF-kappa B yolağının aktivasyonu. TNF- α , IL-1 β gibi inflamatuvar bir uyarı sonucunda I-kappa B, I-kappa B kinaz ile fosforile olur. Fosforile olan I-kappa B ubikütilenerek yıkılır. Serbest kalan ikililer (burada temsilen p65/p50 ikilisi gösterilmiştir) çekirdeğe göç ederek transkripsiyonel aktivitelerini başlatır (37).

Literatürde NF-kappa B ikilisinin içerdiği alt birimlere göre pro-inflamatuvar veya anti-inflamatuvar nitelikte olabileceği gösterilmiştir (33, 38). Çeşitli hastalık modellerinde NF-kappa B'nin etkili olduğu zamana göre inflamasyonu artırdığı veya azalttığı bilinmektedir (37). p65/p50 ikilisi ana proinflamatuvar ikili olarak kabul görmekteyken; p50/cRel, p65/cRel, veya p50/p50 ikilileri çözülme fazında etkili olduğu kabul edilmektedir (37).

NF-kappa B ailesi tüm hücre tiplerinde aktiftir. Bu nedenle birçok farklı molekülle uyarılabildikleri gibi oldukça fazla sayıda transkriptleri de mevcuttur (Tablo 2.1.). NF-kappa B'nin geribildirim döngüleriyle I-kappa B ve p105 (İnhibitör proteinlerden birisidir ve p50, p105'in belli bir aminoasitinden kesilmesiyle oluşur) gibi düzenleyicilerin sentezini artırması sistemin kontrol altında kalmasını sağlayan önemli etmenlerdendir. p65 ve cRel'in aktifleşmelerinin nihai sonucunun farklı

olduğu vurgulansa da transkripsiyonunu indüklediği ortak genler mevcuttur (cRel-spesifik transkriptler için (39) ve (40) numaralı referanslara bakınız). Başlıca NF-kappa B transkriptlerinin listesi Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Başlıca NF-kappa B transkriptleri.

Grup	Örnek genler
İmmün sistem bileşenleri (sitokin, kemokin ve düzenleyicileri; reseptörler; antijen sunumu; immün hücre olgunlaşması)	IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-1 reseptör antagonisti, TNF- β , CXCR, MHC-I
Hücre adezyon molekülleri, hücre yüzey molekülleri	CD44, ICAM-I, erbB2, mGlu2, NR-1, RAGE
Akut faz proteinleri, erken yanıt genleri	CRP, doku faktörü, p62
Stres cevap genleri	COX-2, 12-LOX, SOD1
Apoptoz düzenleyici genler	Bax, bcl-xL, bcl-2, bim, CD95
Büyüme faktörleri	BDNF, NGF, NK-1R
Transkripsiyon faktörleri	p65, cRel, relB, c-myc, I-kappa B- α , I-kappa B- ϵ , p53
Enzimler	PKA, PKC, iNOS, nNOS, MMP9

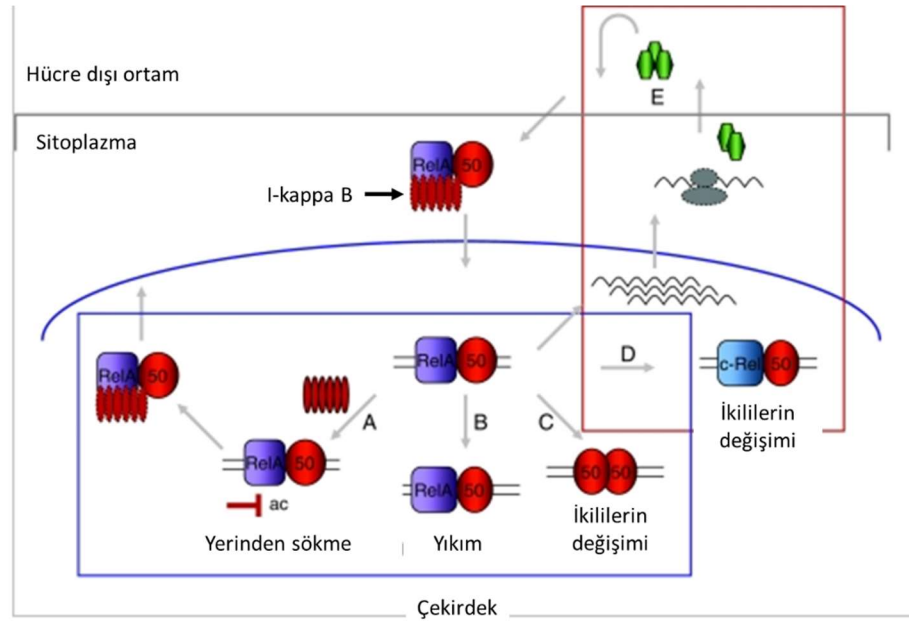
Tüm transkriptlerin listesine <https://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/> adresinden ulaşılabilir.

Makrofaj kültüründe lipopolisakkarid (LPS) uyarısı sonrasında p65/cRel ikilisinin etkinliğinin inflamasyonun çözülmesinde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (41). Aynı çalışmada p65/cRel ikilisinin p65/p50 ikilisinin etkinliği sonrasında aktifleştigiğine vurgu yapılmıştır. *In vivo* ve *in vitro* (nöron kültürü) inme modellerinde p65/cRel ve p50/p50 ikililerinin nöron koruyucu nitelikte olduğu ve sağ kalımı artırdığı aşırı gen ifadesi ve ifade baskılanması yöntemleriyle gösterilmiştir (42). Benzer bir şekilde farede deneysel inme modeli sırasında dışarıdan verilen leptinin sağladığı nöron koruyucu etkinin cRel içeren ikililer üzerinden olduğu, cRel (-/-) transgenik fareler kullanılarak kanıtlanmıştır (43). Astrosit kültürlerinde yapılan bir çalışmada

mGluR3 agonistinin nitrik oksitini sebep olduğu astrosit ölümünü p65/cRel ikilisi ile engellediği gösterilmiştir (44).

Lewy cisimcikli demans hastalarının beyin dokularından yapılan bir ölüm ardı çalışmada substantia nigra pars kompaktada p50 protein seviyesinde azalma görülmüş ve özellikle p50/p50 ikilisinin nörodejenerasyon karşısındaki koruyucu özelliği vurgulanmıştır (45). p50 (-/-) farede yapılan farklı bir çalışmada ise periferik LPS uyarısına karşılık beyinde TNF- α ve IL-1 β seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu, kontrol grubunda uyarıdan bir hafta sonra bu sitokinlerin değerlerinin bazal seviyeye dönmesine rağmen deney grubunda hala yüksek olduğu gösterilmiştir (46). Bu beyinlerde mikrogliaların inflamasyon çözülmesinde görev alan M2 formuna geçemedikleri ve hala pro-inflamatuvar M1 formu belirteçlerini yüksek oranda ifade ettikleri görülmüştür (46). Hem sitokin değerlerinin yüksek olması hem de mikrogliaların pro inflamatuvar formda kalması p50 eksikliğinin beyinde bazal pro-inflamatuvar bir duruma neden olduğunu göstermektedir.

NF-kappa B'nin birbirine zıt etkideki transkriptlerinin hücredeki nihai etkisinin belirlenmesinde görev alan mekanizmalar özetlenirse; çekirdekte p65/p50 tarafından başlatılmış inflamatuvar moleküllerin transkripsiyonu post-translasyonel modifikasyonlar sonucu p65'in çekirdek içinde yıkımıyla veya aynı körükleyici (*promoter*) üzerinde p65/p50 ikilisinin p50/p50 ikilisiyle yer değiştirmesi sonucu son bulabilir (47, 48). Aynı zamanda cRel içeren ikililer eş zamanlı olarak zıt özellikteki transkriptlerin oluşumunu sağlayabilir. Son olarak inflamatuvar uyarıyla yıkılan I-kappa B proteinleri aktif alt birimler tarafından yeniden sentezlendikten sonra çekirdeğe girerek DNA'ya bağlı durumdaki p65/p50 ikilisine bağlanıp ikilinin konumunu tekrar sitoplazmayla sınırlandırabilir (Şekil 2.6.) (47, 48).



Şekil 2.6. NF-kappa B'nin aktivasyon süresini düzenleyen mekanizmalar. Mavi çerçeveye gösterilen mekanizmalar p50/p50 ikilisinin etkinliğini azaltan mekanizmaları işaret etmektedir. Ayrıntılı bilgi için lütfen metne bakınız (47).

Karataş ve ark.'nın (4) KYD ile parankimal ve meningeal inflamasyonun arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmasının bulgularından yola çıkarak KYD ile tetiklenen inflamasyonun çözülmesinde farklı NF-kappa B ikilileri arasındaki dengenin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu ikililerin aktivitesinden erken aşamalarda sorumlu olan I-kappa B'nin de baskın ikilinin değişiminde etkisi olduğu sanılmaktadır.

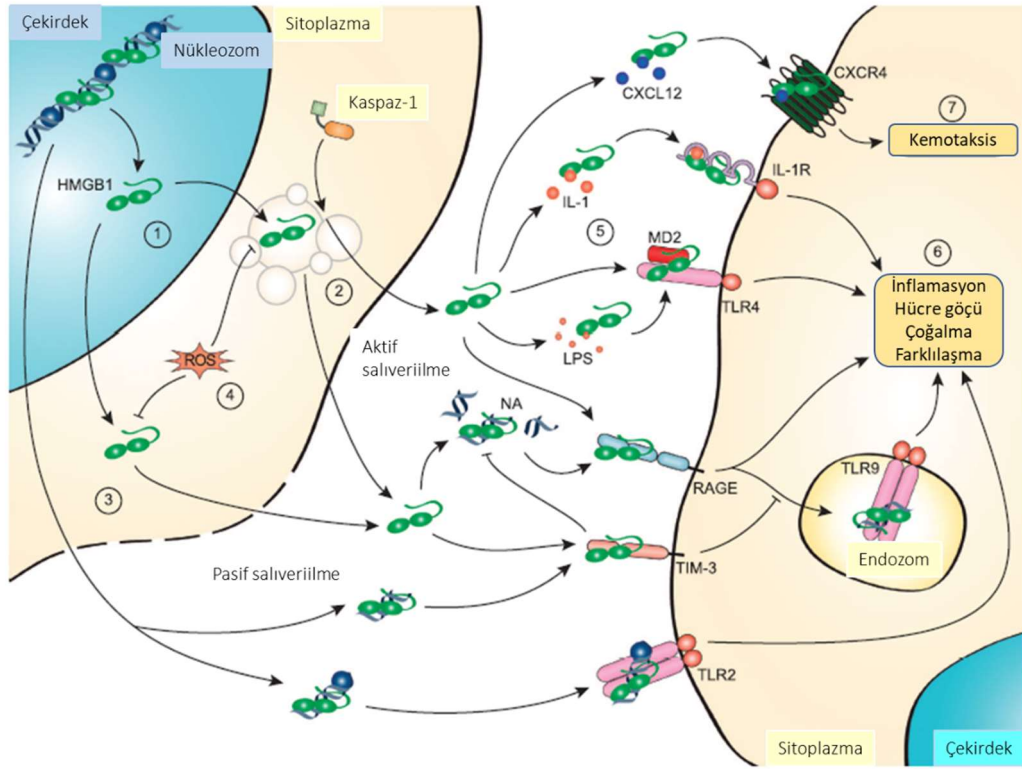
2.5. HMGB1

Biyolojik olarak aktif olup saliverilmesinin üzerine hızlı bir inflamatuvar yanıt başlatan, endojen tehlike-ilişkili moleküler kalıplar (*danger associated molecular patterns-DAMPs*) olarak da adlandırılan proteinlere literatürde "alarmin" proteinleri adı verilmektedir (49). Alarmin proteinleri dokudaki stres durumunu işaret eder.

HMGB1, hücre çekirdeğinde DNA'ya bağlanan histon dışı proteinlerden biridir ve HMGB proteinlerinden (HMGB1-4) olup vücuttaki tüm hücreler tarafından yüksek miktarda üretilir (50). Sekans-bağımlı olmaksızın DNA'ya bağlanarak kromozom stabilizasyonu ve nükleozom hareketliliği, DNA onarımı ve transkripsiyon kontrolünde rol oynar (50).

Dinlenme koşullarında HMGB1 hücre çekirdeğinde DNA'ya bağlı durumdayken, farklı amino asitlerinden asetilasyonu, fosforilasyonu veya metilasyonu sonucu üç boyutlu yapısı değişir (51). Bu yapı değişikliği nükleer dışı atım sinyalinin açığa çıkmasını sağlar ve HMGB1'in saliverilmesine yol açar. HMGB1 nekrotik veya hasar görmüş hücrelerden pasif olarak saliverilmekle beraber inflamatuvar bir uyarı sonrasında aktif olarak hücre dışına saliverilebilir (51). Yönlendirici sekansı olmaması nedeniyle HMGB1, endoplazmik retikulum-golgi-bağımlı yol yerine klasik olmayan veziküler yolla hücre dışına atılır (52).

Beyindeki alarmin proteinlerinden biri olan HMGB1, hücre dışına saliverilmesi üzerine komşu hücreler üzerindeki başlıca ileri glikasyon son ürünleri (RAGE) ve farklı *toll like receptor'lere* (TLR, sıklıkla TLR4) bağlanarak bu hücrelerde immün yanıt oluşturur (Şekil 2.7., (51)). Merkezi sinir sistemindeki (MSS) tüm hücrelerde değişen oranlarda RAGE ve farklı TLR'lerin varlığı gösterilmiştir (53, 54). Fare beyinde KYD sonrasında nöronlardan HMGB1'in salınması ve salınan HMGB1'in astrositlerde ve büyük olasılıkla mikroglialarda inflamasyonu tetiklemesi bunun örneklerinden biridir (4). HMGB1'in birçok farklı hastalıkta rolü bulunmaktadır (54). Örneğin endotoksemide hem kanda hem de etkilenen organlarda HMGB1 miktarının arttığı gösterilmiştir (55). Bununla beraber MSS travması veya serebrovasküler iskemi gibi hücre ölümünün gerçekleştiği durumlarda HMGB1'in beyin omurilik sıvısına (BOS) ve kana geçtiği gösterilmiştir (56). İnflamasyonun etkili olduğu nörodejeneratif hastalıklarda veya epilepside de benzer biçimde HMGB1'in patofizyolojiye katkısı olduğu ortaya konmuştur (54).



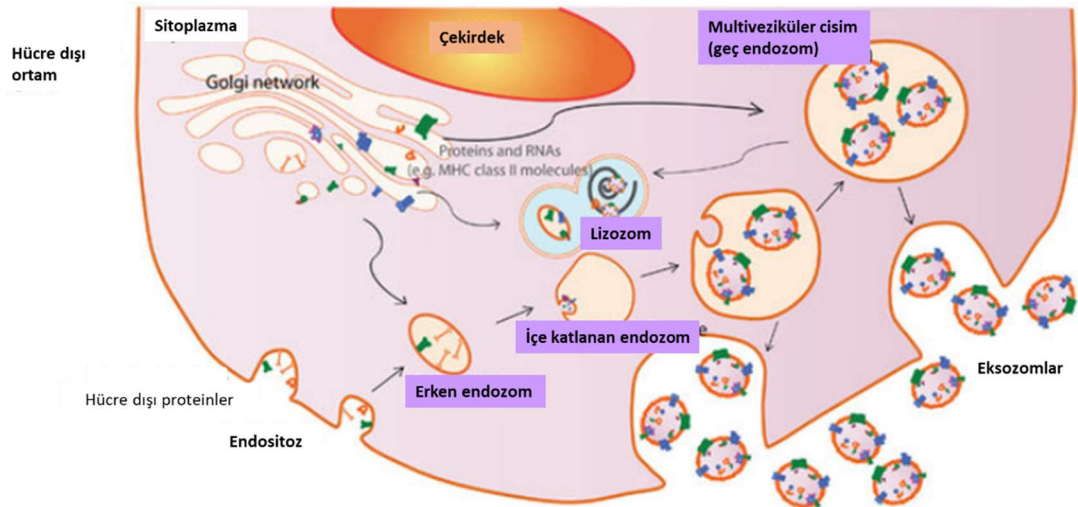
Şekil 2.7. HMGB1'in saliverilme mekanizmaları ve bağlandığı reseptörler. HMGB1 inflamatuvar bir uyarım sonucunda aktif olarak hücre dışına saliverilmesinin (2) yanında nekrotik veya hasar görmüş hücrelerden pasif olarak saliverilebilir (3). Hücre dışı alanda HMGB1 serbest olarak veya DNA, IL-1 gibi farklı moleküllere bağlı biçimde reseptörlerle etkileşebilir. Etkileşme sonrasında hücre içinde belli sinyal yollarını tetikleyebileceği gibi TLR9 aracılı olarak endozomlar aracılığıyla hücre içine alınabilir. HMGB1, etkileşim içinde olduğu reseptörlere göre inflamasyon, hücre göçü veya farklılaşması gibi fonksiyonları gerçekleştirebilir (51).

2.6. Eksozomlar ve KYD ile İlişkisi

Eksozomlar boyutları 30-100 nm arasında değişen hücre dışı veziküllerdir (57). Erken endozomlar hücre membranlarının içeriye doğru kıvrılmasıyla olgunlaşarak içinde birçok veziküle sahip multiveziküler cisim (geç endozom) ismini alır. Multiveziküler cismin hücre membranıyla birleşmesi sonucunda bu veziküller saliverilir (57, 58). Bu nedenle eksozomlar, diğer hücre dışı veziküllerden farklı olarak çift katlı lipit membrana sahiptir (Şekil 2.8.). Oluşum biçimleri nedeniyle eksozomların içinde sitoplazma, hücre membranı veya endozomal kompartmanlara ait moleküller bulunur (57). Bu moleküller iskelet proteinlerinden miRNA'lara kadar değişkenlik

gösterebilir. Aynı zamanda eksozomlar, yüzeylerinde saliverildikleri ve hedef hücreye dair özgül moleküllerle beraber saliverildikleri koşulları işaret eden moleküller taşımaktadır (57). Bu durum hem kargo moleküllerin hedefe yönelik biçimde taşınmasını hem de vücut sıvılarından elde edilen eksozomların hastalık biyobelirteci olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Eksozomlar bazı hücrelerde sürekli saliverilmekle beraber çeşitli fizyolojik veya patolojik uyarılar sonucunda saliverilmeleri tetiklenebilir veya eksozomların içeriği değişebilir (57, 58).

Eksozomların farklı sistemlerde antijen sunumu, anjiyogenez, programlanmış hücre ölümü veya inflamasyondaki rollerine yönelik kanıt sunulmuştur (57). Eksozomların çift katlı lipitle korunuyor olmaları vücutta parçalanmadan veya yapısal değişikliğe uğramadan uzak mesafeleri kat edebilmelerini sağlamakta, bu nedenle hücreler arası iletişimde eksozomları önemli bir noktaya taşımaktadır (57, 58). Vücutta hemen hemen her hücreden saliverilen eksozomların tayini tüm vücut sıvılarında/dokularda yapılabilir (57, 58).



Şekil 2.8. Eksozomların üretilme ve saliverilme mekanizmaları. Eksozomlar endositoz yoluyla hücre içine alınan veya sitoplazma içinde üretilen moleküllerin, erken endozom-geç endozom (multiveziküler cisim) yolağında çift katlı membranın içine alınması ile oluşurlar. Multiveziküler cismin hücre membranıyla birleşmesi sonucu saliverilme gerçekleşir. Eksozomların çoğu hücrede saliverilmeleri sürekli olabileceği gibi, bir uyarı sonucunda da olabilir (59).

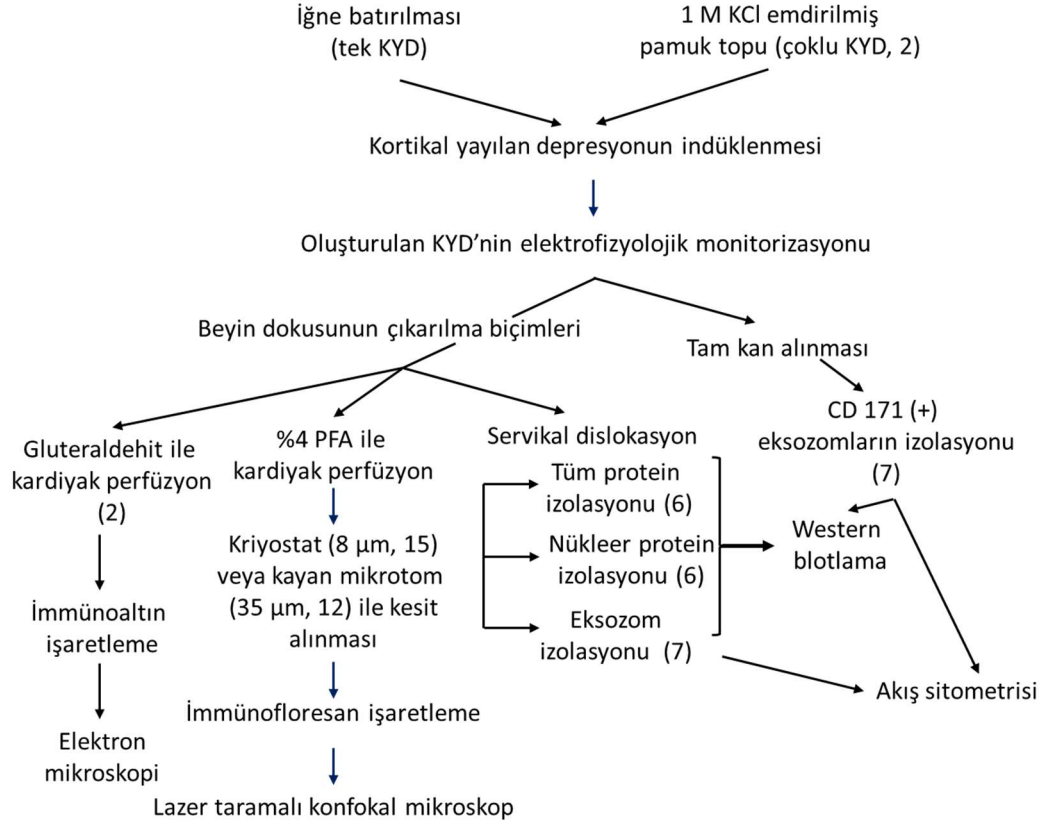
Faure ve ark. tarafından primer nöron kültürüyle yapılan çalışmada ilk kez nöron ve astrositlerin eksozom saliverdiği gösterilmiştir (60). Günümüzde ise MSS'de

çoğu hücre tipinin eksozom salıverdiği bilinmektedir (58, 61). Eksozomların MSS'de fizyolojik ve patolojik durumlardaki işlevlerini örnekleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Erişkin nöron kültüründe yapılan bir çalışmada nöronlardan salınan eksozomların AMPA reseptörü alt birimlerini içerdiği ve saliverilmesinin depolarizasyonla indüklendiği gösterilmiştir (62). İnsan glioblastoma doku örneklerinde yapılan farklı bir çalışmada glioblastomlu hastaların serumlarından ve doku örneklerinden ayrıştırılan eksozomların gliomların klinik belirtici olarak sayılan EGFRVIII mRNA'sını içerdikleri gösterilmiş ve tanı sürecinde kullanılabileceklerinin üzerinde durulmuştur (63). Farklı hücre hatlarıyla yapılan hücre kültürü çalışmalarında eksozomların Alzheimer, Parkinson ve Creutzfeld-Jacob hastalığı gibi nörodejeneratif ve enfeksiyöz hastalıkların patogenezinde yer alan sırasıyla; amiloid beta, alfa-sinüklein ve prion proteinleri gibi birçok proteini içerdiği de elde edilen diğer bulgular arasındadır (64-66). Bu proteinlerin buldukları hücrede inflamatuvar yolları tetikledikleri uzun zamandır bilinmektedir (67).

Travmatik beyin hasarı ve spinal kord hasarı olan hastaların BOS'larından ayrıştırılan eksozomların kaspaz-1, NLRP-1 inflamazomu ve ASC içerdikleri ve bu inflamatuvar belirteçlerin miktarının hastanın prognozuyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (68). Eksozomların migren veya KYD ile ilgisine dair literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte KYD ile HMGB1'in eksozomlar içinde salıverildikleri düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması için yapılan deneyler Şekil 3.1.'de özetlenmiştir.



Şekil 3.1. Tez çalışmaları sırasında yapılan tüm deneysel çalışmaların özeti. Tüm çalışmalar için 48 adet Swiss albino ırkı erkek fare kullanılmıştır. Her yöntem için kaç fare kullanıldığı yöntemlerin yanında parantez içinde belirtilmiştir.

3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Barındırma Koşulları

Çalışmada toplamda 48 tane, ağırlıkları 25-35 g arasında olan yabanıl tip Swiss Albino ırkı erkek fare kullanıldı. Tüm fareler Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilerek Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü Beyin Araştırmaları Laboratuvarı'na getirildi. Fareler laboratuvara getirilmelerinden itibaren sıcaklığı $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de, nem oranı %50-60 arasında tutulan özel odada, saydam pleksiglas kafeslerde, 12'şer saatlik karanlık-aydınlık döngüsünün sağlandığı koşullarda barındırıldı. Hayvanlara su ve yem *ad libitum* olarak sağlandı. Hayvanlar üzerinde yapılan tüm işlemler Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 2017-10/5 ve 2018-30/01 karar numaralı izinleriyle (EK-1) ve yönergeleri doğrultusunda yapıldı.

3.2. Kortikal Yayılan Depresyon Dalgasının Oluşturulması

KYD oluşturulması için -KYD'den 24 saat sonra örnekleme yapıldığı grup hariç diğer tüm deneylerde- farelere ksilazin preanestezisi (10 mg/kg, intraperitoneal) ve üretan anestezisi (1,5 g/kg, intraperitoneal) uygulandı. Anestezi derinliğinin yeterli olmaması halinde ilk dozdan 30 dakika sonra başlangıç dozunun onda biri kadar ek doz uygulandı. KYD'den 24 saat sonra örnekleme yapıldığı grupta izofluran anestezisi uygulandı. Farelere izofluranın %5 oranında oksijenle karıştığı kapalı bir kutuda indüksiyon anestezisi verildi. Derin anestezi sağlandıktan sonra, farenin solunum sayısı ve paternine göre, deney süresince izofluran dozu %1,5-2 arasında tutuldu. Yeterli anestezi derinliğine ulaşıldığına arka ayakların ince uçlu forceps ile sıkıştırılmasına verilen tepkisizlikle emin olunduktan sonra, fare stereotaktik çerçeveye yerleştirildi. Deney boyunca farelerin vücut sıcaklığı, oksijen satürasyonu ve kalp hızı girişimsel olmayan cihazlarla izlendi; değerlerin fizyolojik sınırların içinde tutulması sağlandı. Farelerin anestezisi altında olduğu tüm süre boyunca nazal O_2 desteği sağlandı.

%70 derişiminde etil alkolle cilt temizliği sonrasında kafa cildi açılan farenin kafatasında kemik matkabı yardımıyla sağ parietal kemikte 2x2 mm boyutlarında bir alan inceltilti. Frontal kemikte ise bregmanın 1,3 mm anterior, 1 mm lateralinde 2

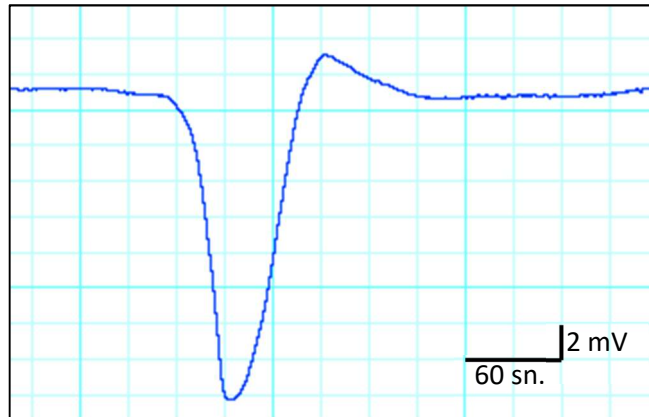
mm çapında dairesel bir kraniyal pencere açıldı. Kayıt elektrodu inceltilmiş bölge üzerine stereotaksinin tutucusu ile sabitlendi. Ense kaslarının interpariyetal kemiğe tutunma yerlerinin forseps yardımıyla ayrılmasıyla toprak elektrot ense kaslarının derin katlarının arasına yerleştirildi. Oluşturulmak istenen KYD sayısına göre farklı yöntemler izlendi. KYD dalgasının oluşumu elektrofizyolojik olarak DC potansiyeldeki değişimin görülmesiyle teyit edildi (Şekil 3.2.). Her iki yöntemle tetiklenen ilk KYD'den 15 dakika-5 saat sonra farenin beyni çıkarıldı.

3.2.1. Tek KYD Oluşturulması

Tek KYD indüklemek için iğne batırılması (*pinprick*) yöntemi kullanıldı. 2-3 mm uzunluğunda, 26G kalınlığında iğnenin kraniyal pencere altındaki beyin korteksine bir anda batırılıp çıkarılması ile yalnızca bir tane KYD tetiklendi.

3.2.2. Birden fazla KYD Oluşturulması

Kraniyal pencere ile aynı boyutlara sahip pamuk topuna 1 M potasyum klorür (KCl) emdirildi. Pamuğun kraniyal pencere yardımıyla açığa çıkan dura üzerine yerleştirilmesi ile KYD tetiklendi. Pamuğun her on dakikada veya her 3 KYD dalgasında bir 1 µl KCl ile yeniden ıslatılmasıyla tekrarlayan KYD modellendi.



Şekil 3.2. İğne batırılması yöntemiyle tetiklenen tek KYD dalgasının elektrofizyolojik kaydı. Bir ila bir buçuk dakika süren, DC potansiyeldeki büyük negatif kayma KYD'nin tipik elektrofizyolojik göstergesidir.

3.3. Beyin ve Kan Örneklerinin Eldesi

In vivo deneyler tamamlandığında immunofloresan işaretleme için derin üretan anestezisi altında, kardiyak perfüzyon sonrasında beyinler çıkarıldı. Western blotlama ve eksozom izolasyonu deneyleri için derin üretan anestezisi altında, dekapitasyon sonrasında beyinler çıkarıldı. Kardiyak perfüzyon için farenin ksifoid prosesi hizasından göğüs cildi açıldı. Ksifoid prosesin forsepsle kavranmasıyla önce diyafram, sonra her iki yandan kostaların kesilmesiyle kalp açığa çıkarıldı. Pompa sistemine bağlı boru sisteminin ucundaki iğne sol atrium içinde sabit tutularak karaciğerin rengi krem-sarı renge dönene kadar heparinli serum fizyolojik (%0,4), devamında ekstremitelerdeki kasılmalar sonlanıncaya kadar paraformaldehit (%4) çözeltisi (PFA) ile kardiyak perfüzyon yapıldı. Dekapitasyon sonrasında kemik makası ile kraniyum orta hat boyunca kesildi ve iki yana açılarak beyin özenle çıkarıldı. Immunofloresan işaretleme için beyin bütün halde PFA solüsyonuna aktarıldı. Western blotlama ve eksozom izolasyonu için buz üzerinde beynin her iki korteksi ayrıldı.

Plazmadan nöron kökenli eksozomların eldesi için dekapitasyon öncesinde farenin kalbine kardiyak perfüzyon için tarif edilen yöntemle erişildi. %0,4 oranında heparinli serum fizyolojik ile yıkanmış insülin enjektörüyle sol atrium penetre edilerek tam kan toplandı. Toplanan kan sitrat içeren (3:2 hacim oranında) tüplere enjektör haznesinden direkt aktarıldı.

3.4. İmmunofloresan İşaretleme

Kardiyak perfüzyon sonrasında PFA içine aktarılan beyin 24 saat boyunca tekrar fikse edildikten sonra donma – çözme aşamalarında koruma sağlama amacıyla yaklaşık 36 saat boyunca %30 derişiminde sükröz çözeltisinde bekletildi. Aktif kaspaz-1 dışındaki işaretlemeler için kriyostat ile 8 µm kalınlığında, poli-L-lizin kaplı lamalar üzerine kesit alındı. Kesitler işaretlenme yapıncaya dek -20°C'de saklandı. Aktif kaspaz-1 işaretlemesi için kayan mikrotom üzerinde kuru buz içinde 35 µm kalınlığında alınan serbest yüzen kesitler 12 kuyucuklu plakalarda donma karşıtı solüsyon içinde işaretleme yapıncaya kadar -20°C'de saklandı. Tüm işaretlemeler için

aksi belirtilmedikçe solüsyonlar 1X fosfat tamponlu salin (PBS) içinde hazırlandı. Her işaretleme protokolü ilk kez uygulandığında, kesitler primer antikora muamele edilmeksizin yalnızca sekonder antikora muamele edildi. Bu negatif kontroller ile işaretlenmenin özgüllüğü test edildi.

3.4.1. p65, cRel, HMGB1 ve Iba-1 İşaretlemeleri

p65 işaretlemesi için 10 mM, pH 6,0 sodyum sitrat çözeltisi içinde, 80°C'de 15 dakika boyunca antijen geri kazanımı yapıldıktan sonra kesitler yıkandı. %10 derişiminde normal keçi serumu (NGS) ile blokaj yapıldı. Blokaj solüsyonu içinde 1:200 oranında anti-p65 veya anti-HMGB1 antikoruyla gece boyunca inkübe edilen kesitler yıkandıktan sonra, blokaj solüsyonu içinde 1:200 oranında sekonder antikora inkübe edildi. cRel ve Iba-1 işaretlemesi için yıkama sonrasında BSA (%3, %0,1 Triton X-100) solüsyonuyla blokaj yapıldı. BSA (%1, %0,1 Triton X-100) solüsyonu içinde 1:200 oranında anti-cRel veya anti-Iba-1 antikoruyla gece boyunca inkübe edilen kesitler yıkandıktan sonra aynı solüsyon içinde 1:200 oranında sekonder antikora inkübe edildi.

3.4.2. p65-Neun, cRel-Neun ve I-kappa B-Neun Çifte İşaretlemeleri

p65-NeuN çifte işaretlemesi için yıkama sonrasında 10 dakika boyunca oda sıcaklığında %0,2 oranında Triton X-100 solüsyonunda geçirgenliği artırılan kesitlere BSA (%3, %0,1 Triton X-100) solüsyonuyla blokaj yapıldı. BSA (%1, %0,1 Triton X-100) solüsyonu içinde 1:200 oranında anti-p65 ve 1:200 oranında farede üretilmiş anti-NeuN antikoruyla 24 saat boyunca inkübe edilen kesitler yıkandıktan sonra aynı solüsyon içinde 1:200 oranında sekonder antikora inkübe edildi. cRel-NeuN ve I-kappa B-NeuN çifte işaretlemeleri için yıkama sonrasında BSA (%3, %0,1 Triton X-100) solüsyonuyla blokaj yapıldı. BSA (%1) solüsyonu içinde 1:200 oranında tavşanda üretilmiş anti-NeuN antikoruyla gece boyunca inkübe edilen kesitler yıkandıktan sonra aynı solüsyon içinde 1:200 oranında sekonder antikora inkübe edildi. Devamında kesitler yıkandıktan sonra BSA (%3, %0,1 Triton X-100) solüsyonu içinde 1:100 oranında anti-cRel veya anti-I-kappa B antikoruyla 24 saat boyunca inkübe

edildi. Kesitler yıkandıktan sonra aynı solüsyon içinde 1:200 oranında sekonder antikora inkübe edildi.

3.4.3. p65-S100B ve cRel-MAP2 Çifte İşaretlemelemleri

p65-S100B ve cRel-MAP2 çifte işaretlemelemleri için Fab fragmanı formundaki sekonder antikora kullanıldı. Küçük santrifüj tüpü (KST) içinde 1 µl primer antikor (1:200 oranı için), 1,5 µl sekonder antikor ve 10 µl PBS karanlıkta 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 188 µl normal fare serumu (NMS, %10) bu karışımın üzerine eklenerek 1 saat daha inkübe edildi. Diğer tarafta kesitler yıkandıktan sonra p65-S100B işaretlemelemleri için NGS (%10), cRel-MAP2 işaretlemelemleri için BSA (%3, %0,1 Triton X-100) solüsyonu ile blokaj yapıldı. Blokaj sonrasında kesitler birinci gün anti-p65 veya anti-cRel antikora ile hazırlanan primer-sekonder antikor karışımı ile gece boyunca inkübe edildi. İkinci gün aynı karışım anti-S100B veya anti-MAP2 primer antikora ile hazırlandı ve yıkanan kesitlerle gece boyunca inkübe edildi.

3.4.4. Aktif Kaspaz-1 İşaretlemelemleri

Serbest yüzen kesitlere KST içinde NGS (%10, %0,1 Tween 20) ile blokaj yapıldı. Benzer biçimde KST kullanılarak blokaj solüsyonunun içinde 1:100 oranında anti-aktif kaspaz antikora ile 2 gece boyunca inkübe edilen kesitler 12 kuyucuklu plakalar içinde yıkandıktan sonra blokaj solüsyonunun içinde, 1:200 oranında sekonder antikora inkübe edildi.

İnkübasyonlar tüm işaretlemelemlerde blokaj basamağı için oda sıcaklığında 1 saat boyunca, primer antikor için +4⁰C'de, sekonder antikor için oda sıcaklığında yapıldı. Kesitler sekonder antikora veya ikinci primer-Fab fragmanı formunda sekonder antikor karışımıyla muamele sonrasında yıkandıktan sonra %0,1 oranında Hoechst 33258 solüsyonuyla kapatıldı. Kapatılan kesitler ışık almayan kutularda +4⁰C'de saklandı.

3.5. İmmünofloresan İşaretleme Verilerinin Sayısal Analizi

İmmünofloresan işaretleme sonrasında görüntüler Leica TCS-SP8 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop ile alındı. Görüntülerin analizinde mikroskobun kendi yazılımı olan Leica LASX ve ImageJ (*National Institute of Health, ABD*) yazılımları kullanıldı. Görüntülerin alınma ayarları her işaretlemeye özgül olarak belirlendi. Tüm kesitler için aynı görüntü elde etme ayarları (lazer gücü, dijital kazanç, çözünürlük, *pinhole* açıklığı, kullanılan dedektör tipi, tarama hızı, ortalama piksel sayısı) kullanıldı. Görüntüler korteksin yaklaşık olarak aynı bölgelerinden (bölge 3 ve 4) alındı. Alınan her bir görüntü 276,79*276,79 μm^2 'lik alanı kaplamaktadır.

Üç kanalda ayrı ayrı alınan görüntülerde p65-NeuN, cRel-NeuN, I-kappa B-NeuN çifte işaretlemelemlerinin değerlendirilmesi belirtilen şekilde yapıldı: Öncelikle Hoechst 33258 ile görüntüleme düzlemine tamamen giren çekirdekler tespit edildi. Daha sonra p65/cRel/I-kappa B işaretlemelemleri Hoechst 33258 ile karşılaştırılarak nükleer işaretleme pozitif olan hücreler tayin edildi. Üçüncü aşamada benzer biçimde NeuN ile Hoechst 33258 görüntülerinin karşılaştırılmasıyla NeuN pozitif nöronlar tespit edildi. Son aşamada nükleer p65, cRel veya I-kappa B işaretlemelemlerinin pozitif olduğu hücreler ile NeuN işaretlemelemlerinin pozitif olduğu hücreler karşılaştırıldı.

HMGB1 işaretlemelemleri değerlendirilirken 2 kanalda (Hoechst 33258 ve HMGB1) tüm kesitin z dizi yöntemiyle görüntülenerek üst üste karşılaştırılmasıyla elde edilen görüntüler kullanıldı. İki işaretlemelemlerin karşılaştığı hücreler belirlenerek tüm hücreler içinde nükleer HMGB1 içeriğini kaybetmiş hücreler hesaplandı.

Tüm görüntüler hangi işaretlemelemlere veya hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin körlüme sonrasında analiz edildi.

3.6. Nükleer Proteinlerin Ayrıştırılması

Nükleer ve sitoplazmik proteinlerin ayrıştırılması için ticari kit üreticisinin (*NEPER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit, Thermo Scientific*) yönergeleri birkaç değişiklikle takip edildi. Servikal dislokasyon sonrasında hızlıca çıkarılan beyin buz üzerinde ipsilateral ve kontralateral kortekslerine ayrıldı. Her bir hemikorteksin

üzerine CERİ solüsyonu ve 1:100 oranında fosfataz ve proteaz inhibitör kokteyli eklendikten sonra bıçaklı parçalayıcı ile gözle görülür parça kalmayınca dek doku parçalandı. Daha sonra bu karışım buz üzerinde 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra CERİI eklenerek 5 dakika daha inkübe edildi. Sonraki aşamalar için üreticinin yönergeleri izlendi. Elde edilen örnekler Western blotlama yapılıncaya dek -80°C'de saklandı.

3.7. Doku Örneklerinin Lizat Haline Getirilmesi

Servikal dislokasyon sonrasında hızlıca çıkarılan beyin buz üzerinde ipsilateral ve kontralateral kortekslerine ayrıldı. Hemisferler ayrı ayrı KST'ler içinde *radioimmunoprecipitation assay* (RIPA) tamponu (150 mM NaCl, %1 Triton X-100, %0,5 deoksikolik asit, %0,1 SDS, 50 mM tris, pH 8.0) ile muamele edildi (500 µl/80 mg doku). RIPA tamponuna kullanımdan hemen önce 1:100 oranında fosfataz-proteaz inhibitör kompleksi eklendi. Ultrasonik homojenizatör ile, KST buz içinde tutularak, gözle görülür parça kalmayınca kadar homojenize edilen dokular 30 dakika buz üzerinde bekletildi. +4°C'de, 14000 RPM'de, 15 dakika santrifüj sonrasında süpernatant alınarak Western blotlama yapılıncaya dek -80°C'de saklandı.

3.8. Beyin Dokusu ve Plazmadan Nöron Kökenli Eksozomların Ayırılması

3.8.1. Beyin Dokusu ve Plazmadan Eksozomların Ayırılması

Bölüm 3.4'te belirtilen şekillerde kan ve beyin örnekleri elde edildikten sonra her bir beyin ipsilateral ve kontralateral korteksleri ayrı KST'lere alındı. Kan örnekleri plazmalarının ayrılması için +4°C'de 1500 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant (plazma) temiz bir tüpe alındıktan sonra +4°C'de 10000 g'de 30 dakika santrifüj edilerek büyük veziküllerden ve hücre debrisisinden arındırıldı. Elde edilen örnekler ticari kite (*The Total Exosome Isolation Kit (from plasma), Thermo Scientific*) tabi tutulmak üzere ayrıldı.

Elde edilen her bir korteks doku parçalayıcısında (*gentleMACS*), cihaza özel C tüpleri içerisinde 500 µl PBS ile birlikte oda sıcaklığında 35 s boyunca parçalandı. Elde

edilen örnek temiz bir KST'ye 500 µl daha PBS ile beraber aktarıldı. Aktarılan örnek +4°C'de 1500 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Ayrılan süpernatant bir kez daha +4°C'de 10000 g'de 30 dakika santrifüj edilerek büyük veziküllerden ve hücre debrisisinden arındırıldı. Elde edilen örnekler plazma örnekleriyle beraber ticari kit üreticisinin yönergelerince işlendi.

İşlemler sonrasında elde edilen eksozom peletleri 200 µl PBS içinde tekrar yüzdürüldü. Bu örnekler +4°C'de bir gece boyunca yavaş hızda 360° döndürülerek eksozomların kit içindeki kimyasallardan ayrılması sağlandı. Korteksten elde edilen (kortikal) eksozomların protein içerikleri BCA analizi yapılarak belirlendi.

3.8.2. Kortikal ve Plazma Eksozomlarının Akış Sitometrisiyle Tayini

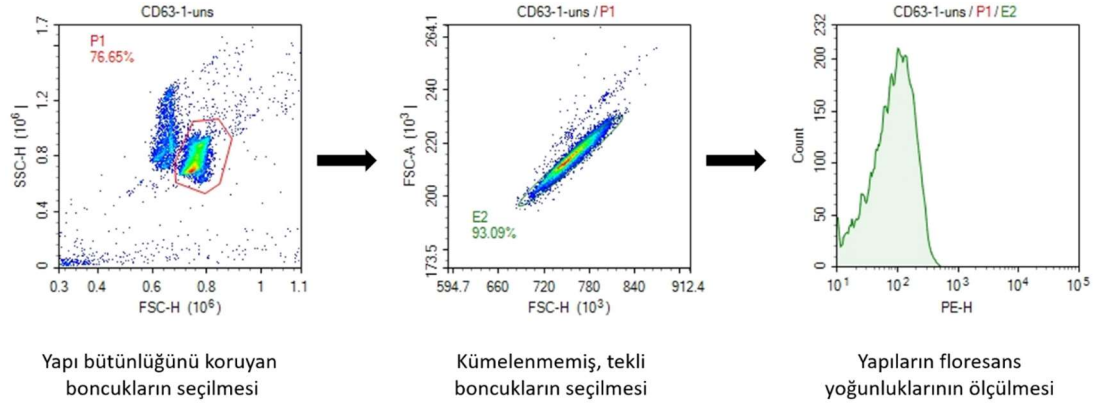
Eksozom ayrıştırma kitiyle elde edilen örneklerin eksozom içerdiğini doğrulamak üzere lateks boncukların yüzeyi kardinal eksozom belirteçlerinden anti-CD9, anti-CD63 ve anti-CD81 saf antikorlarıyla kaplandı. Eksozomlar bu boncuklarla yakalandıktan sonra aynı antikorların floroforla konjuge olan formları kullanılarak akış sitometrisi için işaretleme yapıldı. Örneklerin eksozom içerdikleri doğrulandıktan sonra nöron kökenli eksozom içerdiklerini göstermek için benzer biçimde anti-CD171 antikoruyla kaplı boncuklar kullanıldı. Devamında benzer biçimde eksozom yüzey belirteçlerinden floroforla anti-CD9, anti-CD63 ve anti-CD81 antikorlarıyla akış sitometrisi için işaretleme yapıldı.

Eksozomların boyutları nanometre düzeyindedir. Ancak akış sitometrisi 1-15 µm büyüklüğündeki molekülleri algılayabilmektedir. Bu nedenle eksozomların akış sitometrisiyle tayin edilebilmesi için lateks boncuklar kullanılmıştır. Bu boncukların büyüklüğü yaklaşık 1-2 µm civarındadır. Aynı zamanda üzerine bağlanan antikorlar yardımıyla ileri saflaştırma yapılabilmesine de olanak sağlamaktadır. Lateks boncukların antikorla kaplanması için PBS içinde 10 µl boncuk, 10 µg antikorla birleştirildi, oda sıcaklığında gece boyu döndürülerek inkübe edildi. Daha sonra 12000g'de 10 dakika santrifüj sonunda çöktürülen antikor bağlı boncuklar BSA (%5) ile oda sıcaklığında 6 saat boyunca döndürülerek bloklandı. Blokaj sonrası tekrar santrifüjle çöktürülen boncuklar BSA (%1) içinde yeniden yüzdürüldü. Bu şekilde

hazırlanan boncuklar +4°C'de saklandı. Bu koşullarda hazırlanan boncuklar yaklaşık bir ay boyunca stabil kalmaktadır.

Anti-CD171 antikoruna bağlı lateks boncuklar kortikal örneklerde 1 µl boncuk/1 µg eksozom oranında; plazma örneklerinde ise 1 µl boncuk/3 µg eksozom oranında karıştırıldı. Eksozom-antikora bağlı boncuk karışımı 50 µl PBS içinde 30 dakika oda sıcaklığında yavaş hızda 360° döndürüldükten sonra 450 µl daha PBS'in eklenmesiyle bir gece boyunca dönerek inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında eksozom-antikora bağlı boncuk karışımı 10000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Peletler her işaretleme için 50 µl PBS içinde yüzdürüldü. Daha sonra her biri ayrı KST'lerde olmak üzere kortikal eksozomlar floroforla konjuge anti-CD81 antikoruna; plazma eksozomları ise floroforla konjuge anti-CD81, CD9, CD63 (eksozom yüzey belirteçleri) antikorlarıyla işaretlendi. Her bir işaretlemenin negatif kontrolü olması amacıyla her örnek aynı derişimde işaretleme yapılan antikorun izotipindeki antikorla muamele edildi. Her işaretleme ayrı KST içinde yapıldı. Antikorun final derişimi 1 µg/ml olacak şekilde her işaretleme için 1:1 oranında eksozom-boncuk karışımıyla antikor PBS içinde birleştirildi. 1 saat boyunca oda sıcaklığında işaretleme tamamlanan eksozomlar üzerlerine 1'er ml PBS eklendikten sonra 10000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelet 100 µl PBS içinde çözdürüldükten sonra 96 kuyucuklu plakalara aktararak akış sitometrisiyle ölçüm yapıldı.

Akış sitometrisi için Şekil 3.3.'te belirtilen kapılama stratejisi kullanıldı. Kapılama stratejisi için ilk aşamada FSC-H (*forward scatter-height*, öne dağılım) ve SSC-H (*side scatter-height*, yana dağılım) parametreleri kullanıldı. FSC ve SSC değerlerinin gösterildiği grafikler yardımıyla yapısı intakt olan boncuklara bağlı eksozomlar seçildi. Daha sonra seçilen alan içindeki yapılara ait FSC-H/FSC-A (FSC-*area*) grafiği çizdirildi. Kümelenen yapıların analiz dışı bırakılmasıyla tekliler seçildi. Seçilen yapıların floresans şiddeti ölçülerek örnek içindeki miktarı hakkında yarı niceliksel ölçüm yapıldı.



Şekil 3.3. Akış sitometrisi verisinin analizi için kullanılan kapılama stratejisi. FSC, örnek içindeki moleküllerin büyüklüğünü simgeler. Hücre debrisisi veya bu deneyde kullanım biçimiyle parçalanmış boncukların FSC değerleri düşük olma eğilimindedir. SSC ise yapıların granül içeriğini temsil eder. Yapı ne kadar heterojense SSC değeri de o kadar yüksek olur. Parçalanmış boncukların SSC değerleri yüksek olma eğilimindedir. Bu nedenle soldaki grafik yardımıyla yapısı intakt olan boncuklara bağlı eksozomlar seçildi. Ortadaki grafikte gösterilen FSC-A değerinin yüksek olması floresansı ölçülen yapının lazer önünden daha uzun sürede geçtiğini; dolayısıyla, hücrelerin veya bu deneyde boncukların kümelenmiş olduğunu gösterir. Bu grafik yardımıyla kümelenmiş boncuklar analiz dışı bırakılarak tekliler seçildi. Seçilen yapıların floresans yoğunlukları sağdaki grafik ile gösterildi. (İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İhsan Gürsel ve ekibinin katkıları ile yapılmıştır.)

3.8.3. Plazmadan Nöron Kökenli Eksozomların Ayırıştırılması

Plazma eksozomları 1 µl anti-CD171'e bağlı boncuk/3 µg eksozom oranında birleştirilerek akış sitometrisi için işaretleme sırasında kullanılan protokol uygulandı. Böylece plazmanın içindeki nöron kökenli eksozomlar boncuk yardımıyla presipite edildi. Antikora bağlı boncuk-eksozom karışımının bir gece boyu inkübe edilmesinden sonra elde edilen pelet, RIPA tamponu içinde sonikatör yardımıyla lizat haline getirildi. 5 dakika sonikasyon, 15 saniye vorteksleme döngüsü 3 kere uygulandıktan sonra örnekler buz üzerinde 20 dakika inkübasyona bırakıldı. 20 dakika sonunda 10000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant (lizat) temiz bir tüpe alındı.

Kortikal eksozomlar içinde varlığı araştırılan alarmin proteini HMGB1'in nöronlardan salıverildiği öngörüldüğünden kortikal eksozomların total popülasyonu

incelendi. Bu nedenle kortikal eksozomlarda ileri ayrıştırma yapılmadı. Eksozomlar, 1 µl/ 1 µg eksozom oranında RIPA ile yukarıdaki paragrafta anlatıldığı biçimde lizat haline getirildi.

Eksozom lizatlarının protein miktarları BCA analiziyle tespit edildi. Örneklerdeki CD171 (nöron kökenli eksozomlar belirteci ve yükleme kontrolü), TSG101 (eksozom yüzey belirteci ve yükleme kontrolü), HMGB1'in varlığını ve miktarındaki değişimi göstermek amacıyla Western blotlama yapıldı.

3.9. Konsantrasyon Tayini

Tüm lizatların konsantrasyon tayini bisinkoninik asit (BCA) tahlili ile yapıldı. 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 ölçüldü. Standart proteinlerin absorbans-konsantrasyon eğrileri Excel programıyla çizilip eğrinin formülü çıkartıldı. Bu formül yardımıyla diğer örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.10. Western Blotlama ve Verilerin Sayısal Analizi

Tayini yapılacak proteine göre 20 ile 50 µg arasındaki protein, 1:4 oranında örnek tamponu, %10 2-merkaptoetanol ve distile suyla karıştırılarak 95°C'de 5-10 dakika denatüre edildi. Eksozom lizatları dışındaki tüm örnekler, %4-12 gradientli poliakrilamid jele yüklendi ve 100 V altında elektroforez yapıldı. Eksozom lizatları ise biriktirme kısmı %5, çözme kısmı %12 derişiminde olan poliakrilamid jele yüklendi. Jel içerisinde kütlelerine göre ayrılmış proteinler, metanol ile aktive edilen PVDF (poliviniliden diflorür) membranlara 120 mA elektriksel akım altında yarı ıslak transfer yöntemiyle aktarıldı. %0,1 Tween-20 içeren tris tamponlu fosfat (TBS) içinde hazırlanan %5 yağsız süt tozu ile bloke edildikten sonra membranlar anti-p65 (1:3000), anti-cRel (1:3000), anti-I-kappa B (1:000), anti-histon-3 (1:1000), anti-aktif kaspaz-1 (1:500), anti-CD171 (1:1000), anti-TSG101 (1:500), anti-HMGB1 (1:500) primer antikolarıyla +4°C'de, gece boyunca inkübe edildi. Yıkama sonrasında 1:5000

derişiminde (aktif kaspaz-1 işaretlemesi için 1:2500) HRP (yaban turpu peroksidazı) bağlı sekonder antikorla oda sıcaklığında, 60 dakika muamele edilen (aktif kaspaz-1 işaretlemesi ve eksozom lizatları için 2,5 saat) membranlardaki HRP enzimi güçlendirilmiş kemiluminesans (ECL) substratıyla birleştirilerek membranlardaki ilgili protein bantları görünür hale getirildi. Proteinlerin kuyucuklara eşit kütlede yüklendiklerini doğrulamak üzere örnekler anti-beta aktin veya anti-beta tubulin antikoruyla (1:5000) +4°C'de 20 dakika muamele edildikten sonra HRP bağlı sekonder ile oda sıcaklığında 30 dakika muamele edilerek ECL yardımıyla görüntüledi.

Western blotlama analizi için Image J programından yararlanıldı. Membran üzerinde görüntülenen bantların her biri arka planı en az dahil ederek kapsayacak şekilde dikdörtgen aracıyla seçildi. Her bant için alan seçimi bant büyüklüğüne göre yenilendi ve alan içindeki entegre dansite değeri ölçüldü. Benzer ölçümler yükleme kontrolü için alınan görüntü üzerinden de yapıldı. Daha sonra her örnek için özgül proteinin dansite değeri yükleme kontrolünün dansite değerine oranlandı.

Nükleer ve sitoplazmik fraksiyonların analizinde cRel, p65 ve I-kappa B bantlarının entegre dansiteleri ölçüldükten sonra sitoplazmik fraksiyonu temsil eden bantların değerleri yükleme kontrolü olarak β -tubuline, nükleer fraksiyonu temsil eden bantların değerleri histon-3'e kıyaslandı. Daha sonra nükleer cRel, p65 veya I-kappa B proteinlerinin miktarı nükleer ve sitoplazmik proteinlerin miktarlarının toplanmasıyla elde edilen toplam protein miktarına kıyaslanarak nükleer/total protein oranı elde edildi.

3.11. İmmünoelektron Mikroskopisi ile HMGB1 İşaretlemesi

Gluteraldehit (%2,5) çözeltisi ile kardiyak perfüzyon yapıldıktan sonra çıkarılan beyinlerde hedef bölgeler 1x5 mm boyutlarında dilimlendi. Dilimler, Sorenson fosfat tamponu (0,2 M, pH: 7,2) içindeki gluteraldehit (%2,5) ve PFA (%2) ile bir gece tespit edildi. Daha sonra Sorenson fosfat tamponuyla (0,1 M) yıkanan dilimler 2 saat boyunca osmiyum tetroksit (%1) ile ikinci kez tespit edildi. Sorenson fosfat tamponuyla dilimler yıkandı. Uranil asetatla blok boyanması ve üçüncü tespit yapıldıktan sonra dereceli etanollerden geçirilerek dehidratasyon gerçekleştirildi.

Propilen oksit ve araldit aşamalarını takiben araldit CY 2012 gömme materyalinde polimerizasyon yapılarak bloklar elde edildi. Bloklardan ultramikrotomla (Leica Ultracut R) önce 800 nm'lik yarı ince kesitler alınarak uygun bölgeler saptandıktan sonra 80 nm ince kesitler nikel ızgaralara alındı. İnce kesitler oda sıcaklığında 30 dakika doymuş sodyum metaperiyodat ile muamele edilerek araldittin eritilmesi sağlandı. Daha sonra oda sıcaklığında arka plan sinyalinin önlemek için normal keçi serumu ile 10 dakika boyunca inkübe edildi. Devamında kesitler anti-HMGB1 antikoruyla (1: 100) 1 gece inkübe edildi. Tris tamponu ile yıkama sonrasında 5 veya 10 nm koloidal altınla konjuge sekonder antikorla (1:20) 1 saat inkübe edildikten sonra tris tamponuyla tekrar yıkandı. Kesitleri taşıyan ızgaralar son aşamada uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı. Leo 906 E (80 kV) (Oberkochen, Almanya) transmisyon elektron mikroskopunda incelenerek görüntülendi.

3.12. Sayısal Verilerin İstatistiksel Analizi

İstatistiksel analizler için IBM SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versiyon 23 ile kullanıldı. p65-NeuN, cRel-NeuN, I-kappa B-NeuN çifte işaretlemelerinin sonucunda elde edilen veri tabanlarında ortalamanın ± 2 standart sapma değerinin dışında kalan değerler uç değer olarak kabul edildi ve analiz dışı bırakıldı. Aynı korteksin farklı alanlarından elde edilen veriler bağımsız olarak kabul edilerek analiz yapıldı. Tüm görüntüler bölge 3 ve 4'ten alınmasına rağmen bu bölgelerin farklı işlevlere sahip kortikal alanları (motor ve somatosensoriyal) içermeleri nedeniyle her alanın bağımsız veri olarak ele alınması gerektiği düşünüldü. Her analizde ikiden fazla bağımsız grubun karşılaştırması yapıldığından normal dağılan veri grupları için tek yönlü varyans analizi (ANOVA), normal dağılmayan veri grupları için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Bu testlerde anlamlı sonuçlar bulunması halinde farkı yaratan grup, uygun *post-hoc* analizle tayin edildi. Normal dağılan veri gruplarının homojenliği Levene testiyle belirlendikten sonra homojen verilerde Tukey, homojen olmayan verilerde Tamhane testi ile *post-hoc* analiz yapıldı. Normal dağılmayan veri gruplarında ise Mann-Whitney *U* testiyle ikili karşılaştırmalar yapıldı. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edilirken, 0,05 ile 0,1 arasındaki p

değerleri, deneyin sonucuna göre sınırlı anlamlı kabul edildi. *Post-hoc* testler sırasında anlamlılık düzeyinin belirlenmesinde Bonferroni düzeltmesi uygulandı.

Çalışmalar sırasında kullanılan önemli kimyasal malzemeler ve cihazlar Tablo 3.1 ve 3.2’de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmalarda kullanılan önemli kimyasal malzemeler.

Primer antikolar		
Antijen	Ürünün markası	Ürünün kod numarası
cRel	Santa Cruz	sc6955
p65	Cell Signaling Technology (CST)	8242
I-kappa B-alfa		4814
NeuN (farede üretilmiş)	Chemicon	MAB377B
NeuN (tavşanda üretilmiş)	CST	24307
S100B	Abcam	ab52642
HMGB1		ab18256
MAP2	Chemicon	MAB3418
Histon 3	CST	9715
Aktif kaspaz-1	Invitrogen	PA5-38099
CD171 (saf)	Miltenyi Biotec	130-115-812
CD171 (WB uyumlu)	Abcam	ab24345
Akış sitometrisiyle uyumlu antikolar		
Antijen	Ürünün markası	Ürünün kod numarası
CD9-PE	Biolegend	124806
CD63-PE		134904
CD81-PE		104906
Rat IgG2 α -PE (izotip antikor)		400507
Armenian Hamster IgG-PE (izotip antikor)		400907
Sekonder antikolar		
Konjuge oldukları molekül	Ürünün markası	Ürünün kod numarası
Alexa Fluor 488	Invitrogen	R-37120, R-37116*
Alexa Fluor 555		A-21422, A-21428*
Cy2	Jackson ImmunoResearch	115-225-146, 111-225-144*
Cy3		115-165-146, 111-165-144*
Alexa Fluor 488, Fab fragmanı		115-547-003, 111-547-003*
Cy3, Fab fragmanı		115-167-003, 111-167-003*
HRP		CST

Kitler		
Nükleer Protein Ayrıştırma Kiti	Thermo Fisher Scientific	78835
Eksozom izolasyon kiti		4484450
BCA analiz kiti	Pierce	23225

* Sırasıyla anti-fare ve anti-tavşan.

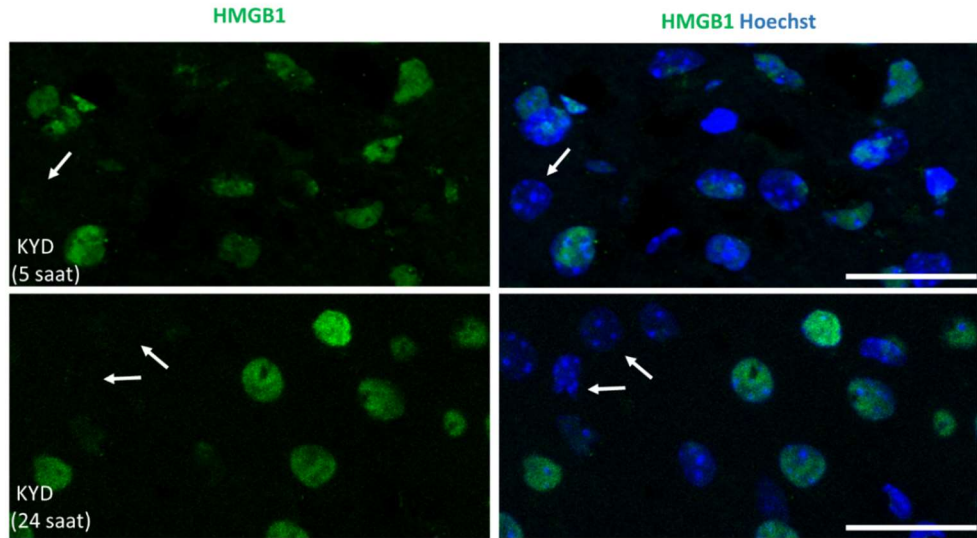
Tablo 3.2. Çalışmalarda kullanılan cihazlar.

Cihaz İsmi	Üretici Firma ve Model İsmi
Nabız-Oksimetre	Nonin, LifeSense VET
Anestezi ve Oksijen makinesi	AMS, Minor 612
Elektrikli Battaniye	Kent Scientific, Right Temp
Stereomikroskop	Nikon, SMZ 745T
Kriyostat	Leica, CM1100
Kayan mikrotom	Leica, SM2000 R
Doku Parçalayıcı	Miltenyi Biotec, gentleMACS
Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop	Leica, TCS SP8
Epifloresan Mikroskop	Nikon, E600
Akış Sitometrisi	Acea, NovoCyte
Ultrasonik Homojenizatör	Bandelin Sonopuls
Hassas Terazı	Shimadzu, AUX220
Distile Su Cihazı	Mp, Minipure Basic
pH Ölçer	Thermo Fisher, Orion3Star
Mikroplaka Okuyucu	Tecan, Infinite F50

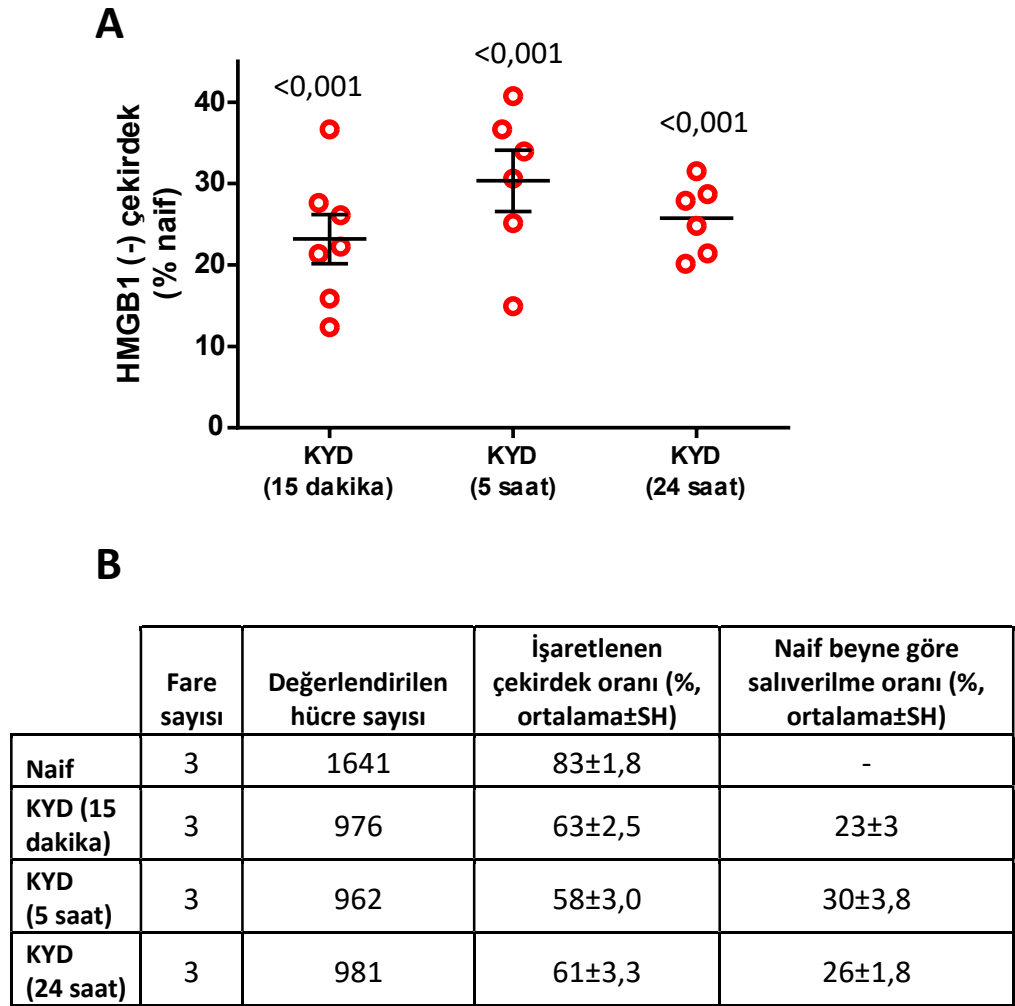
4. BULGULAR

4.1. HMGB1 Saliverilmesinin İmmüno Floresan İşaretlemeyle Tayini

HMGB1'in tüm hücrelerin çekirdeklerinde bulunduğu bilinmektedir (50). Ancak ticari antikolar bazı glialardaki HMGB1'i işaretleyememektedir. Bu nedenle naif hayvanda işaretlenen hücre sayısı ortalama $83 \pm 1,3$ 'tür ($n=3$ fare). HMGB1'in KYD ile yalnızca nöronlardan salındığı daha önce gösterildiği için HMGB1'in çekirdekte yerine konulduğu zamanı bulmayı hedefleyen çalışmamızda hücre fenotiplendirmeye gerek görülmemiştir (4, 69). Saliverilen HMGB1'in çekirdekte tekrar görüldüğü zamanı saptamak için naif beyinde ve tarama amacıyla tek KYD'den 15 dakika, 5 saat ve 24 saat sonra hücre çekirdeklerindeki HMGB1 pozitifliği çekirdek belirteci Hoechst ile işaretlenen hücreler üzerinden incelendi (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.). Sayısal analiz yalnızca ipsilateral korteksteki hücreler üzerinde yapıldı.



Şekil 4.1. KYD'den 5 ve 24 saat sonra çekirdeğinde HMGB1 içeren hücre oranında değişim olmuyor. İpsilateral korteksten alınan görüntülerde beyaz oklar HMGB1 içeriğini kaybetmiş çekirdeklerden örnekler göstermektedir. Konfokal mikroskopta z-yığın tekniğiyle alınmış görüntüler maksimum yansıtma özelliğiyle üst üste bindirilmiştir. Her görüntü için z adım büyüklüğü yaklaşık 1 μm , toplam görüntülenen alan yaklaşık 10 μm . Ölçek 25 μm . ($n=3$ fare)

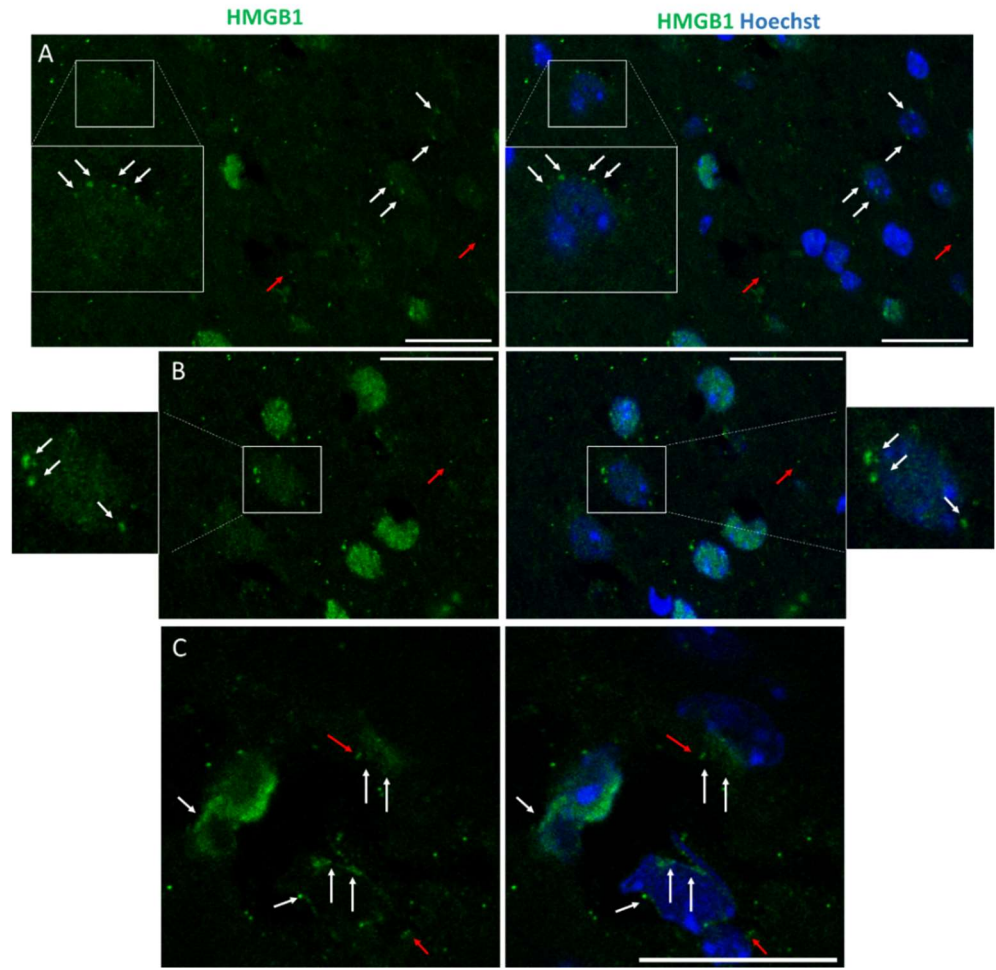


Şekil 4.2. KYD ile saliverilen HMGB1, 24 saat içinde yerine konulmuyor. **A:** Naif beyinde HMGB1 pozitif çekirdeklerin oranına kıyasla, her zaman noktasında HMGB1 içeriğini saliveren hücrelerin yüzdesi. Her alanda elde edilen değer bireysel olarak kırmızı çemberle gösterildi. Çemberlerin üzerinde naif beyinle karşılaştırma sonucunda elde edilen p değerleri belirtilmiştir (Tek yönlü varyans analizi, ortalama±standart hata (SH)) **B:** İncelenen hücrelere dair sayısal veriler. KYD'den 5 ve 24 saat sonra nükleer HMGB1 içeriğini kaybeden hücrelerin oranında anlamlı bir değişiklik görülmedi. (Tek yönlü varyans analizi, $p=0,26$)

Naif beyinde çekirdeklerin $83\pm 1,8$ 'i HMGB1 ile işaretlenmekteyken bu oranın KYD ile 23 ± 3 azaldığı görüldü. KYD'den 5 ve 24 saat sonra sırasıyla tüm hücrelerin $30\pm 3,8$ ve $26\pm 1,8$ 'inde HMGB1'in saliverildiği saptandı. Nükleer HMGB1 içeriğini kaybeden hücrelerin oranında farklı zaman noktaları arasında anlamlı bir değişiklik bulunmadı (tek yönlü varyans analizi, $p=0,26$). HMGB1 (+) çekirdek oranının KYD'den 24 saat sonra dahi naif beyindeki duruma geri dönmemiş olması, HMGB1'in nöroinflamasyonun çözülmesinde nöron çekirdeklerine dönerek bir rol oynamadığını göstermektedir.

İmmünofloresan işaretlemeler sırasında dikkat çeken bir diğer nokta ise KYD'den 15 dakika sonra görülen, bazı hücrelerde HMGB1 işaretlenmesinin çekirdeğin çevresinde yoğunlaşması, çekirdek-sitoplazma sınırında noktasal işaretlenmelerin olması, nöropilde ve olasılıkla hücreler arası mesafede görülen noktasal işaretlenmelerdir. Bu işaretlenme paterni KYD'den 15 dakika sonra izlenmesine rağmen 5 veya 24 saat sonra izlenmediği için daha yakın bir zaman noktası incelenmek istendi. Bu nedenle ara zaman noktası olarak KYD'den 3 saat sonra elde edilen beyin incelendi (Şekil 4.3.).

KYD'den 3 saat sonra, 15 dakika sonra saptanan ile aynı paternde işaretlenme görüldü. HMGB1 içeriğini salıveren çekirdek oranında zaman içerisinde değişiklik olmadığı göz önüne alındığında bu bulgu, HMGB1 içerdiği öngörülen veziküllerin sitoplazmadan saliverilmelerinin veya nöropilden uzaklaştırılmalarının 3 saat boyunca devam edebileceği izlenimini vermektedir.

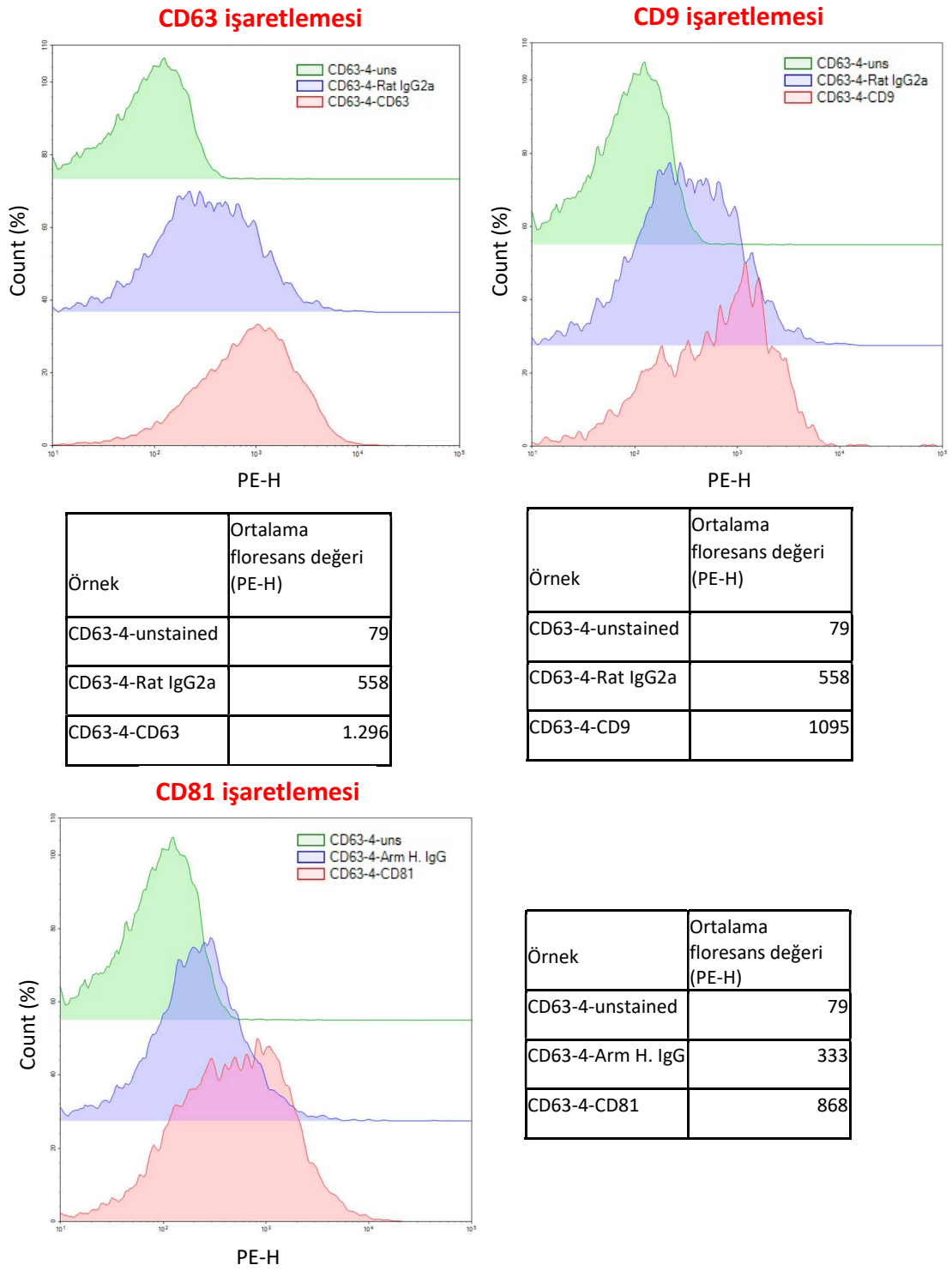


Şekil 4.3. KYD'den 15 dakika (A, B) ve 3 saat (C) sonra ipsilateral kortekste HMGB1 noktasal işaretleniyor. Beyaz oklar, HMGB1'in çekirdekten salıverildiği hücrelerde çekirdek-sitoplazma sınırındaki noktasal işaretlenmeleri; kırmızı oklar ise nöropildeki noktasal işaretlenmelere dikkat çekmektedir. Konfokal mikroskopta z-yığın tekniğiyle alınmış görüntüler maksimum yansıtma özelliğiyle üst üste bindirilmiştir. Her görüntü için z adım büyüklüğü yaklaşık 1 μm , toplam görüntülenen alan yaklaşık 10 μm . Ölçek 25 μm . (KYD'den 15 dakika sonrası için n=3, 3 saat sonrası için n=1 fare.)

4.2. Total Eksozom İzolasyonu

KYD'den 15 dakika ve 3 saat sonra görülen işaretlenme biçimi HMGB1'in veziküler bir biçimde salındığını düşündürmekteydi. Yönlendirici sekansı olmaması sebebiyle myeloid hücrelerde HMGB1'in endoplazmik retikulum-golgi-bağımlı yol yerine klasik olmayan veziküler yolla hücre dışına

salıverdiğini gösteren çalışmaların ışığında; eksozomların salıverilme aracı olabileceği düşünöldü (52). Salıverilen HMGB1'in interstisyel sıvı-BOS bağlantıları aracılığıyla kana geçebileceği, bu nedenle eğer KYD ile HMGB1 nörondan eksozomlar aracılığıyla salıveriliyorsa bu eksozomların periferik kanda da tayin edilebileceği öngöröldü. Bu nedenle KYD'den sonra hem beyin korteksinden hem de plazmadan eksozomlar ayrıştırıldı. KYD'den sonra korteksten ayrıştırılan eksozomlar, kardinal eksozom belirteçlerinden CD63'e karşı antikorla kaplı boncuklarla yakalandıktan sonra CD63 ve diğer eksozom belirteçlerinden CD9 ve CD81'e karşı antikorlarla işaretlendi. Bu şekilde işaretlenen eksozomların varlığı akış sitometrisiyle doğrulandı (Şekil 4.4.)



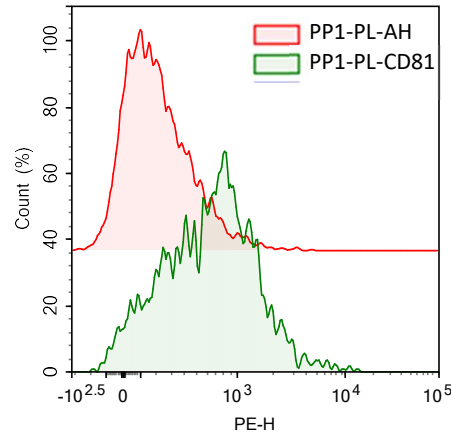
Şekil 4.4. Beyin korteksinden eksozomlar başarıyla ayrıştırılabiliyor. Ayrıştırılan eksozomlar, eksozom belirteçlerinden CD63'e karşı antikorla kaplı boncuklarla yakalandıktan sonra CD63, CD9 ve CD81'e karşı antikorlarla işaretlendi. Örneklerin eksozom içerikleri akış sitometrisiyle hem doğrulandı hem de karakterize edildi. Her örnek, biri işaretlenmemiş (*unstained*) diğeri ise floresan işaretli olmayan ancak aynı hayvanda üretilmiş izotip antikorla (Rat

IgG2 α veya Arm. H. IgG) işaretleme olmak üzere iki farklı kontrolle kıyaslandı. Burada gösterilen örnek CD63-4 olarak adlandırıldığı için grafiklerde her ölçüm, işaretlemesine göre, "CD63-4-CD81" gibi isimlendirilmiştir. Belirli kapılama stratejileri sonrasında elde edilen floresans şiddetinin eğrileri ve ortalama floresans şiddeti değerleri (PE-H) gösterilmektedir. Y eksenini her bir örnekte saptanan molekülün yüzde kaçının floresan molekül (PE) içerdiğini göstermektedir (*Count (%)*). Akış sitometrisi verilerinin analiz detayları için Gereç ve Yöntem bölümüne bakınız. Tüm belirteçler için izotipten en az %20 daha fazla floresans şiddeti ölçülmesi (şiddet eğrilerinde görsel olarak sağa kayma) eksozomların varlığını akış sitometrisiyle doğrular niteliktedir (n=3 fare). (İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İhsan Gürsel ve ekibinin katkıları ile yapılmıştır.)

4.3. Nöron Kökenli Eksozomların Periferik Kandan İzolasyonu

Beyin dokusundan total eksozomlar başarıyla ayrıştırıldıktan sonra, periferik kanda nöron kökenli eksozomların oranının %5'in altında olduğu ve HMGB1 diğer hücrelerden de salıverilebileceği için, plazmadan yalnızca nörondan salıverilen eksozomların ayrıştırılması amaçlandı (70). Eksozomların nörondan salıverildikten sonra dolaşıma geçmesinin zaman alacağı öngörüldüğünden bu deney grubu için tek KYD'den veya yalancı cerrahiden 1 saat; çoklu KYD deneyinde ise ilk KYD dalgasından 1 saat sonra örnekler toplandı. KYD'den 3 saat sonra dahi HMGB1'in immüno floresan olarak noktasal ve çekirdek sınırında işaretlenmeye devam ettiği göz önünde bulundurularak KYD'den 1 saat sonra korteks içinde hala HMGB1 içeren eksozomların mevcut olduğu öngörüldü. Anti-CD171 antikoru kaplı boncuklar kullanılarak plazmadan elde edilen eksozomların içinden nöron kökenli olanlar ayrıştırıldı (Şekil 4.5.). Korteksten elde edilen örneklerde nöron dışı hücrelerden HMGB1 salıverilmediği öngörüldüğünden hücre kökenli ayrıştırma yapılmadı.

Anti-CD171 kaplı boncuk, CD81 işaretlemesi

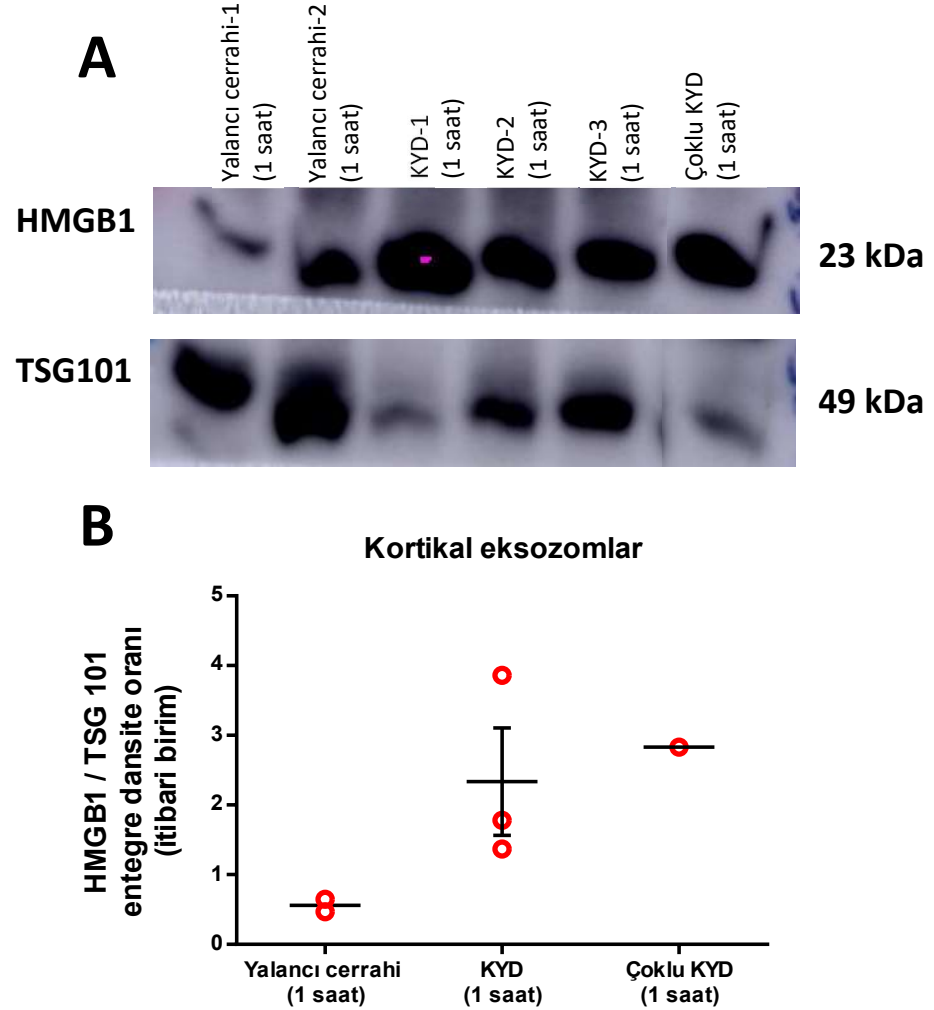


Örnek ismi	Ortalama floresans değeri (PE-H)
PP1-PL-AH	244
PP1-PL-CD81 *	861

Şekil 4.5. Plazmadan nöron kökenli eksozomlar başarıyla ayrıştırılabiliyor. KYD'den sonra elde edilen plazmadan ticari kit yardımıyla ayrıştırılan eksozomlar, nöron kökenli eksozomların yüzeyinde bulunan CD171'e karşı antikora kaplı boncuklarla yakalandıktan sonra CD81'e karşı antikora işaretlenmiştir. Burada gösterilen örnek PP1-PL olarak adlandırılmıştır. Her örnek, floresan işaretli olmayan ancak aynı hayvanda üretilmiş izotip antikora (PP1-PL-AH) işaretlemeye kıyaslandı. Belirli kapılama stratejileri sonrasında elde edilen floresans şiddetinin eğrileri ve ortalama floresans şiddeti değerleri (PE-H) gösterilmektedir. Y ekseninde her bir örnekte saptanan molekülün yüzde kaçının floresan molekül (PE) içerdiğini göstermektedir (*Count (%)*). Akış sitometrisi verilerinin analiz detayları için Gereç ve Yöntem bölümüne bakınız. İzotipte ölçülenden en az %20 daha fazla floresans şiddeti ölçülmesi (şiddet eğrilerinde görsel olarak sağa kayma) plazmadaki nöron kökenli eksozomların varlığını akış sitometrisiyle doğrular niteliktedir (n=3 fare). (İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İhsan Gürsel ve ekibinin katkıları ile yapılmıştır.)

4.4. Kortikal Eksozomların HMGB1 Taşıdığıının Gösterilmesi

Elde edilen kortikal eksozomların HMGB1 içeriği Western blotlama yoluyla incelendi (Şekil 4.6.). Eksozomların ortak yüzey belirteçlerinden olan TSG101, yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Western blotlama sonucunda KYD sonrasında HMGB1'in eksozomlar içinde taşındığı gösterildi.



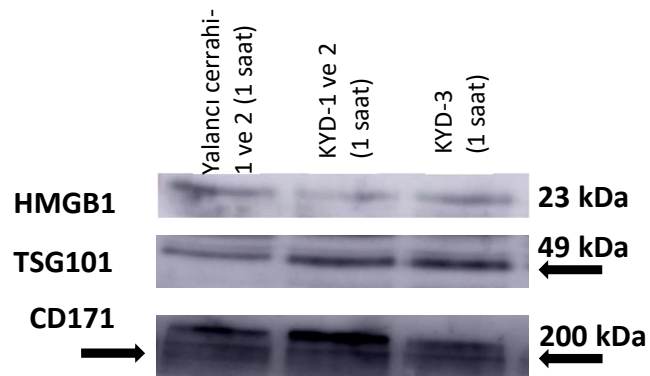
Şekil 4.6. KYD'den sonra kortekste saliverilen eksozomlar HMGB1 içeriyor. **A:** Western blotlama bantları. Her bir çember bir hayvandan elde edilen örneği temsil etmektedir. **B:** Eksozomların içerdikleri HMGB1 miktarının TSG101 miktarına göre normalizasyonu. Her örnekten 30 µg protein yüklenmesine rağmen örneklerdeki eksozom belirteci TSG101 miktarının farklı olması nedeniyle TSG101 bantlarının yoğunluğuna göre normalizasyon yapıldı. KYD'den sonra alınan örneklerde belirgin miktarda fazla HMGB1 bulunduğu görüldü. Sadece bir deney hayvanında çoklu KYD modellendiğinden istatistiksel analize bu veri

dahil edilmedi. Yalancı cerrahi ve KYD grubu arasında sınırlı düzeyde anlamlı fark bulundu (Mann-Whitney *U* testi, $p=0,08$). (İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İhsan Gürsel ve ekibinin katkıları ile yapılmıştır.)

KYD'den sonra elde edilen kortikal eksozomların HMGB1 içerdiği net biçimde gösterildi. Örnekler arasında varyasyonun yüksek olmasının gözle görülen farkın istatistiksel olarak sınırlı sonuçlanmasına neden olduğu düşünüldü. Çoklu KYD tetiklendikten sonra alınan tek örnekte HMGB1 içeriği tek KYD grubunda ölçülene benzer düzeyde bulundu. Birden fazla KYD'nin daha yoğun bir HMGB1 saliverilmesine neden olmadığı yönünde elde edilen izlenime rağmen bu bulgunun daha çok fareden alınan örnekler incelenerek doğrulanması gerekmektedir.

4.5. Nöron Kökenli Plazma Eksozomlarının HMGB1 Taşıdığıının Gösterilmesi

KYD ile saliverilen eksozomların parankim dışında periferik kana ulaşp ulaşmadığını incelemek amacıyla kortikal eksozomların ayrıştırıldığı farelerin plazmalarından ayrıştırılan nöron kökenli eksozomlarda Western blotlama ile HMGB1 tayini yapıldı (Şekil 4.7.)



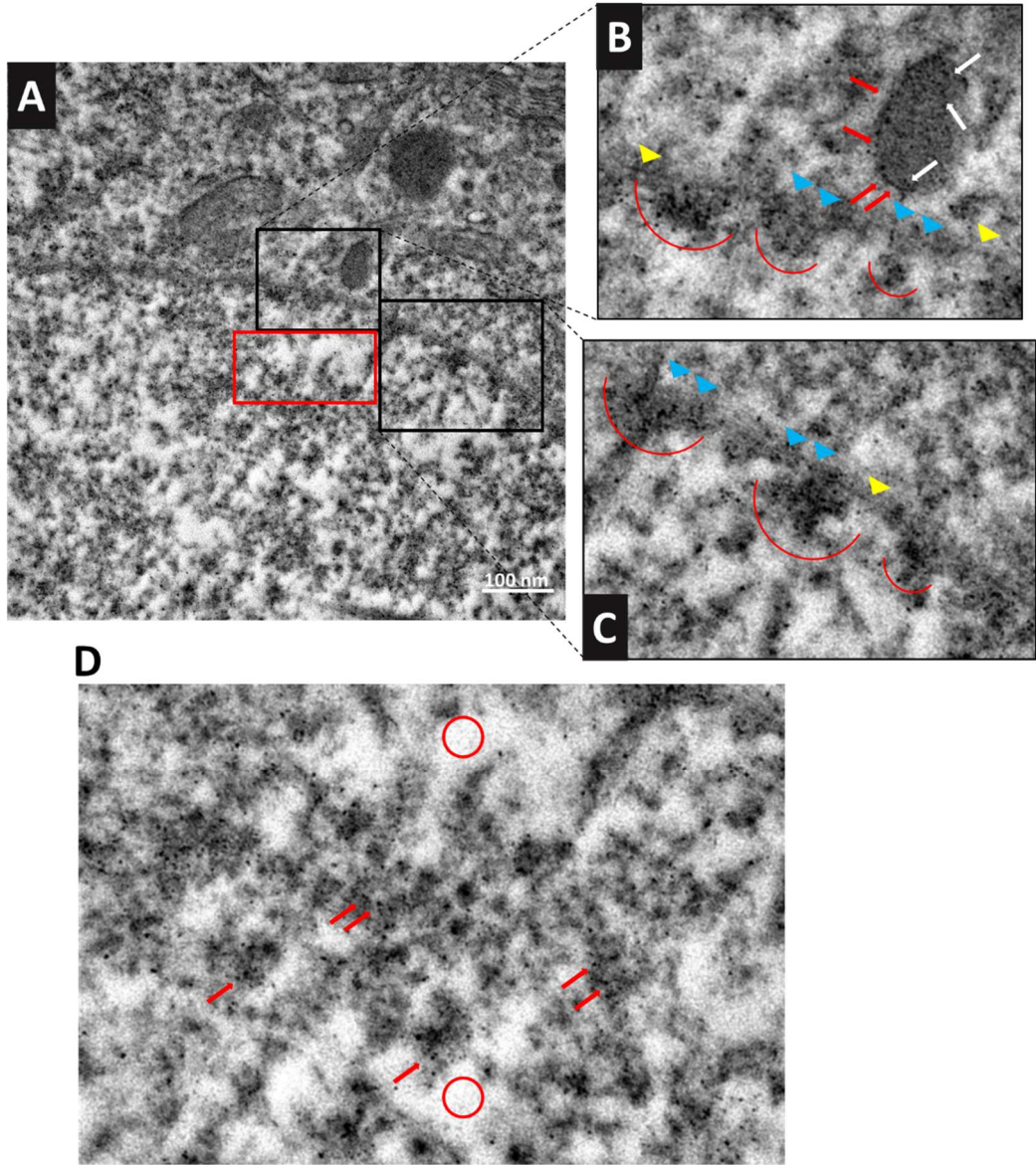
Şekil 4.7. KYD'den sonra nöronlardan eksozom içinde saliverilen HMGB1 periferik kanda saptanabiliyor. KYD ile nöronlardan saliverilen ve plazmaya ulaşan eksozomların HMGB1 içerdiği Western blotlama ile gösterildi. Gruplardaki veri sayısı az olduğundan istatistiksel analiz yapılmadı. (İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İhsan Gürsel ve ekibinin katkıları ile yapılmıştır.)

Yapılan deneyler ilk kez KYD ile nöronların HMGB1'i eksozomlar aracılığıyla salıverdiğini ve bu eksozomların periferik dolaşıma kadar ulaşabildiğini göstermektedir. Yapılan Western blotlamada HMGB1'in yanı sıra, TSG101 (ortak eksozom belirteci) ve CD171 (nöron kökenli eksozom belirteci) bantlarının da görülmesi eksozomların başarılı biçimde izole edilebildiğini göstermektedir. Ancak deneylerin yöntemsel olarak iyileştirilmesi gereklidir. İntrakardiyak yolla fareden tek seferde en fazla 1 ml tam kan toplanabildiği ve bu kanın yalnızca %50-60'ını plazma oluşturduğu için başlangıç örnek hacmi oldukça düşüktür. Buna paralel olarak izolasyon sonunda bireysel örneklerin içerdiği nöron kökenli eksozom miktarları az olduğundan aynı gruptaki örnekler içerdikleri protein miktarına göre havuzlanarak elde edilen tüm nöronal eksozom lizatları yüklenmiştir. Bu nedenle Western blotlama için yüklenen protein miktarı üç örnekte farklı olduğundan bu deney sonunda sayısal bir analiz yapılmamıştır. Denek sayısının artırılmasıyla veya sıçan gibi örnek hacminin daha yüksek olacağı bir deney hayvanı kullanılmasıyla kontrol grubuyla KYD arasındaki fark net biçimde ortaya konabilir.

4.6. HMGB1 Salıverilmesinin İmmünoaltın İşaretlemeyle

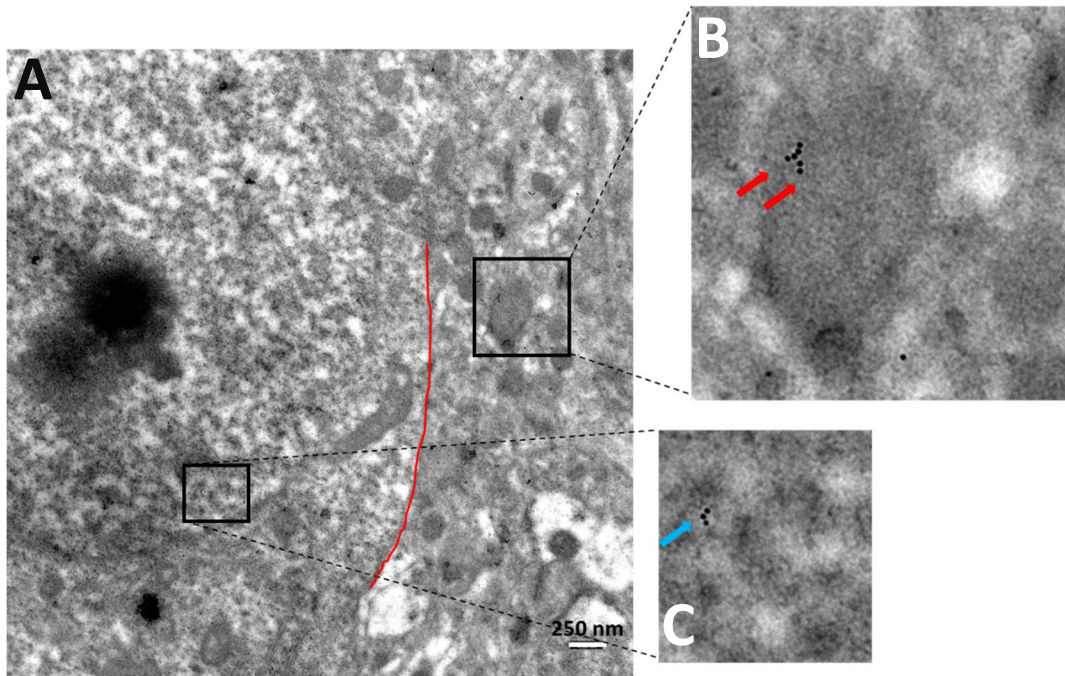
Gösterilmesi

İmmünofloresan işaretlemede noktasal işaretlenme paterninin görüldüğü zaman noktalarında (KYD'den 15 dakika ve 3 saat sonra) HMGB1-vezikül ilişkisini göstermek üzere koloidal altınla konjuge sekonder antikor kullanılarak immünoelektron mikroskopisi yapıldı. Böylece HMGB1'in veziküller aracılığıyla salıverildiğine daha doğrudan bir delil sağlandı (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.).



Şekil 4.8. KYD'den 15 dakika sonra ipsilateral kortekste HMGB1 çekirdekten veziküller aracılığıyla saliveriliyor. Şekilde çekirdek içinde kolayca ayrılabilen heterokromatin alanlarına sahip olmasından nöron olduğu öngörülen bir hücrenin immünoaltın işaretleme sonucunda elde edilen görüntüsü yakınlştırılarak gösterilmiştir. 5 nm çapında altınla konjuge sekonder antikor kullanılarak HMGB1 işaretlenmiştir. **A:** Görüntüde alt yarıda hücre çekirdeği, üzerinde sitoplazmasıyla bir nöron görülmektedir. **B ve C:** Nükleer membran sınırında siyah çerçeveye belirtilen alanların yakın görüntüsü incelendiğinde, kırmızı yarım çemberle nükleer membran arasında kalan bölgelerde altın işaretlemesinin yoğunlaştığı görülmektedir. Bu bölgelere komşu nükleer membranın devamlı olmaması (mavi ok başları), HMGB1'in nükleer porlardan çıktığını işaret etmektedir. Nükleer membranın

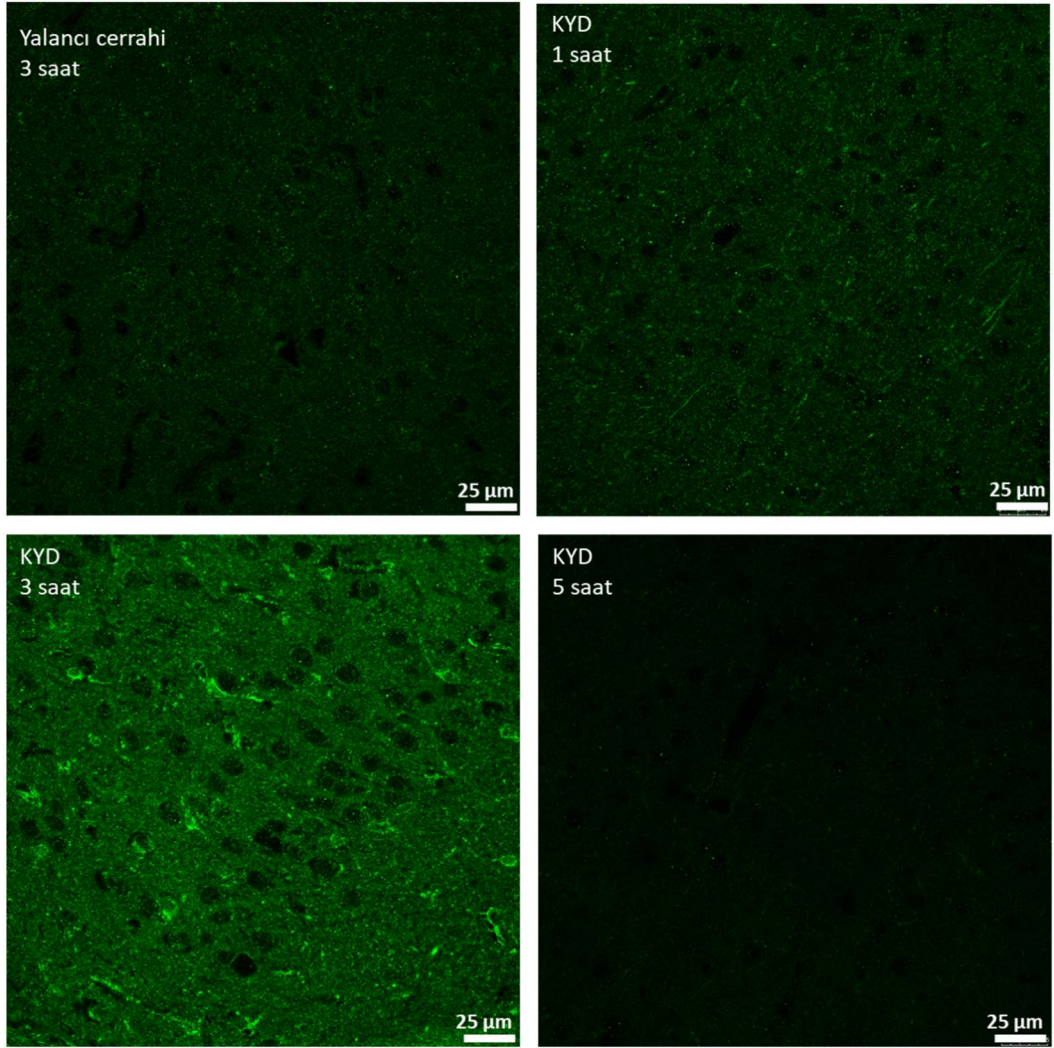
devamlılık halinde (sarı ok başı) olduğu bölgelerde altın işaretlemesinin yoğunlaşmadığı görüldü. **B'**de nükleer membrana yakın komşuluktaki vezikülün hem çerperinde (kırmızı oklar) hem de içinde (beyaz oklar) HMGB1 işaretlemesinin olduğu görülmektedir. Bu vezikül büyüklük bakımından eksozomlarla uyumludur (<100 nm). **D:** A'da kırmızı çerçeveye belirtilen bölgenin büyütülmüş görüntüsü. HMGB1 saliverilmekle beraber hala bir miktarı kromatine bağlı olarak konumlanmaktadır (kırmızı oklar). Kromatinin olmadığı alanlarda (kırmızı çeremberler) herhangi bir altın işaretlemesinin olmaması işaretlemenin özgüllüğünü vurgulamaktadır. (n=1 fare) (Ankara Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Esra Erdemli'nin katkıları ile yapılmıştır.)



Şekil 4.9. HMGB1 içeren veziküller, KYD'den 3 saat sonra ipsilateral kortekste izlenmeye devam ediyor. 10 nm çapında altınla konjuge sekonder antikor kullanılarak HMGB1 işaretlenmiştir. **A:** Görüntüde sol üstte nöronun çekirdeği, sağda ise sitoplazması görülmektedir. Kırmızı çizgi ile nöronun membranı belirginleştirilmiştir. **B:** Nörona komşu bir hücre sitoplazması içerisinde bir vezikülün içinde (kırmızı oklar) HMGB1 işaretlemesi görüldü. **C:** Çekirdeğin kesite dahil kısmında yalnızca birkaç tane altın ile HMGB1 işaretlenmesi (mavi ok) görüldü. (n=1 fare) (Ankara Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Esra Erdemli'nin katkıları ile yapılmıştır.)

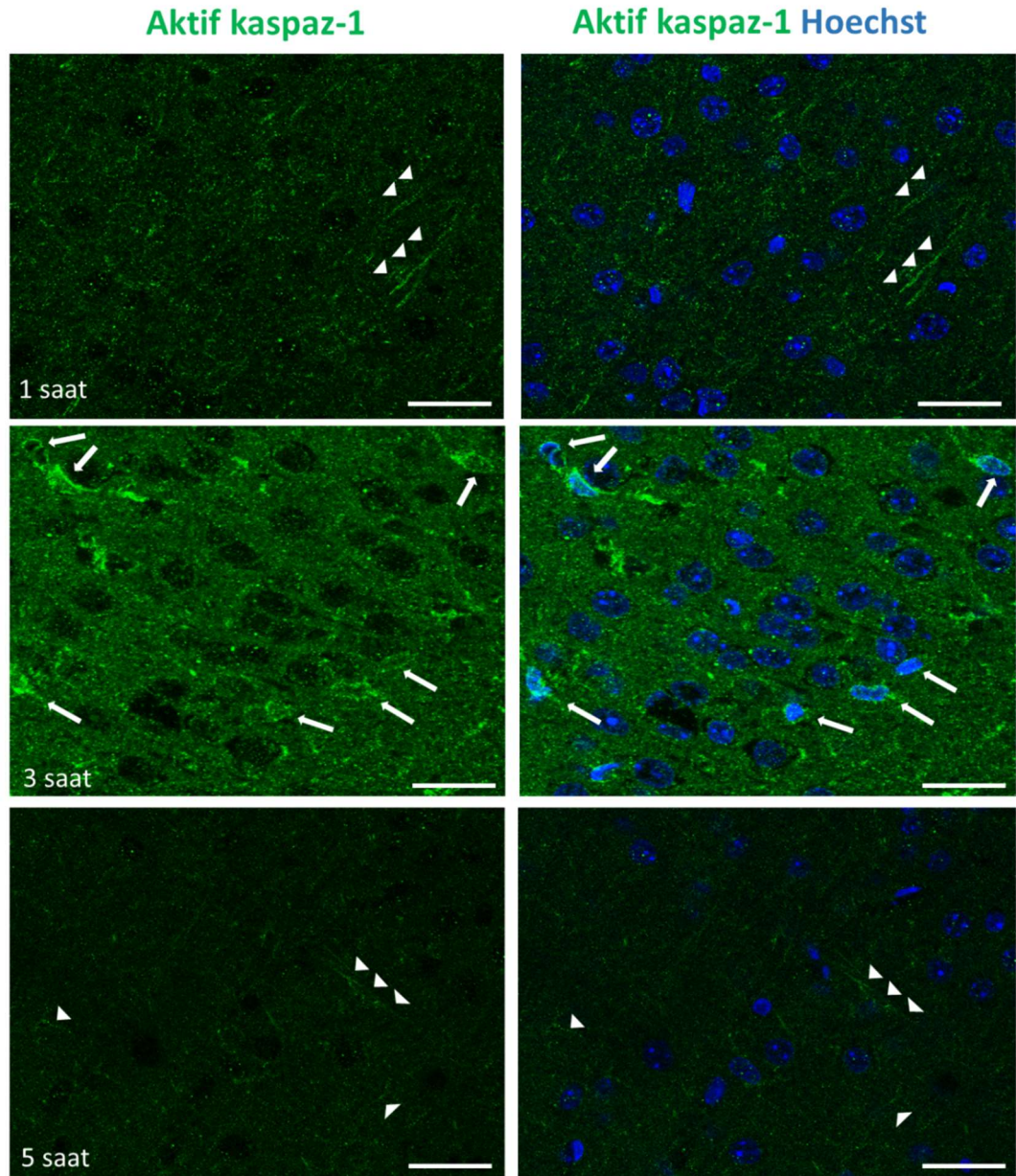
4.7. Kaspaz-1 Aktivitesinin İmmünofloresan İşaretlemeyle İncelenmesi

KYD ile oluşan inflamazom kompleksinin bir fonksiyonu kaspaz-1'i aktivelemesidir. Ancak bu aktivitenin ne kadar devam ettiği bilinmemektedir. Kaspaz-1 aktivitesinin sönmesi astrositler üzerindeki inflamatuvar uyarımı sonlandıracağından inflamasyonun çözülmesinde kritik bir öneme sahiptir. Bu nedenle, KYD'den 1, 3 ve 5 saat sonra korteksteki kaspaz-1 aktivitesi aktif kaspaz-1'in immünofloresan işaretlenmesi ile incelendi (Şekil 4.10.). CARD bölgesinden ASC'ye bağlandıktan ve homodimerize olduktan sonra kaspaz-1 kesilerek inflamazom kompleksinden ayrılır. Aktif kaspaz-1 p20 ve p10 alt birimlerini içerir. Kaspaz-1 aktivitesini incelemek için kesilmiş p20'yi tanıyan antikor kullanıldı. Tüm gruplar için 3'er farklı fare incelendiğinde aktif kaspaz-1 işaretlenmesi KYD'den 1 saat sonra uzantılarda ve bazı hücrelerin somalarında noktasal biçimde görülürken; KYD'den 3 saat sonra diffüz biçimde hem somada hem de uzantılarda görüldü. Bu zaman noktasında diğer zaman noktalarına kıyasla işaretleme floresan şiddetinde görsel bir artış tespit edildi. Buna karşın KYD'den 5 saat sonra somada kaspaz-1'in sinyal elde edilemeyecek kadar azaldığı ve uzantılardaki işaretleme soluklaştığı gözlemlendi. En belirgin işaretleme KYD'den 3 saat sonra görüldüğü için yalancı cerrahi yapıldıktan 3 saat sonra çıkarılan beyin kontrol grubu olarak kullanıldı.



Şekil 4.10. KYD'den 1, 3, 5 saat sonra ve yalancı cerrahiden 3 saat sonra ipsilateral kortekste aktif kaspaz-1 farklı paternde ve yoğunlukta işaretleniyor. KYD'den 3 saat sonra uzantılar, soma ve nöropilde belirgin işaretlenme görüldü. KYD'den 5 saat sonra ise işaretlenmenin anlamlı biçimde azaldığı görüldü (n=3 fare). Konfokal mikroskopi, ölçek 25 µm.

KYD'den 1, 3 ve 5 saat sonra ipsilateral kortekste aktif kaspaz-1 işaretlenmesinin hücresel detayları Şekil 4.11.'de gösterilmiştir.

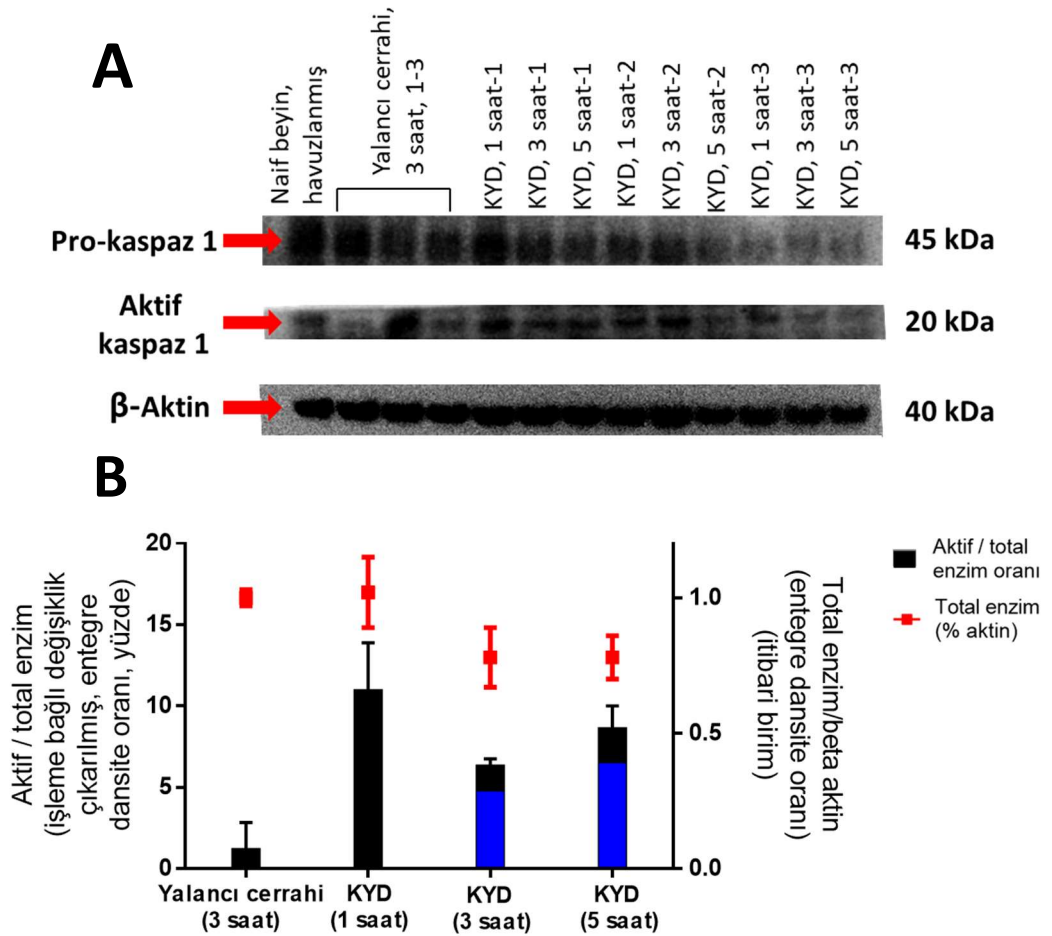


Şekil 4.11. KYD'den 1, 3 ve 5 saat sonra ipsilateral kortekste aktif kaspaz-1 işaretlenmesinin hücresel detayları. Şekil 4.10.'da gösterilen görüntüler, büyütülmüş biçimde tekrar sunulmuştur. KYD'den 1 saat sonra uzantılardaki hafif işaretlenme (ok başları), 3 saat sonra ise uzantılarla beraber soma (oklar) ve nöropilde belirgin işaretlenme tespit edildi. 5 saat sonra ise aktif kaspaz-1 sadece uzantılarda sönük biçimde (ok başları) görüntülendi. Konfokal mikroskopi, ölçek 25 μm .

İmmünofloresan işaretlemeyle zaman noktaları arasında hem işaretlenen hücre kompartmanı hem de floresan yoğunluğu açısından belirgin fark bulundu. Nöropildeki görüntüyü yüksek olasılıkla dendritlerin oluşturduğu izlenimiyle, bu işaretlenmenin nöronda görüldüğü ve nöropildeki yoğunluğun kesite farklı açılardan giren çok sayıda uzantıdaki işaretlenmenin sonucu olduğu düşünüldü.

4.8. Kaspaz-1 Aktivitesinin Western Blotlama ile İncelenmesi

İmmünofloresan işaretleme ile gözlenen bulgu Western blotlama yöntemiyle enzimin kesilmemiş (pro) ve aktif formlarının miktarlarına göre doğrulanmak istendi. Bu amaçla yalancı cerrahiden 3 saat sonra ve KYD'den 1, 3 ve 5 saat sonra elde edilen korteks lizatlarının aktarıldığı membran aktif kaspaz-1'e yönelik antikorla işaretlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. KYD'den 3 saat sonra ipsilateral kortekste kaspaz-1 aktivitesi azalıyor. **A:** Western blotlama bantları. 45 kDa ağırlığında pro-kaspaz-1, 20 kDa ağırlığında kesilmiş (aktif) kaspaz-1 görülmektedir. Western blotlama öncesinde proteinler denatüre edildiği için immünofloresan işaretlemenin aksine, antikor pro kaspaz-1 içinde p20'ye ait sekansı tanıyabilmektedir. Her örnekten 40 μ g yüklendi. 3 farklı naif beyin her birinden 13 μ g alınarak havuzlanmasıyla ilk örnek elde edildi. Total enzim miktarının kıyaslanması için yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanıldı. **B:** Total enzim içindeki aktif fraksiyonun tayini için aktif kaspaz-1 bandının entegre yoğunluk değeri, total enzimin (aktif + pro formu) entegre yoğunluk değerine kıyaslandı. Yalnızca yapılan deneyin oluşturduğu etkiyi görebilmek için naif beyindeki aktif enzim oranı tüm örneklerden çıkarıldı. Siyah kolonlar ile aktif enzimin total enzime oranı belirtilmiştir (sol Y eksen). Nokta grafiği (kırmızı) ile örneklerdeki total enzim miktarının aktive oranı verilmiştir (sağ Y eksen). KYD'den 3 ve 5 saat sonraki örneklerde görülen mavi kolonlar bu örneklerde total enzim miktarının azalması sebebiyle; aktif enzimin azalan total enzim miktarına göre normalize edilmesinin sonucunu göstermektedir (n=3 fare, ortalama \pm standart sapma). (Aktif enzim oranı için normalize

edilmiş değerler ile tek yönlü varyans analizi, $p=0,08$; total enzim miktarı için $p=0,29$)

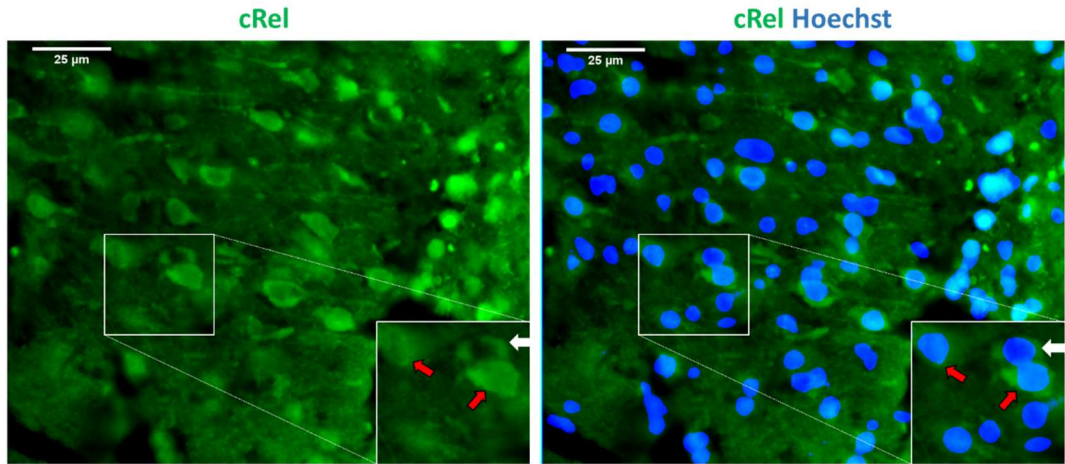
Western blotlama için beyinler *in situ* fiksasyon yapılmadan çıkarılıp homojenize edilene kadar kaspaz-1 aktivasyonu gerçekleşmektedir (71, 72). Bu nedenle daha önce bu tür çalışmalarda da yapıldığı gibi naif beyin örneğinde görülen aktif enzim oranı işleme bağlı değişiklik olarak kabul edilip tüm örneklerden bu oran çıkarıldıktan sonra analiz yapıldı. Buna göre toplam enzim miktarının KYD'den 3 saat sonra %22 azaldığı ve 5 saat sonra aynı düzeyde kaldığı saptandı (tek yönlü varyans analizi; $p=0,29$; $n=3$). Bununla beraber total enzim içindeki aktif enzim oranı KYD'den 1 saat sonra $11\pm 3,0$ iken, 3 ve 5 saat sonra sırasıyla $5\pm 0,4$ ve $6\pm 1,1$ olarak ölçüldü (tek yönlü varyans analizi; $p=0,08$; $n=3$). Elde edilen verilere göre ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak sınırlı anlamlı düzeyde KYD'den sonra 1. saate göre 3. ve 5. saatlerde hem aktif kaspaz-1'in total enzim popülasyonu içindeki oranında hem de total enzim popülasyonunda azalma görüldü.

Western blotlama sırasında örnekler denatüre edildiğinden antikorun tanıyacağı tüm epitoplara işaretlenmeye hazır durumdadır. Ancak immünofloresan işaretlemeye beyin dokusu *in situ* fikse edildiği için ancak ulaşılabilir konumdaki epitoplara antikor bağlanabilmektedir. Kaspaz-1, birçok farklı proteinle etkileşim içinde olduğu için bir noktada çıkarılan beyinde hücredeki tüm epitoplara açık konumda olmayabilir (73). Bu nedenle dokudaki protein seviyesinin niceliksel olarak değerlendirilmesinde yarı-niceliksel sonuç sağlayan Western blotlama ile elde edilen veri tercih edilmelidir. İmmünofloresan işaretleme ise sinyalin hücre fenotipi ve kompartmanına göre hatta organel düzeyinde saptanmasını sağlamaktadır. Bu nedenle immünofloresan işaretleme üzerinden sadece niteliksel değerlendirmelerin yapılması daha sağlıklıdır. KYD'den 3 saat sonra görülen işaretlenmedeki artış ve paternindeki farklılığın aktivitesi azalan kaspaz-1'in antikorun daha rahat erişebileceği, daha serbest bir konformasyonda olduğu izlenimi vermektedir. Bu durum, KYD'den 3 saat sonra total enzim düzeyinde görülen azalma ile

uyumludur. Bununla beraber, KYD'den 5 saat sonra immünofloresan işaretlemeye neredeyse saptanamayacak düzeyde sinyal alınmasının da kaspaz-1 total protein düzeyinin azalmasının sonucu.

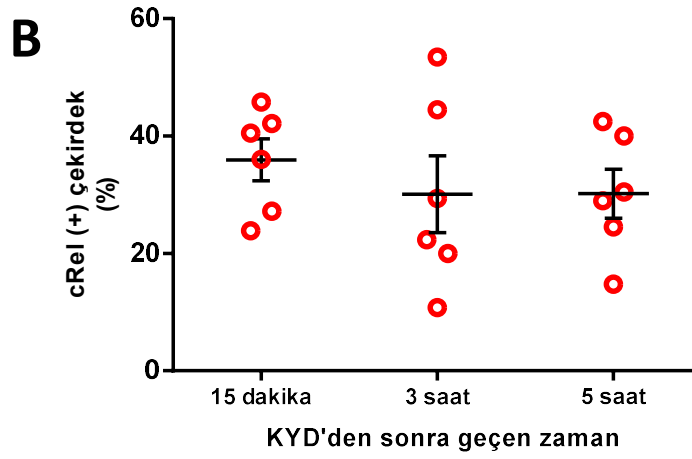
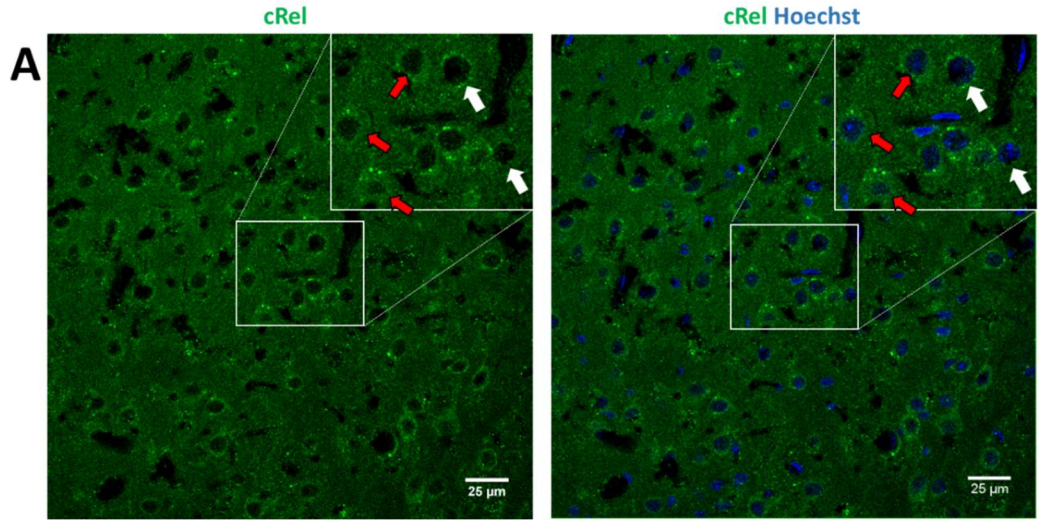
4.9. KYD ile NF-kappa B p65 ve cRel'in Hücre İçi Yer Değişimleri

KYD ile nöronlardan salıverilen HMGB1 ve Il-1 β 'nın astrositlerde NF-kappa B ailesinin pro-inflamatuvar nitelikli p65 alt birimini aktifleştirdiği daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (4, 69). Tez çalışmamızda ise, KYD'den bir süre sonra p65 aktivitesinin sonlanmasının ve inflamasyon çözülmesinde görevli cRel'in aktifleşmesinin inflamasyonun çözülmesine katkıda bulunduğu hipotezi test edildi. p65'in tek KYD ile aktifleştiği gösterilmesine karşın cRel'in aktifleşmesi için tek KYD'nin yeterli uyarımı sağlayacağı bilinmediğinden cRel aktivitesi başlangıçta çoklu KYD tetiklenmiş beyinde değerlendirildi. Bir saat boyunca 1 M KCl emdirilmiş pamuk topunun dura üzerine uygulanmasıyla dokuz tane KYD tetiklendi. İlk KYD dalgasından bir saat sonra beyin çıkarıldı. Alınan 20 μ m'lik kesitlerde tarama amacıyla cRel pozitifliği, Hoechst ile işaretlenen hücreler üzerinden incelendi (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. Çoklu KYD'den sonra ipsilateral kortekste cRel aktifleşiyor. Kırmızı oklar nükleer translokasyon sonucu çekirdekte cRel işaretlenmesinin görüldüğü aktif hücreleri, beyaz ok ise cRel işaretlenmesinin yalnızca sitoplazmik olduğu inaktif hücreyi temsil etmektedir. Epifloresan mikroskop, ölçek 25 μ m (n=1 fare).

Çoklu KYD sonrasında cRel alt biriminin aktifleşerek hücre çekirdeğine geçtiği gösterildikten sonra migren aurasını daha iyi yansıtacağı düşünülerek tek KYD sonrasında cRel ve p65 aktivasyonu incelendi. cRel ve p65'in aktivasyon seviyelerinde zaman içinde değişiklik olabileceği öngörülerek farklı zaman noktalarında değerlendirmeler yapıldı. Kullanılan üretan anestezisi terminal bir anestezi olduğundan en ileri zaman noktası olarak 5 saat belirlendi. Başlangıçtaki tarama deneylerinde KYD'den 15 dakika, 3 saat ve 5 saat sonra tüm çekirdeklerdeki cRel ve p65 pozitifliği, Hoechst ile işaretlenen hücre çekirdekleri üzerinden değerlendirildi (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).



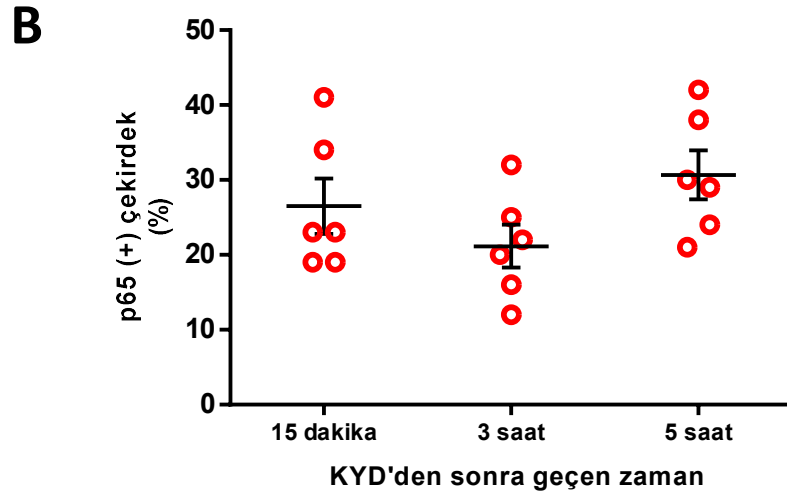
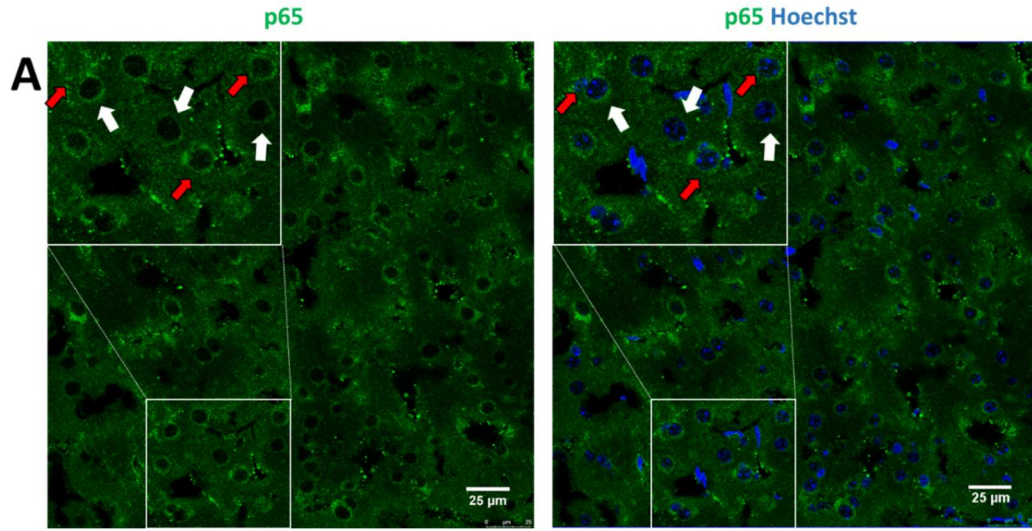
C

	Fare sayısı	Değerlendirilen hücre sayısı	cRel (+) çekirdek oranı (% , ortalama±SH)
KYD (15 dakika)	3	635	36±3,6
KYD (3 saat)	3	708	30±6,6
KYD (5 saat)	3	594	30±4,2

Şekil 4.14. Tek KYD ile cRel hemen aktifleşiyor. **A:** KYD'den 5 saat sonra ipsilateral kortekste tüm hücrelerdeki cRel işaretlenmesinin temsili görüntüsü. Kırmızı oklar nükleer cRel işaretlenmesinin görüldüğü aktif hücreleri, beyaz oklar ise cRel işaretlenmesinin yalnızca sitoplazmik olduğu inaktif hücreyi temsil etmektedir. Konfokal mikroskop, ölçek 25 µm. **B:** cRel'in aktif durumda olduğu hücrelerin tüm hücrelere oranını gösteren grafik. Kırmızı çemberlerin her biri değerlendirilen bir alandaki oranı göstermektedir (Tek yönlü varyans analizi; $p=0,62$; $n=3$ fare; ortalama±SH). **C:** Belirtilen zaman noktalarında incelenen

toplam hücre sayısı ve cRel'in aktif durumda olduğu hücre oranını gösteren tablo.

Tüm hücreler üzerinden yapılan tarama deneylerinde cRel'in KYD ile hemen aktifleşerek hücre çekirdeğine geçtiği ve bu aktivasyonun en az 5 saat süreyle devam ettiği görüldü. Sırasıyla KYD'den 15 dakika, 3 saat ve 5 saat sonra tüm hücrelerin $36\pm3,6$; $30\pm6,6$ ve $30\pm4,2$ 'sinde cRel aktif durumdayken bu zaman noktaları arasında anlamlı fark bulunmadı (tek yönlü varyans analizi; $p=0,62$; $n=3$ fare).



C	Fare sayısı	Değerlendirilen hücre sayısı	p65 (+) çekirdek oranı (% , ortalama±SH)
KYD (15 dakika)	3	673	27±6,1
KYD (3 saat)	3	554	24±2,8
KYD (5 saat)	3	709	31±3,3

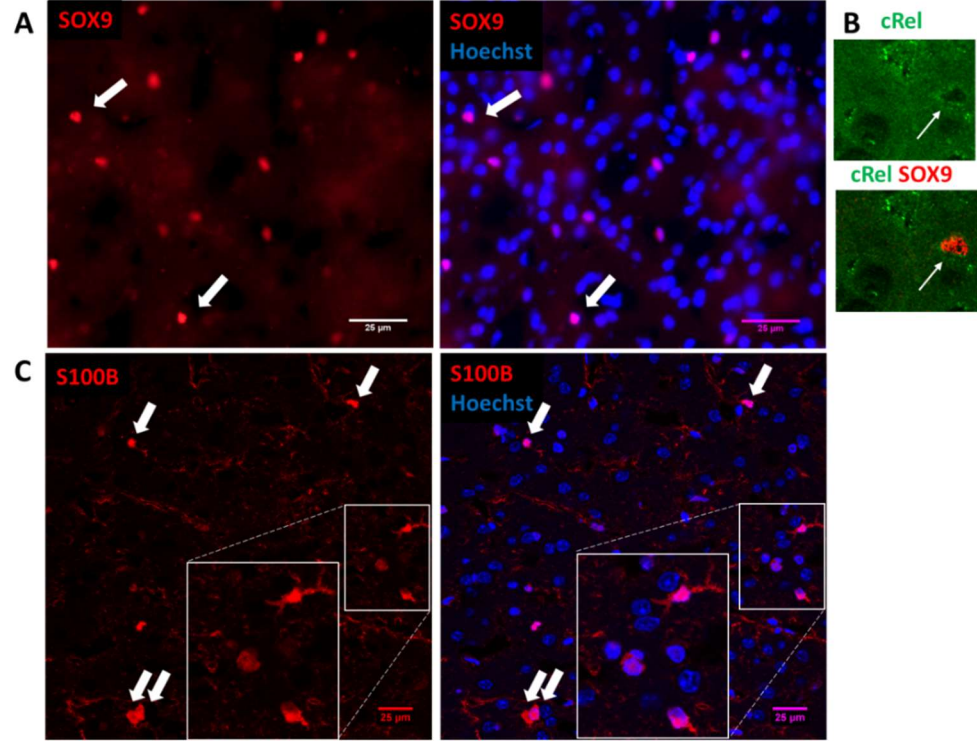
Şekil 4.15. KYD ile aktifleşen p65'in aktif durumda olduğu hücre oranında 5 saat boyunca değişiklik olmuyor. **A:** KYD'den 5 saat sonra ipsilateral kortekste tüm hücrelerdeki p65 işaretlenmesinin temsili görüntüsü. Kırmızı oklar nükleer p65 işaretlenmesinin görüldüğü aktif hücreleri, beyaz oklar ise p65 işaretlenmesinin yalnızca sitoplazmik olduğu inaktif hücreyi temsil etmektedir. Konfokal mikroskop, ölçek 25 µm. **B:** p65'in aktif durumda olduğu hücrelerin tüm hücrelere oranını gösteren grafik. Kırmızı çemberlerin her biri değerlendirilen bir alandaki oranı

göstermektedir (tek yönlü varyans analizi; $p=0,16$; ortalama \pm SH). **C:** Belirtilen zaman noktalarında incelenen toplam hücre sayısı ve p65'in aktif durumda olduğu hücre oranını gösteren tablo.

Tüm hücreler üzerinden yapılan tarama deneylerinde cRel'in KYD ile hemen aktifleşerek hücre çekirdeğine geçtiği ve bu aktivasyonun en az 5 saat süreyle devam ettiği görüldü. Sırasıyla KYD'den 15 dakika, 3 saat ve 5 saat sonra tüm hücrelerin $27\pm 6,1$; $24\pm 2,8$ ve $31\pm 3,3$ 'ünde p65 aktif durumdayken bu zaman noktaları arasında anlamlı fark bulunmadı (tek yönlü varyans analizi; $p=0,16$; $n=3$ fare). Zaman noktaları arasında p65 aktivasyonu açısından anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen; KYD'den 5 saat sonra, 3 saat sonrasına göre bir miktar hücrede daha p65 aktivasyonu olduğu söylenebilir. Karataş ve ark.'nın yaptığı çalışmada p65'in astrositlerde aktifleştiği gösterilmiştir (4). p65'in aktif durumda olduğu hücre oranında KYD'den 5 saat sonra olası bir miktar artış görülmesi bu zaman noktasında astrositlerin yanı sıra nöronlarda da aktivasyonun görüldüğünü ifade ediyor olabilir. Bu nedenle p65 ve cRel aktivasyonunun hücre fenotiplendirmesiyle değerlendirilmesi gerektiğine karar verildi.

NF-kappa B'nin astrositlerde aktifleştiği bilindiği için hücre fenotiplendirmesinin astrositler üzerinden yapılması gerektiği düşünüldü. Bu nedenle başlangıçta astrosit belirteçleri kullanıldı (Şekil 4.16.). Yaygın astrosit belirteci ALDH1L1 ile cRel işaretlemesi farklı protokollerle denenmesine rağmen optimum düzeyde işaretlenme sağlanamadı. GFAP işaretlemesiyle astrositlerin yalnızca bir kısmının değerlendirilebildiği literatürde gösterildiği için astrosit belirteci olarak GFAP tercih edilmedi (74). Bir diğer astrosit belirteci olan S100B ile işaretleme yapıldığında, tüm hücrelerin %10'undan daha azının işaretlenebildiği, işaretlenen astrositlerin fenotipik olarak protoplazmik astrositlerle uyumlu olduğu görüldü. Bu nedenle S100B tercih edilmedi. Literatüre yakın zamanda kazandırılan nükleer astrosit belirteci SOX9 kullanılan bir diğer astrosit belirteciydi (74). Ancak yapılan işaretlemede tüm hücrelerin yaklaşık %10'unun işaretlendiği görüldü. Farklı yayınlarda farklı sonuçlar elde edilmesine rağmen kortekste tüm hücre popülasyonunda

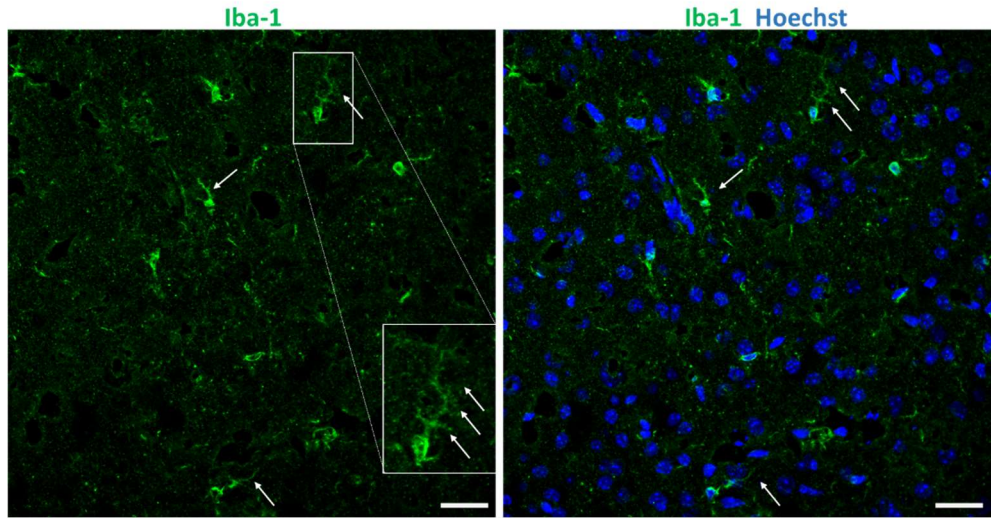
astrozitlerin oranı en az %20-30 olduğu için bu belirteçler üzerinden yapılan değerlendirmelerde hata payının yüksek olacağı ve az sayıda hücre incelendiği için analiz gücü düşük olacağından astrosit belirteciyle değerlendirme yapmak güvenilir bulunmadı.



Şekil 4.16. SOX9 ve S100B ile astrositlerin tümü işaretlenmiyor. **A:** SOX9 işaretlemesi ile astrositlerin yalnızca çekirdeği işaretlenmektedir. Epifloresan mikroskop, ölçek 25 µm. **B:** KYD'den 3 saat sonra cRel-SOX9 çifte işaretlemesi. cRel'in çekirdeğe transloke olduğu SOX9 (+) astrosit okla gösterilmiştir. SOX9 ile üst üste çakıştırılan görüntüde çekirdeğin turuncu renginde görünmesi bu çekirdekte hem cRel'in hem SOX9'un işaretlendiğini göstermektedir. **C:** S100B işaretlemesi ile astrositlerin hem çekirdek hem sitoplazmaları işaretlenmektedir. S100B pozitif astrositlerin uzantılarının nispeten kalın ve kısa mesafeler boyunca uzanıyor olması bu belirtecin protoplazmik astrositlerde bulunduğunu göstermektedir. Konfokal mikroskop, ölçek 25 µm.

Astrosit belirteçlerinin astrositlerin tümünü kapsamaması nedeniyle hücre fenotiplendirmesine korteksteki matür nöronların tümünün çekirdeğinde olduğu bilinen ve literatürde oldukça iyi tanınan NeuN proteininin

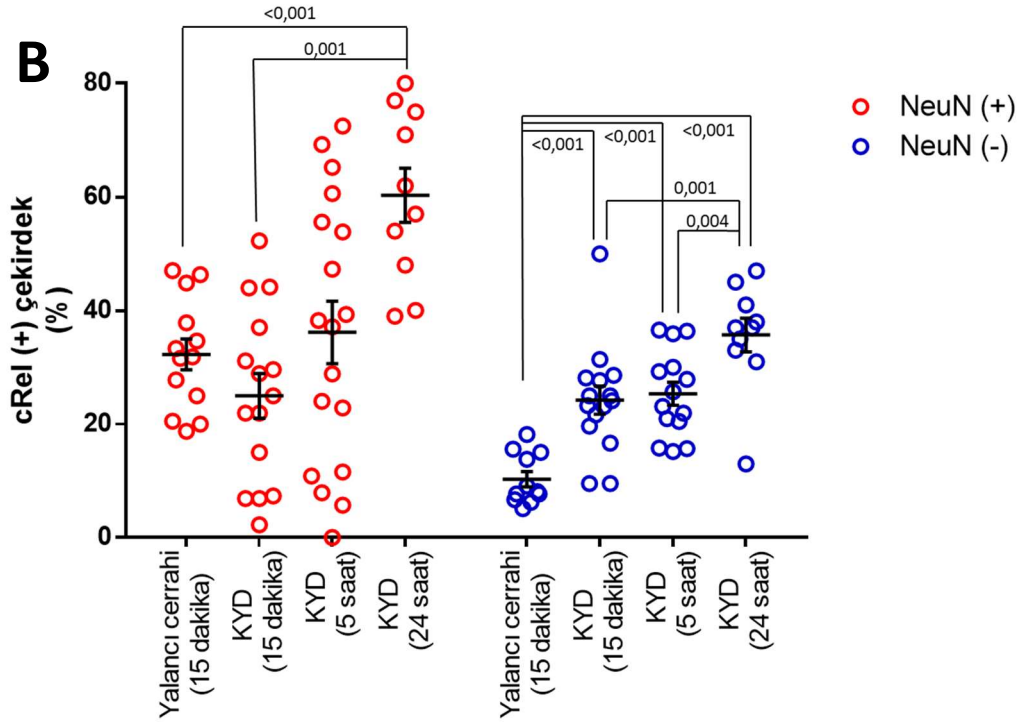
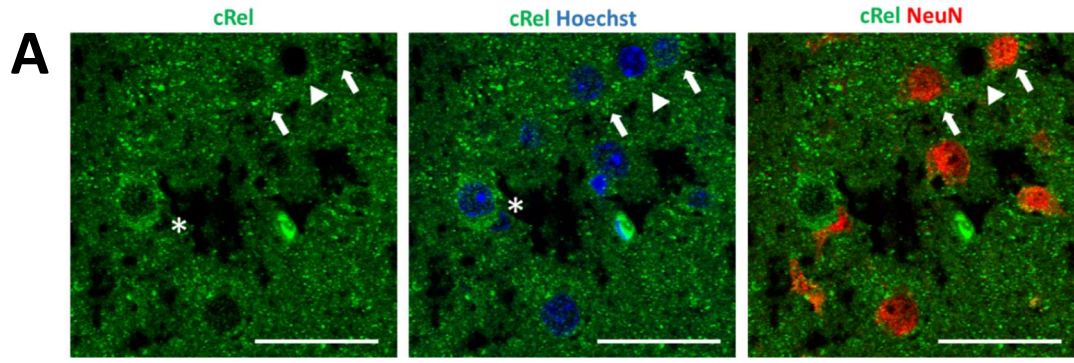
işaretlemesiyle devam edildi (75). Böylece NeuN pozitif nöronlarla NeuN negatif glialar kıyaslandı. Bu şekilde yapılan değerlendirmede astrositler kesin olarak belirlenemeyecek olmasına rağmen oligodendrositlerin sayıca az olması, nörona komşu konumlanmalarıyla kolayca ayırt edilebilmesi ve NF-kappa B üyelerini az miktarda ifade etmesi (76) sebepleriyle değerlendirmede karıştırıcı etkisinin olmayacağı düşünülmüştür. Mikroglialar ise yapılan bir çalışmada birden fazla KYD indüklendikten en az 24 saat sonra Iba-1 işaretlemesi ile aktif durumda izlenmiştir (77). Tek KYD ile mikrogliaların aktivasyonlarını değerlendirmek amacıyla KYD'den 24 saat sonra mikroglia belirteci Iba-1 işaretlemesi yapıldı (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. Tek KYD'den 24 saat sonra ipsilateral kortekste mikroglialar inaktif durumda izleniyor. Iba-1 ile işaretlenen mikrogliaların uzantıları oklarla gösterilmiştir. Sağ altta büyütülmüş biçimde gösterilen mikrogliaların uzantılarının ince ve uzun olduğu görülmektedir. Konfokal mikroskopta z-yığın tekniğiyle alınmış görüntüler maksimum yansıtma özelliğiyle üst üste bindirilmiştir. Her görüntü için z adım büyüklüğü 1,15 μm ; toplam görüntülenen alan yaklaşık 12 μm . Ölçek 25 μm (n=2 fare).

Literatre uygun olarak KYD'den 24 saat sonra ipsilateral kortekste görüntülenen $277 \times 277 \mu\text{m}^2$ boyutlarındaki alanda yalnızca 6 tane mikroglialın işaretlenmesi, işaretlenen mikrogliaların uzantılarının ince olması ve gövde etrafında toplanmış olmaması mikrogliaların aktifleşmediğini göstermektedir. bu bulgu 2 farede doğrulanmıştır. Yapılan fenotiplendirme çalışmalarının sonucunda nöronlar güvenilir biçimde ayırt edildiğinde p65 ve cRel aktivasyonunu gösteren NeuN (-) gliaların büyük ölçüde astrositler olacağı düşünülmüştür.

KYD'den 15 dakika, 5 saat ve 24 saat sonra NeuN (+) ve NeuN (-) hücrelerde cRel ve p65 pozitifliği incelendi (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19). Tarafsız değerlendirilme yapılması için tüm görüntüler hangi işaretlemeye veya zaman noktasına ait olduğu bilinmeden yapıldı. Her görüntüde başta kesit düzlemine net giren çekirdeklerin cRel veya p65 pozitiflikleri belirlendikten sonra NeuN (+) çekirdekler ayrıca belirlendi. İki inceleme kıyaslanarak nükleer cRel/p65 (+) NeuN (+) hücreler saptandı.



C

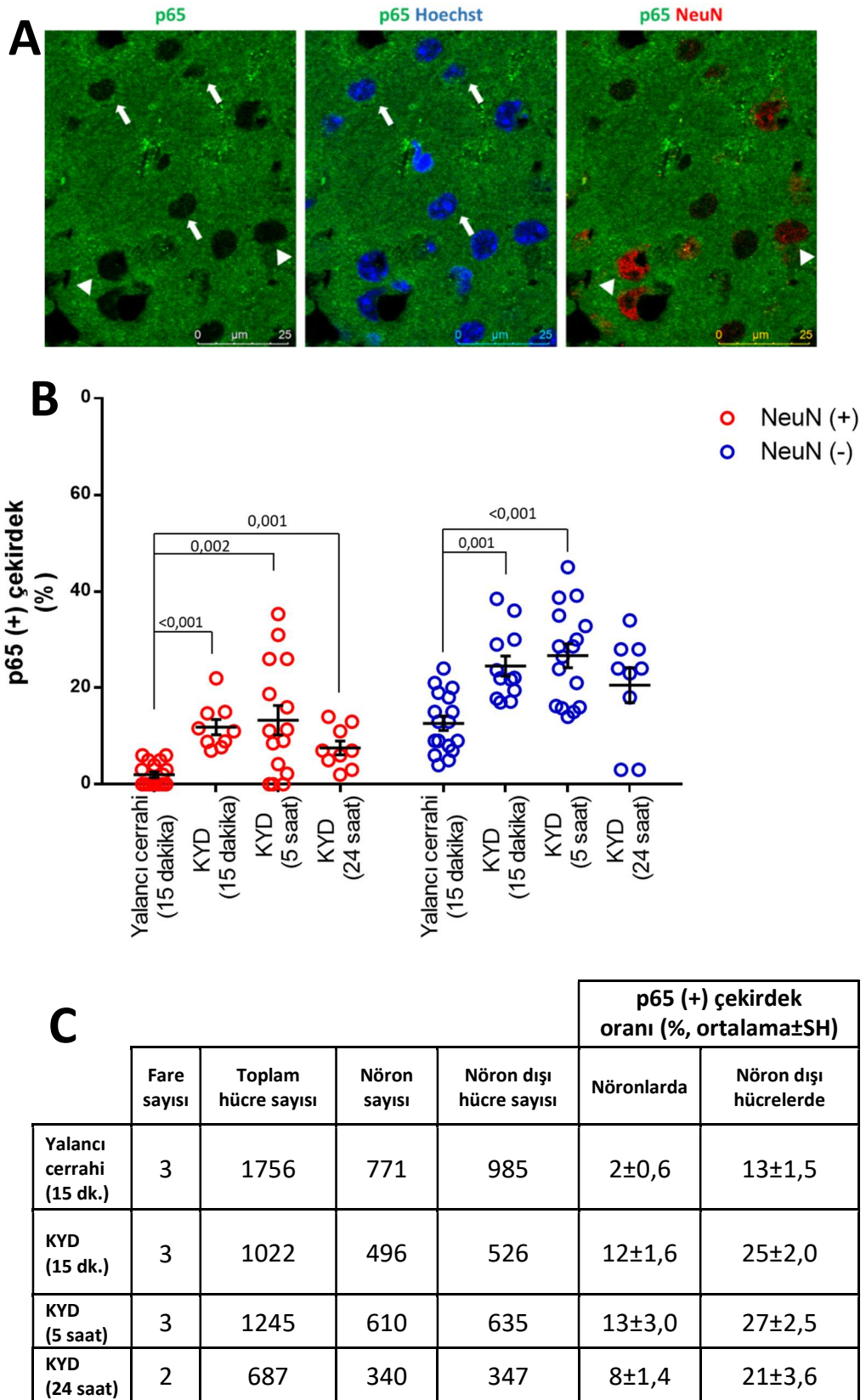
	Fare sayısı	Toplam hücre sayısı	Nöron sayısı	Nöron dışı hücre sayısı	cRel (+) çekirdek oranı (% , ortalama±SH)	
					Nöronlarda	Nöron dışı hücrelerde
Yalancı cerrahi (15 dk.)	3	1084	568	516	32±2,7	10±1,3
KYD (15 dk.)	3	1187	556	631	25±4,0	24±2,5
KYD (5 saat)	3	1461	692	769	36±5,5	25±2,0
KYD (24 saat)	2	898	466	432	60±4,8	36±3,0

Şekil 4.18. KYD'den 24 saat sonra hem nöron dışı hücrelerde hem nöronlarda cRel aktivasyonu artıyor. **A:** KYD'den 15 dakika sonra ipsilateral korteksten alınan temsili görüntüde NeuN (+) (beyaz oklar) ve NeuN

(-) hücrelerde (*) nükleer cRel pozitifliği ile cRel'in inaktif durumda olduğu hücreler (ok başı) gösterilmiştir. cRel'in aktif durumda olduğu hücrelerde nükleer işaretlenmenin noktasal görünümde olması cRel'in bölgesel olarak kromatine bağlandığını (olası körükleyici (*promoter*)) işaret ediyor olabilir. Konfokal mikroskop, ölçek 25 µm. **B:** Yalancı cerrahiden 15 dakika, KYD'den 15 dakika, 5 saat ve 24 saat sonra cRel-NeuN çifte işaretlemesi sonucunda nöronlar ve nöron dışı hücrelerde cRel'in aktif durumda olduğu hücrelerin oranını gösteren grafik. Kırmızı çemberlerin her biri değerlendirilen bir alandaki oranı göstermektedir. Nöron dışı hücrelerde KYD ile cRel'in hemen aktifleştiği ve 24 saat sonunda bu aktivasyonda artış olduğu; nöronlarda ise KYD'den 24 saat sonra aktif hücre oranında anlamlı bir artış görüldü (her iki hücre grubu için tek yönlü varyans analizi, $p < 0,001$). Sütunların üzerine aralarında fark bulunan ikili karşılaştırmaların p değerleri yazılmıştır. (ortalama±SH) **C:** Belirtilen zaman noktalarında incelenen toplam hücre sayısını ve cRel'in aktif durumda olduğu hücre oranını gösteren tablo (Her grup için kullanılan fare sayısı tabloda belirtilmiştir).

NeuN (-) glialarda yalancı cerrahiye kıyasla cRel'in KYD ile hızlıca aktifleştiği gözlemlendi (cRel'in aktifleştiği gliaların oranı sırasıyla $10 \pm 1,3$ ve $24 \pm 2,5$; Tamhane testi; $p < 0,001$). KYD'den 15 dakika, 5 saat ve 24 saat sonra sırasıyla tüm nöron dışı hücrelerin $24 \pm 2,5$; $25 \pm 2,0$ ve $35,7 \pm 3,0$ 'ünde cRel'in çekirdekte saptanması KYD'den 24 saat sonra cRel aktivasyonunun anlamlı düzeyde arttığını göstermektedir (tek yönlü varyans analizi, $p = 0,001$). Bu durum, nöron dışı hücrelerde tetiklenen inflamasyona eş zamanlı çözülme sürecinin de eşlik ettiğini göstermektedir.

Nöronların $31 \pm 3,2$ 'sinde cRel'in hücre çekirdeğinde konumlandığının görülmesi nöronlarda cRel'in konstitütif aktivitesi olabileceği izlenimini verdi. Bu nedenle naif beyinde de nöronlarda cRel'in aktif durumda olduğu hücre oranı değerlendirildi. Naif beyindeki nöronların da $33 \pm 4,4$ 'ünde cRel hücre çekirdeğinde görüldü ($n=3$ fare). Bu sonuç, cRel'in nöronlarda konstitütif transkripsiyonel aktivitesi olduğunu göstermektedir. KYD'den 15 dakika, 5 saat ve 24 saat sonra sırasıyla tüm nöronların $25 \pm 4,0$; $36 \pm 5,5$ ve $60 \pm 4,8$ 'inde cRel'in çekirdekte saptanması nöronlarda KYD'nin 24 saat sonunda cRel aktivasyonuna neden olduğunu işaret etmektedir (tek yönlü varyans analizi, $p = 0,001$).



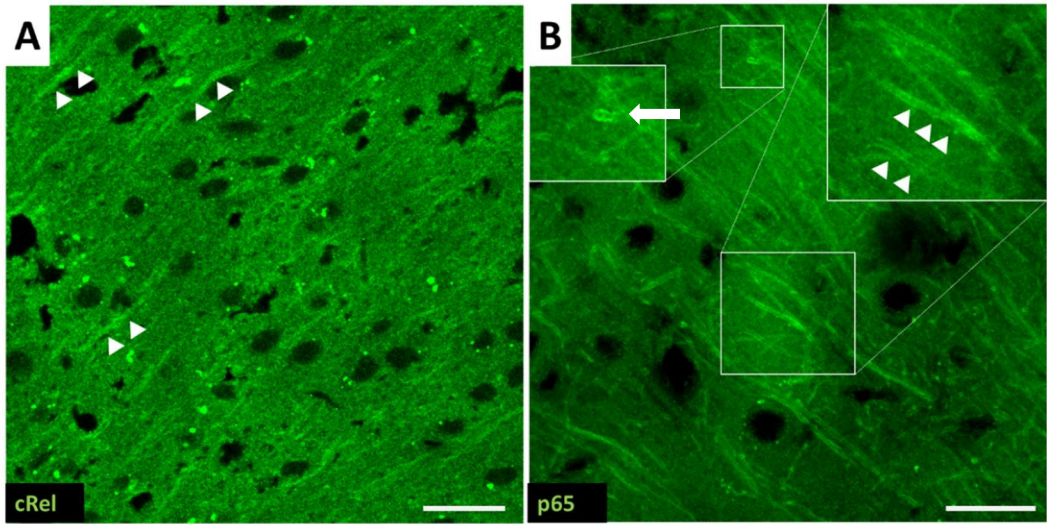
Şekil 4.19. KYD'den 24 saat sonra hem nöron dışı hücrelerde hem nöronlarda p65 aktivasyonu azalma eğilimi gösteriyor. **A:** KYD'den 15 dakika sonra ipsilateral korteksten alınan temsili görüntüde NeuN (-) hücrelerde

nükleer p65 pozitifliği (beyaz ok) ve p65'in inaktif durumda olduğu nöronlar (ok başı) gösterilmiştir. Konfokal mikroskop, ölçek 25 µm. **B:** Nöronlar ve nöron dışı hücreler içinde p65'in aktif durumda olduğu hücrelerin oranını gösteren grafik. Kırmızı çemberlerin her biri değerlendirilen bir alandaki oranı göstermektedir. Hem NeuN (+) hem de NeuN (-) hücrelerde yalancı cerrahiye kıyasla p65'in KYD ile aktifleştiği ve bu aktivasyonun 24 saat sonra azalmaya başladığı gözlemlendi (NeuN (+) hücreler için Kruskal-Wallis testi, $p < 0,001$; NeuN (-) hücreler için tek yönlü varyans analizi, $p < 0,001$). Sütunların üzerine aralarında fark bulunan ikili karşılaştırmaların p değerleri yazılmıştır (ortalama \pm SH). **C:** Belirtilen zaman noktalarında incelenen toplam hücre sayısını ve p65'in aktif durumda olduğu hücre oranını gösteren tablo (Her grup için kullanılan fare sayısı tabloda belirtilmiştir).

Hem nöronlarda hem de nöron dışı hücrelerde yalancı cerrahiye kıyasla KYD'nin p65 aktivasyonuna yol açtığı görüldü (p65'in aktifleştiği gliaların oranı sırasıyla $13 \pm 1,5$ ve $25 \pm 2,0$; Tamhane testi; $p < 0,001$ iken nöronların oranı sırasıyla $2 \pm 0,6$ ve $12 \pm 1,6$; Mann-Whitney *U* testi; $p < 0,001$). KYD'den 15 dakika, 5 saat ve 24 saat sonra sırasıyla tüm nöron dışı hücrelerin $25 \pm 2,0$; $27 \pm 2,5$ ve $21 \pm 3,6$ 'sında p65'in çekirdekte saptanması tüm hücreler üzerinden yapılan tarama deneylerine paralel olarak KYD ile p65'in aktifleştiği hücre oranında 5 saat içerisinde fark bulunmadığını ancak KYD'den 24 saat sonra aktif hücre oranının azalma eğiliminde olduğunu göstermektedir (tek yönlü varyans analizi; $p < 0,001$). Bununla beraber 24 saat sonunda aktif durumda olan hücre oranının ne 15. dakikadan ne de yalancı cerrahiden anlamlı farklı bulunması, p65 aktivitesinin henüz sonlanmaya başladığını göstermektedir.

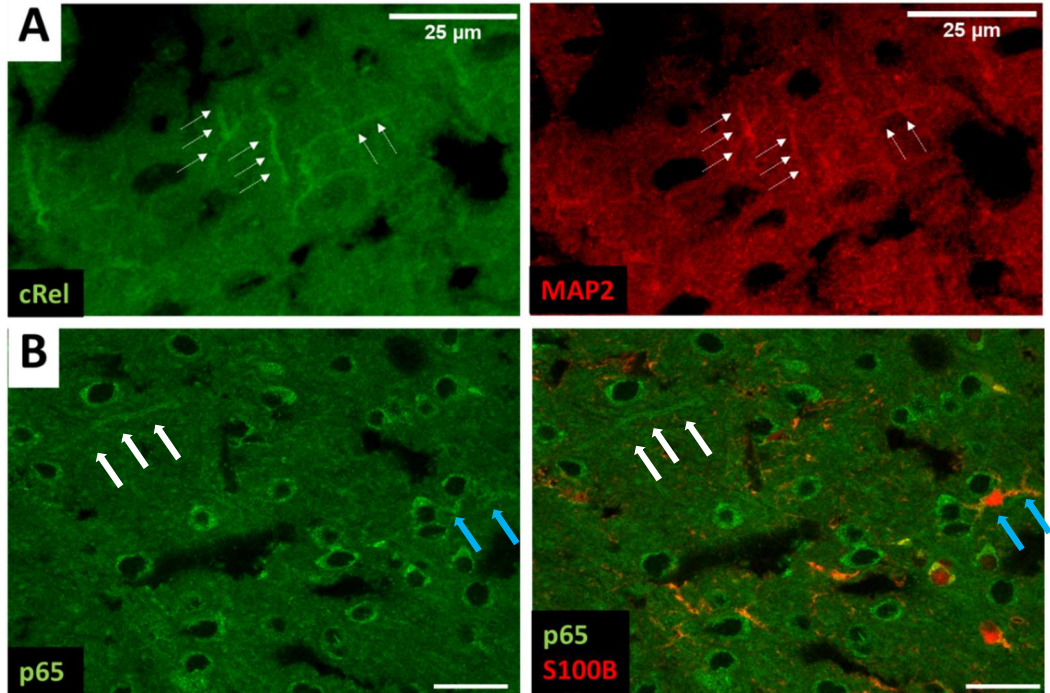
KYD'den 15 dakika, 5 saat ve 24 saat sonra sırasıyla tüm nöronlarda $12 \pm 1,6$; $13 \pm 3,0$ ve $8 \pm 1,4$ 'ünde p65'in çekirdekte saptanması ise nöron dışı hücrelerdeki aktivasyon durumunun değişimine benzer şekilde KYD'den 24 saat sonra aktif nöron oranının azalma eğiliminde olduğunu göstermektedir (Kruskal-Wallis testi; $p < 0,001$). Bununla beraber nöronlarda KYD'den 15 dakika sonrasına kıyasla 24 saat sonra Bonferroni düzeltmesine göre sınırlı derecede anlamlı azalma saptandı (Mann-Whitney *U* testi; $p = 0,03$).

İmmünofloresan işaretlemeyle cRel ve p65'in transkripsiyon faktörü olarak aktifleştığı ve çekirdeğe göç ettiği hücreler tayin edilmek istenirken farklı bir bulgu gözlemlendi. KYD'den 3 saat sonra çekirdek çevresindeki sitoplazmanın yanı sıra hücre uzantılarında da yoğun olarak cRel ve p65 işaretlemeleri saptandı (Şekil 4.20). Bu uzantıların hangi hücreye ait olduğunu belirlemek için cRel ile dendrit belirteci MAP2 (*microtubule associated protein-2*) çifte işaretlemesi yapıldı. cRel ile işaretlenen uzantıların MAP2 (+) olması bu uzantıların dendritler olduğu gösterdi (Şekil 4.21-A).



Şekil 4.20. KYD'den 3 saat sonra ipsilateral kortekste hücre uzantıları cRel ve p65 ile belirgin biçimde işaretleniyor. **A:** cRel işaretlemesi. Uzantılar ok başlarıyla gösterilmiştir. Uzantılar pia matere doğru yönelmekte olup (pia mater sınırı görüntüye dahil değildir) yaklaşık 4-5 hücre boyunca takip edilebilmektedir. **B:** p65 işaretlemesi. Ok başlarıyla gösterilen uzantılar sağ üstteki büyütülmüş görüntüde incelendiğinde işaretlenmenin uzantıların yalnızca lateralinde olması, median bölümünün işaretlenmemesi p65 ve cRel'in uzantıların membranında olduğu izlenimini vermektedir. Sol üstteki büyütülmüş görüntüde ise bir uzantının transvers kesiti görülmektedir. Bu görünüm de işaretlenmenin yalnızca membranda olduğunu destekler niteliktedir. Konfokal mikroskopi, ölçek 25 μm .

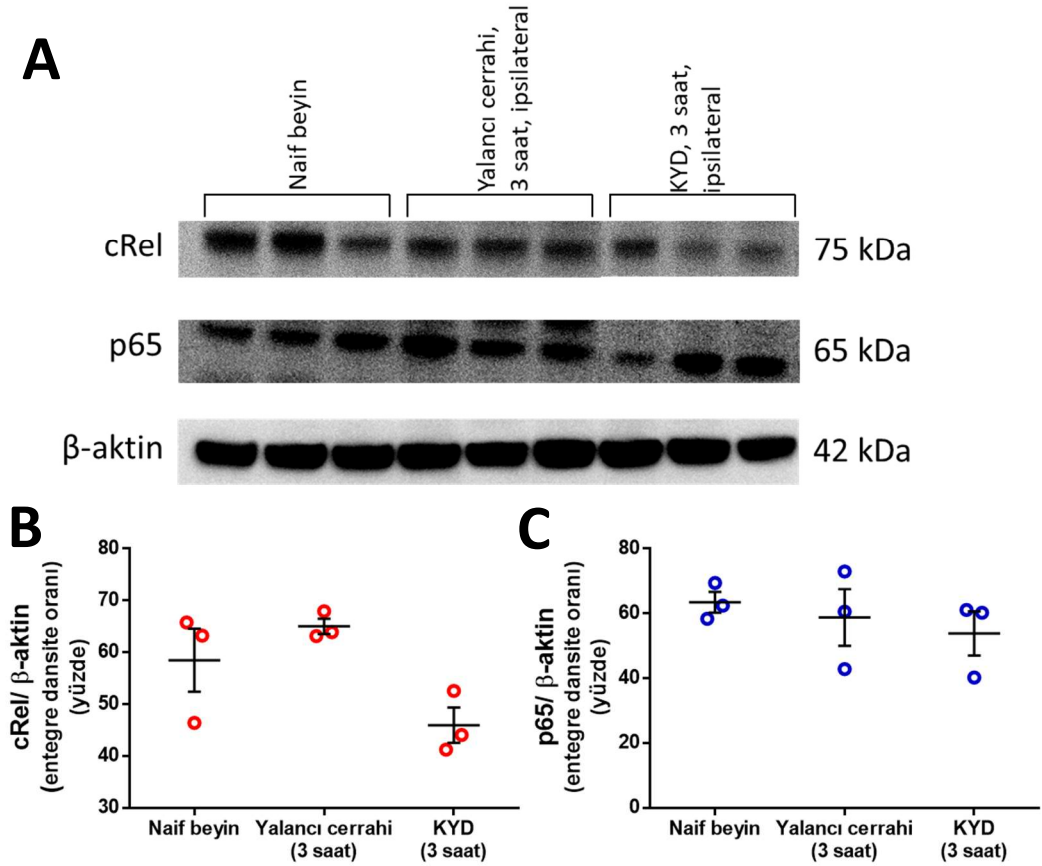
İşaretlenen uzantıların dendritlerle beraber astrositlere de ait olabileceği düşüncesiyle p65-S100B çifte işaretlemesi yapıldı. S100B (+) astrosit uzantılarında p65 işaretlemesi görülmesine rağmen, bu uzantıların daha çok doğrusal olmayan, astrosit gövdesiyle devamlılık gösteren yapılar olduğu görüldü. Dolayısıyla, yoğun p65 işaretlenmesinin görüldüğü doğrusal, uzun uzantıların astrositlere ait olmadığı çıkarımında bulunuldu (Şekil 4.21-B).



Şekil 4.21. KYD'den 3 saat sonra ipsilateral kortekste işaretlenen hücre uzantıları dendritlerdir. **A:** cRel-MAP2 çifte işaretlemesi. cRel ile yapılan işaretlemede uzantıların (beyaz oklar) MAP2 (dendrit belirteci) pozitif olduğu görülmektedir. **B:** p65-S100B işaretlemesi. S100B (+) astrosit uzantılarında p65 işaretlemesi görülmesine rağmen (mavi oklar), bu uzantıların daha çok doğrusal olmayan, astrosit gövdesiyle devamlılık gösteren yapılar olduğu görüldü. Beyaz oklarla gösterilen doğrusal, uzun uzantılarda S100B işaretlenmesi görülmedi. Konfokal mikroskopi, ölçek 25 μm.

KYD'den 3 saat sonra dendritlerdeki yoğun cRel ve p65 işaretlemesi, bu zaman noktasında ilgili proteinlerin miktarında bir artış olduğunu gösteriyor olabilir. Bu nedenle KYD'den ve yalancı cerrahiden 3 saat sonra

korteks tüm hücre lizatlarında cRel ve p65 protein seviyeleri Western blotlama yöntemiyle naif beyinle karşılaştırıldı (Şekil 4.22).

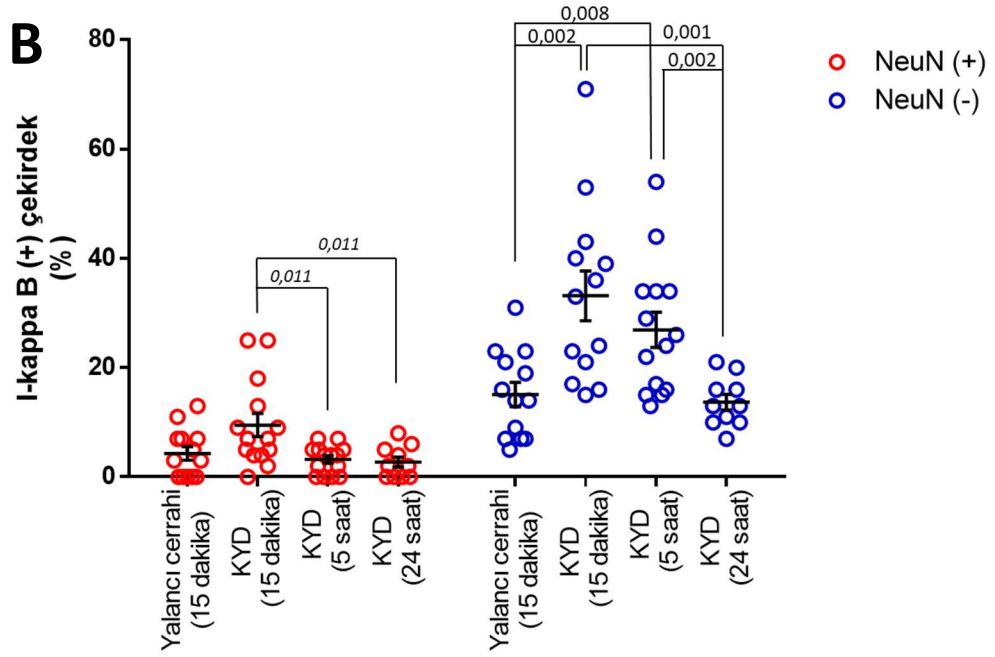
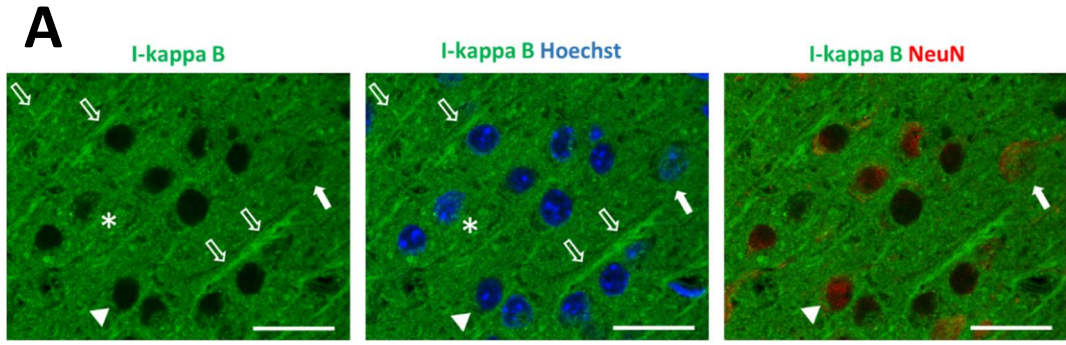


Şekil 4.22. KYD'den 3 saat sonra cRel ve p65 protein seviyelerinde değişim olmuyor. **A:** Naif beyin, yalancı cerrahiden ve KYD'den 3 saat sonra kortikal hücrelerdeki cRel ve p65 miktarını gösteren Western blotlama bantları. **B ve C:** cRel ve p65 bantlarının entegre dansitelerinin β-aktin bantlarının dansitelerine yüzde cinsinden oranı. Her örnekten 40 µg protein yüklendi. Çemberlerin her biri değerlendirilen bir bantın oranını göstermektedir (ortalama±SH). Gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (Kruskal-Wallis testi; cRel için p=0,10 ve p65 için p=0,90; n=3 fare).

Naif beyin, yalancı cerrahi ve KYD'den 3 saat sonra korteksteki total protein seviyesi incelendiğinde cRel ve p65 miktarında yoğun dendrit işaretlemelerini açıklayacak bir artış görülmedi. Bu nedenle görülen işaretlenme bulgusu protein miktarının artmasından çok ilgili proteinlerin etkileştiği protein kompleksi veya organelle bağlı olarak dendritlerde yoğunlaşmasını gösteriyor olabilir.

4.10. KYD ile Tetiklenen İnflamasyonun Çözülmesinde I-kappa B'nin Yeri

NF-kappa B aktivasyonunun sonlanmasında önemli basamaklardan biri I-kappa B'nin inflamatuvar uyarı sonucunda yıkılmasından sonra yeniden sentezlenmesiyle hücre çekirdeğine geçmesi ve devamında DNA üzerindeki NF-kappa B ikililerine bağlanarak onları tekrar sitoplazmaya taşıması, dolayısıyla işlevsiz hale getirmesidir. Bu nedenle I-kappa B'nin inflamasyonun çözülmesine katkısını araştırmak üzere KYD'den 15 dakika, 5 saat ve 24 saat sonra I-kappa B ile NeuN çifte işaretlemesi yapıldı. Yapılan işaretlemede I-kappa B'nin çekirdekte konumlanması araştırıldı. Birden fazla I-kappa B proteini mevcut olduğundan, tez çalışmamızda aktivasyonu incelenen klasik yolakla ilişkisi en güçlü olan I-kappa B- α 'ya yönelik işaretleme yapıldı (Şekil 4.23.).



C

	Fare sayısı	Toplam hücre sayısı	Nöron sayısı	Nöron dışı hücre sayısı	I-kappa B (+) çekirdek oranı (% , ortalama±SH)	
					Nöronlarda	Nöron dışı hücrelerde
Yalancı cerrahi (15 dk.)	3	989	558	431	4±1,2	15±2,2
KYD (15 dk.)	3	1203	656	547	10±2,1	33±4,5
KYD (5 saat)	3	1366	670	696	3±0,7	27±3,2
KYD (24 saat)	2	1123	600	723	3±0,9	14±1,4

Şekil 4.23. I-kappa B, KYD ile tetiklenen inflamasyonun çözülmesinde rol oynuyor olabilir. **A:** KYD'den 15 dakika sonra ipsilateral korteksten alınan temsili görüntüde NeuN (+) (beyaz ok) ve NeuN (-) hücrede (*)

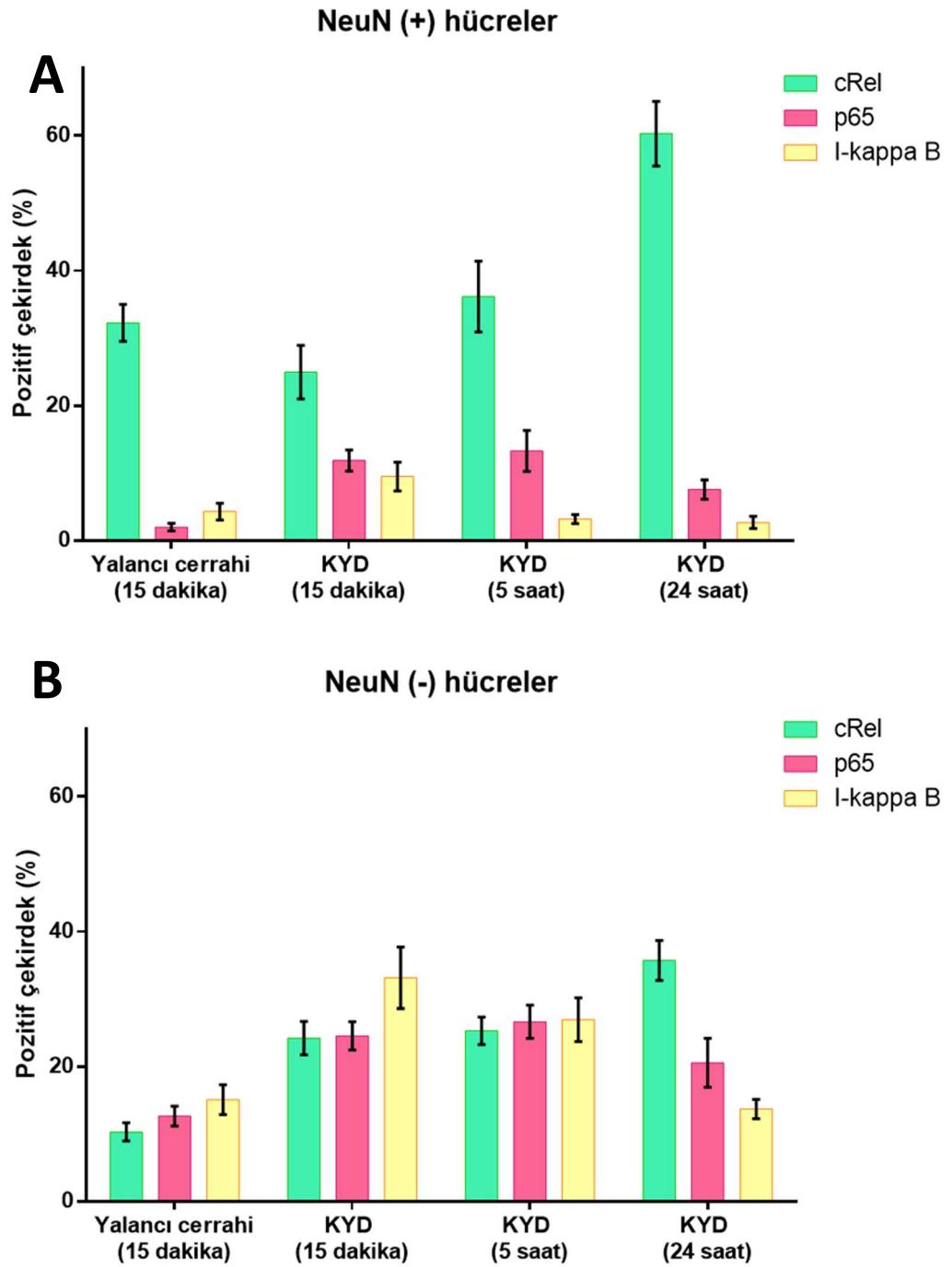
nükleer I-kappa B pozitifliği ile I-kappa B'nin yalnızca sitoplazmada durumda olduğu nöron (ok başı) örneklenmiştir. cRel ve p65'te KYD'den 3 saat sonra görülen dendritlerin yoğun işaretlenmesi burada da görülmektedir (içi boş oklar). Konfokal mikroskop, ölçek 25 µm. **B:** Nöronlar ve nöron dışı hücreler içinde I-kappa B'nin çekirdekte izlendiği hücrelerin oranını gösteren grafik. Kırmızı çemberlerin her biri değerlendirilen bir alandaki oranı göstermektedir. KYD'den sonra I-kappa B'nin çekirdekte konumlanması çözülme sürecine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Kruskal-Wallis testi, nöronlar için $p=0,03$; nöron dışı hücreler için $p=0,002$). Sütunların üzerine aralarında fark bulunan ikili karşılaştırmaların p değerleri yazılmıştır. (ortalama±SH) **C:** Belirtilen zaman noktalarında incelenen toplam hücre sayısını ve I-kappa B'nin çekirdekte konumlandığı hücre oranını gösteren tablo (Her grup için kullanılan fare sayısı tabloda belirtilmiştir).

I-kappa B'nin astrositlerde çekirdeğe yeniden sentezlendikten sonra geçeceği, dolayısıyla bu mekanizmanın daha geç etkili olacağı öngörülmüştü. Ancak KYD'den 15 dakika sonra (hücrelerin $33\pm 4,5$ 'i) hücre çekirdeğinde kontrol grubundan (hücrelerin $15\pm 2,2$ 'si) anlamlı düzeyde fazla saptanması, astrositlerde HMGB1 ve Il-1 β uyarısını takiben I-kappa B'nin tamamının yıkılmadığını gösteriyor olabilir (Mann-Whitney *U* testi; $p=0,002$). Bu bulgular, I-kappa B'nin hücre çekirdeğine geçmesinin astrositlerde cRel aktivasyonuna ek olarak inflamasyonun çözülmesinde rol oynayan basamaklardan biri olabileceğini göstermektedir. Bununla beraber, nükleer I-kappa B düzeyinin zaman ilerledikçe azalarak KYD'den 5 ve 24 saat sonra sırasıyla $27\pm 3,2$ ve $14\pm 1,4$ 'e düşmesi I-kappa B'nin çözülme sürecine katkısının akut dönemde daha etkili olduğunu düşündürmektedir.

I-kappa B'nin çekirdekte izlendiği nöronların oranı yalancı cerrahi sonrasında $4\pm 1,2$ iken; KYD'den 15 dakika, 5 saat ve 24 saat sonra sırasıyla $10\pm 2,1$; $3\pm 0,7$ ve $3\pm 0,9$ olarak ölçüldü (Kruskal-Wallis testi; $p=0,03$). Nükleer I-kappa B düzeyinde KYD'den 15 dakika sonra yalancı cerrahiye kıyasla anlamlı bir artış görülmemekle beraber KYD'den 5 ve 24 saat sonra 15. dakikaya kıyasla anlamlı düzeyde azalma görüldü. KYD'den 15 dakika sonra görülen artışın gerçekten anlamlı olup olmadığını görmek üzere bu zaman noktasında

daha çok fare incelenmelidir. KYD ile astrositlerde inflamasyon tetiklendiği için, nöronlardaki p65 aktivasyonuna benzer biçimde I-kappa B'nin fonksiyonu da sinaps düzenlenmesiyle ilişkili olabilir.

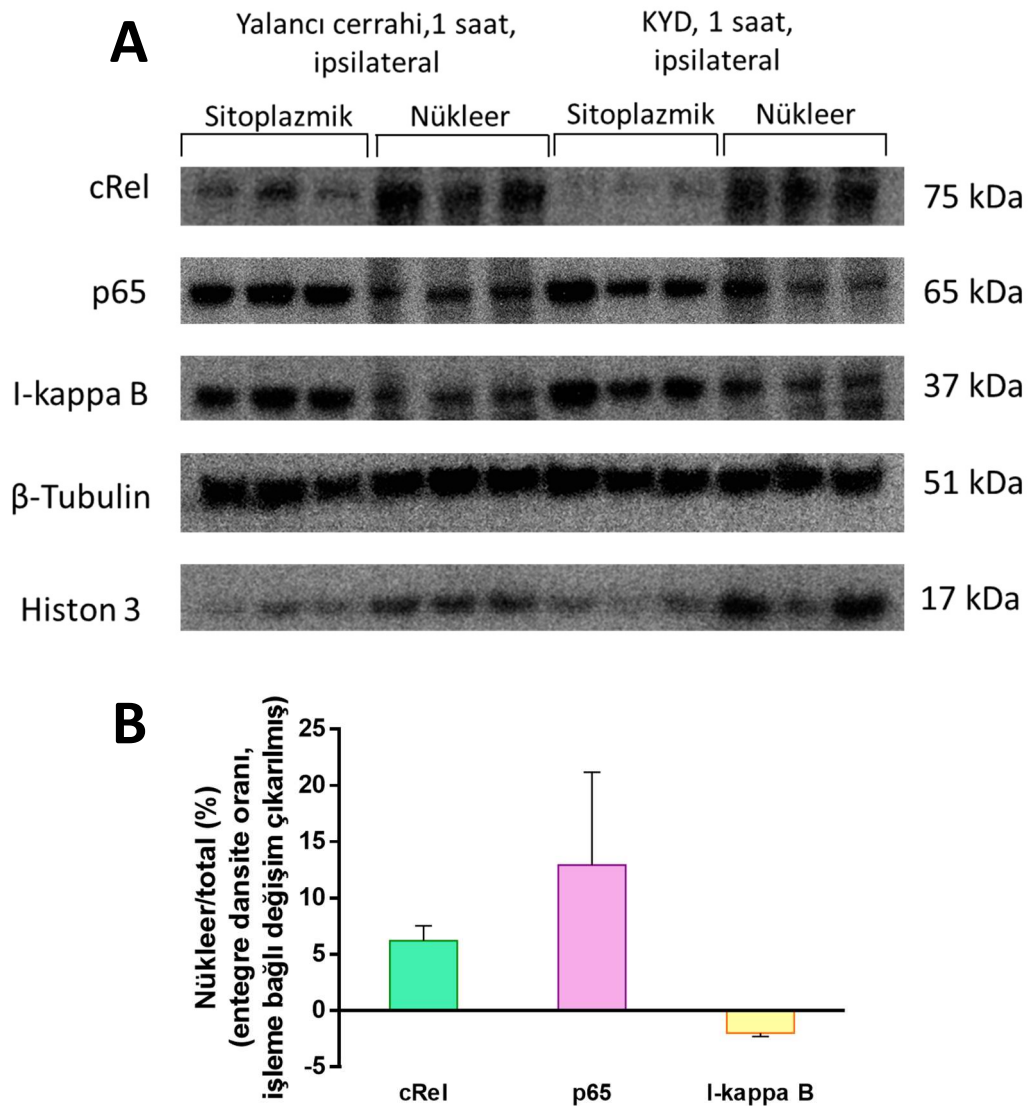
KYD'den sonraki 24 saat içerisinde nöronlar ve nöron dışı hücreler içinde cRel, p65 ve I-kappa B'nin çekirdekte işaretlendiği hücre oranının zamansal dağılımını gösteren özet grafik Şekil 4.24.'te sunulmuştur.



Şekil 4.24. Yalancı cerrahiden 15 dakika, KYD'den 15 dakika, 5 saat ve 24 saat sonra nöronlar ve nöron dışı hücrelerde cRel, p65 ve I-kappa B'nin çekirdekte izlendiği hücrelerin oranının zaman içinde değişimini bir arada gösteren grafik. Barlar ortalamayı, hata çizgileri standart hatayı temsil etmektedir. **A:** Nöronlarda cRel'in konstitütif transkripsiyonel aktivitesi dikkat çekmektedir. **B:** Nöron dışı hücrelerde birbirine yakın oranda hücre çekirdeğinde cRel, p65 ve I-kappa B saptanması inflamasyon üzerinde etkisi farklı olan mekanizmalarının aynı hücrede aktif olabileceğini düşündürmektedir.

4.11. KYD ile NF-kappa B Üyelerinin Çekirdeğe Göç Ettiğinin Nükleer Protein Lizatlarında Gösterilmesi

İmmüno Floresan işaretlemeyle hücre tiplerine göre cRel ve p65'in KYD'den sonra 24 saatlik süre içerisinde verdiği yanıtlar incelenmiştir. Ancak yapılan inceleme niteliklidir. Bu incelemenin yarı-niceliksel olarak doğrulanabilmesi için KYD'den ve yalancı cerrahiden 1 saat sonra korteksten sitoplazmik ve nükleer protein lizatları ayrıştırıldı. Elde edilen örneklerde Western blotlama ile cRel, p65 ve I-kappa B düzeylerine bakıldı (Şekil 4.25.).



Şekil 4.25. KYD'den 1 saat sonra cRel ve p65 aktifleşerek çekirdeğe göç ediyor.

A: Yalancı cerrahiden ve KYD'den 1 saat sonra ipsilateral kortikal hücrelerde çekirdek ve sitoplazmadaki cRel, p65 ve I-kappa B miktarını gösteren Western blotlama bantları. **B:** KYD ile nükleer cRel, p65 ve I-

kappa B miktarının total protein miktarına oranındaki değişimin yüzde cinsinden gösterilmesi. Her örnekten 50 µg protein yüklendi. Barlar değerlendirilen bantların ortalama±standart hatasını göstermektedir (Her grup için n=3 fare).

cRel, p65 ve I-kappa B bantlarının entegre dansiteleri ölçüldükten sonra sitoplazmik fraksiyonu temsil eden bantların değerleri β-tubuline, nükleer fraksiyonu temsil eden bantların değerleri histon-3'e kıyaslandı. Fiksasyon yapılmaksızın beynin çıkarılması ve ilk izolasyon solüsyonuna konmasına kadar geçen sürede kaspaz-1 aktivasyonu olduğu bilindiği için benzer biçimde cRel veya p65 aktivasyonu olabileceği düşünülerek KYD'den sonra elde edilen örneklerin her birinin ölçümünden yalancı cerrahi sonrası elde edilen değerlerin ortalaması çıkarıldı. Bu şekilde yalnızca KYD'nin etkisi gösterildi. Nükleer ve sitoplazmik proteinlerin ayrı ayrı Western blotlamayla incelenmesi cRel ve p65'in KYD ile çekirdeğe göçtüğünü doğruladı. Western blotlamanın, I-kappa B'nin hücrelerin yalnızca az sayıdaki kısmında çekirdeğe göç etmesini gösterecek kadar yüksek güçte olmamasının I-kappa B düzeyinde KYD ile belirgin bir değişim görülmemesinin sebebi olduğu düşünöldü (bkn Şekil 4.23.).

5. TARTIŞMA

Migren aurasının elektrofizyolojik karşılığı olan kortikal yayılan depresyon (KYD) tarafından nöronlarda panneksin-1 kanallarının açılması üzerine inflamazom kompleksi oluşumu, kaspaz-1 aktivasyonu ve HMGB1'in saliverilmesi, astrositlerde pro-inflamatuvar NF-kappa B transkripsiyonel etkinliğini başlatan ana olaylardır (4). Migren aurası ile baş ağrısı arasında köprü görevi gören bu steril inflamasyonun çözülmesinin, migren baş ağrısının kendiliğinden sonlanmasında bir rolü olabileceği tez çalışmamızın temel hipotezidir.

Tez çalışmamızda, KYD'den sonra kaspaz-1, HMGB1 ve NF-kappa B p65'in aracılık ettiği inflamasyonun çözülmesine bu moleküllerle beraber anti-inflamatuvar transkripsiyonel etkinlikte rol oynadığı bilinen cRel ve düzenleyici protein I-kappa B'nin katkıları araştırıldı. HMGB1, kaspaz-1 enzimi, NF-kappa B cRel ve p65'in aktivasyonu; immünofloresan işaretleme, elektron mikroskopi ve Western blotlama yöntemleri kullanılarak incelendi. KYD'den hemen sonra HMGB1'in nöronlardan eksozomlar içinde saliverildiği, beyinden ve plazmadan izole edilen eksozomların Western blotlama analizi ile gösterildi. Bu bulgu elektron mikroskopisinde immünoaltın işaretlemeyle doğrulandı. Ayrıca HMGB1'in 24 saat sonra bile saliverildiği çekirdeklere yenilenmediği görüldü ve HMGB1'in nöronlara hızla geri alınımının nöroinflamasyonun çözülmesinde rolü olmadığı saptandı. KYD'den hemen sonra ortaya çıkan kaspaz-1 aktivitesi ile total kaspaz-1 miktarının KYD'den 3 saat sonra azalmaya başladığı saptandı ve bunun inflamasyonun çözülmesi sürecine katkıda bulunacağı düşünüldü. Nöron dışı hücrelerde (astrositlerde) cRel ve p65'in KYD ile hemen aktifleşerek çekirdeğe geçtiği ve 24 saat sonunda cRel aktivasyonunun arttığı, p65 aktivasyonunun ise azalmaya başladığı tespit edildi. Böylece pro-inflamatuvar ve inflamasyonun çözülmesinde rol oynayan transkripsiyonel aktivitenin eş zamanlı etkin olmasının inflamasyonun sınırlı kalması açısından gerekli olduğu düşünüldü. Bunlara paralel olarak, p65 ve cRel'e bağlanarak bu alt birimleri DNA'dan ayıran I-kappa B'nin de çekirdeğe

hemen göç ettiği gözlemlendi ve böylece, astrositlerdeki inflamasyonun çözülmesine katkı sağlayabileceği öngörüldü. Diğer taraftan, cRel'in nöronların yaklaşık üçte birinde devamlı transkripsiyonel aktivite gösterdiği ve KYD ile nöronlarda ancak 24 saat sonunda cRel'in daha fazla hücrede aktifleştiği ve kısıtlı p65 aktivitesi saptandı.

5.1. Nöroinflamasyonun Çözülmesinde HMGB1'in Rolü

Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda KYD ve elektrokonvülf şok ile, literatürde ise Alzheimer hastalığı veya multipl skleroz gibi nörolojik hastalıklarda nöron çekirdeklerinin HMGB1 salıverdikleri gösterilmiştir (4, 69, 78, 79). İnflamatuvar yanıtın oluşmasında etkili moleküllerden biri olan HMGB1'in KYD ile saliverilmesinin üzerine nöronlar tarafından hızla geri alınabileceği ve bunun sonucunda inflamatuvar yolları aktive eden uyarının azalmasının inflamasyonun çözülme fazına katkıda bulunabileceği, literatürde HMGB1-sepsis ilişkisini araştıran çalışmaların sonuçlarına göre öngörülebilir olmakla beraber bulgularımız bu olasılığı desteklemedi (80). Bu bulgu, literatürde KCl ile indüklenen tek veya çoklu KYD'den sonra HMGB1 sentezini araştıran bir çalışmayla uyumludur (81). Bahsedilen çalışmada *in situ* hibridizasyon yöntemiyle tek KYD'den sonra HMGB1 mRNA'sında artış görülmemiş ancak çoklu KYD'den 3 saat sonra mRNA miktarında anlamlı artış saptanmıştır. Naif beyinde oldukça az sayıda HMGB1 mRNA'sı olduğu belirtilerek HMGB1'in *de novo* sentezinin ve bazal koşullara dönme hızının düşük olduğu vurgulanmıştır (81).

KYD sonrasında HMGB1 içeriğini salıveren hücrelerin bir kısmında çekirdeğin periferinde, çekirdek çevresindeki sitoplazmada ve nöropilde noktasal işaretlenmeler görüldü. Monositlerde, sitoplazmaya geçen HMGB1'in lizozomlar içine alındığı ve bu yolla veziküller içinde hücre dışına salıverildiği gösterilmiştir (52). Bu çalışmayı enterositlerde ve bronş epitellerinde HMGB1'in veziküller içinde salıverildiğini elektron

mikroskopisiyle daha doğrudan gösteren çalışmalar izlemiştir (82, 83). Yakın zamanda HIV (+) hastalarda kognitif bozukluğun araştırıldığı bir çalışmada hasta plazmalarından, çalışmamızda yapılabenzer biçimde, önce ticari kitle; devamında anti-CD171 antikoruyla ayrıştırılan nöron kökenli eksozomların HMGB1 saliverilmesine aracılık ettiği gösterilmiştir (84). Bu bilgiler ve KYD'den sonra çekirdeğin etrafında görülen noktasal immüno Floresan işaretleme paterni HMGB1'in nöronlardan veziküller aracılığıyla saliverildiği izlenimini oluşturdu. Bu amaçla yapılan deneylerde KYD'den 1 saat sonra korteks dokusu süspansiyon haline getirildikten sonra hücreden fakir kesimden eksozomlar ayrıştırıldı. Ayrıştırılan eksozomların yüzeylerinde eksozomlara özgü CD9, CD63 ve CD81 proteinlerini taşıdıklarının gösterilmesiyle karakterize edildi. Bu eksozomların HMGB1 taşıdıkları Western blotlama ile gösterildi. KYD'den sonra eksozomların içerdikleri HMGB1 miktarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde fazla olması yönlendirici sekansı olmayan HMGB1'in nöronlardan eksozomlar aracılığıyla saliverildiğini kanıtlamaktadır.

Laboratuvarımızda daha önce sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada KYD'den 1 saat sonra jüğüler venden alınan kanda bazal duruma kıyasla HMGB1 miktarının yaklaşık iki buçuk katına çıktığı ve bu artışın kontrol grubuna kıyasla anlamlı olduğu saptanmıştır (85). Bununla beraber hastalardan migren atağı başlangıcından sonraki bir saat içinde alınan periferik kanda HMGB1 artışı muhtemelen yüksek varyasyon nedeniyle gösterilememiştir. Hasta serumlarından mikroveziküller ayrıştırılmış ancak mikroveziküllerde de atak sonrasında HMGB1 artışı gösterilememiştir. MSS'den köken alan moleküller periferik kana karıştığında derişimleri oldukça düşmekte ve bu nedenle miktarlarındaki ufak değişiklikler, hatta bazı durumlarda kendileri bile saptanamamaktadır. Bahsedilen çalışmada HMGB1 düzeyinde artış görülmemesinin sebebi serumun ve mikroveziküllerin tamamının incelenmesi olabilir. Sağlıklı insanlardan toplanan plazmadan ultrasantrifüjle ayrıştırılan eksozomlar hücresel kaynaklarını belirlemek üzere akış sitometrisi için işaretlenmiştir (70). Plazmadaki total eksozomların

yaklaşık %45'inin plateletlerden, %40'ının ise mononükleer fagositlerden köken aldığı saptanmıştır. T hücreleri, nötrofiller ve endotelial hücrelerden salıverilen eksozomlar ise %10'luk kısmı oluşturmaktadır. Bu çalışma, nöronlardan salıverilen eksozomların plazmadaki tüm eksozomlar arasında %5'lik popülasyon içinde yer aldığını göstermektedir. Bu nedenlerle, çalışmamızda fareden toplanan plazma içerisinde yalnızca nöronlardan salıverilen eksozomlar ayrıştırılmıştır.

CD171 (L1CAM), immünoglobulin süperailisinden olup nöron membranında bulunan bir hücre adezyon molekülüdür ve nörondan salınan eksozomların içinde olduğu gösterilmiştir (86, 87). Tüm eksozom popülasyonu içinden yüzeyinde CD171 bulunduranlar seçildikten sonra korteksten ayrıştırılan eksozomlara benzer biçimde bu örneklerin de HMGB1 taşıdıkları Western blotlama ile gösterilmiştir. Plazma miktarının yetersizliği nedeniyle bu ön çalışmada yeterli miktarda eksozom izole edilememiş, dolayısıyla kontrol grubuyla KYD grubu arasında anlamlı bir fark gösterilememiştir. Blotlar eksozomların varlığını doğrulamak için TSG101 ve nöron kökenli olduklarını varlığını doğrulamak için CD171 ile işaretlenmiştir. Farklı belirteçler kullanılarak bulguların doğrulanması verinin güçlenmesini sağlayacaktır. Dolayısıyla yöntem yeni plazma örnekleriyle optimize edilmeye devam edilecektir. Ayrıca nöronlardan salıverilmesinin üzerine eksozomların periferik kana karışmasının belirli bir zaman alacağı öngörülerek kan örnekleme KYD'den bir saat sonra yapılmıştır. Ancak bu zaman noktası periferik kanda HMGB1 taşıyan nöron kökenli eksozomları tayin etmek için erken veya geç olabilir. Eksozom eldesi gözlemlerine paralel biçimde elektron mikroskopisiyle KYD'den 15 dakika ve 3 saat sonra HMGB1 hücre altı düzeyde, nükleer porlardan geçerken ve sitoplazmik veziküller içinde görüntülenmiştir. Üç farklı yöntemle elde edilen paralel bulgular KYD ile HMGB1'in nöronlarda eksozomlar aracılığıyla salıverildiğini ve periferik kanda tayin edilebileceğini göstermektedir.

Klinikte jügüler ven örnekleme invazif olması sebebiyle tercih edilmemektedir. Ancak, hastaların plazmalarından nöron kökenli eksozomların ayrıştırılması, migren baş ağrısı sırasında yalnızca HMGB1 değil, diğer inflamatuvar belirteçlerin de non-invazif yöntemlerle özgül olarak tayin edilmesine olanak tanıyacağından önemli bir bulgudur. Aynı zamanda migrenin inflamatuvar bileşeni üzerine geliştirilecek yeni moleküllerin etkilerinin incelenmesinde de özgül bir yöntem olarak kullanılabilir.

HMGB1 içeriğini salıverdikten sonra nöron çekirdeğinde herhangi bir fonksiyonel kayıp yaşanıp yaşanmadığını araştıran bir çalışma literatürde mevcut değildir. Ancak HMGB1'in çekirdekte neredeyse histon proteinleri kadar fazla bulunması, gen regülasyonunda birçok farklı görev üstlenmesi ve stres durumlarında anında alarm sinyali vermek üzere kullanılması nöronlar için HMGB1'in vazgeçilmez bir protein olduğunu düşündürmektedir (50). Bu nedenle HMGB1'in nöronda bir sonraki saldırıda astrositlere ve mikroglialara uyarı verebilmesi için hücre çekirdeğinde yerine konması gereklidir.

HMGB1 içeren eksozomlar salıverildikten sonra yüzeylerindeki tetraspanin proteinleri veya benzer adezyon molekülleri aracılığıyla alıcı hücrenin membranına bağlanır. Bağlandıktan sonra veziküller endositoz yoluyla hücre içine alınabilir; eksozom membranı, astrosit membranının yapısına katılarak veya katılmaksızın içeriğini hücre içine salabilir (88). Bu şekilde astrositlerde hücre içine alınan HMGB1 inflamatuvar yolları tetikleyebilir veya lizozomal sistemle entegre olarak yıkılabilir. Bununla beraber, HMGB1 içeren veziküllerin bir kısmı hücre dışında parçalanarak HMGB1 içeriğini serbest bırakabilir. Serbest kalan HMGB1 direkt olarak veya IL-1 β gibi diğer inflamatuvar moleküllerle kompleks halinde astrosit yüzeyindeki RAGE veya farklı TLR'lere (örneğin TLR4) bağlanarak inflamasyonu tetikleyebilir (51). Bir diğer olasılık ise reseptöre bağlı durumdaki HMGB1'in astrositlerin içine alınıp lizozomal kompleksle entegrasyonu sonucunda veya ekstraselüler ortamdaki serbest enzimler tarafından yıkılması olabilir (51). Eksozomların astrositler aracılığıyla veya diffüzyon yoluyla kan beyin bariyerini

aşarak periferik kana karışması da parankimdeki HMGB1'in lokal etkisinin azaltılmasını sağlayabilir (58).

Tüm bunların dışında HMGB1'in taşıdığı üç kritik sistemin ortamdaki redoks durumuna göre modifikasyonun HMGB1 fonksiyonunu tamamen değiştirdiği de dikkate alınmalıdır. HMGB1'in 23 ve 45. aminoasiti olan sisteinlerin disülfid bağıyla birbirine bağlı olması pro-inflamatuvar molekül olarak davranmasını sağlarken üç sisteminin de oksidasyonu inflamatuvar yanıt oluşturmalarını engeller (54). Tüm bu olasılıklar düşünüldüğünde nöronlardaki HMGB1 içeriği yerine konmamış olsa dahi HMGB1'in modifikasyona uğraması, yıkılması veya taşınmasıyla astrositlerdeki inflamasyonun çözülme fazına katkıda bulunabilir.

5.2. Nöroinflamasyonun Çözülmesinde İnflamazom Kompleksinin Rolü

Nöronlarda KYD'nin HMGB1 saliverilmesinin yanında bir diğer etkisi de inflamazom kompleksinin oluşumudur. İnflamazom kompleksi üzerinde toplanan pro-kaspaz-1 enzimleri dimerize olur ve kesilerek aktifleşir. Aktif kaspaz-1 de pro-İl-1 β 'yi keserek aktifleştirir. Saliverilen İl-1 β , astrositlerde inflamasyonu tetikleyen moleküllerden bir diğeridir. Kaspaz-1 aktivitesinin azalması veya sonlanmasının astrositler üzerindeki uyarıyı azaltacağından inflamasyonun çözülme fazına katkıda bulunabileceği öngörüldü. KYD'den 1 saat sonrasına kıyasla 3 ve 5 saat sonra hem kaspaz-1 aktivitesinde (aktif enzim miktarının total enzim miktarına oranı) hem de total enzim miktarında (pro-form ve kesilmiş enzimin toplamı) bir azalma görülmesi kaspaz-1 aktivitesinin 3 saatten itibaren azalmaya başladığını ve kaspaz-1 sentezini azaltan transkripsiyonel baskılanmanın ortaya çıktığını göstermektedir.

İnflamazom aktivitesinin engellenmesi kaspaz-1 aktivitesinde görülen azalmaya sebep oluyor olabilir. Literatürde defosforilasyon, ubikütilasyon ve S-nitrozilasyon gibi modifikasyonlarla NLRP3 inflamazomunun aktivitesinin

kontrol altında tutulduğu belirtilmiştir (89). Nöronlarda panneksin 1/P2X7 kanallarının açılmasıyla NLRP1 inflamazom kompleksinin oluştuğu gösterilse de farklı hücrelerde benzer mekanizmalar geçerli olabilir (90). Makrofajlar üzerinde yapılan farklı bir çalışmada pro-kaspaz-1'in inflamazom kompleksi üzerinde dimerize olduktan sonra oluşan ara formu p33'ün p20 ile CARD arasındaki bağı keserek p20/p10 tetramerlerinin sitoplazmada serbest kalmasına yol açtığı gösterilmiştir (91). Serbest proteinin enzimatik aktivitesi olmadığı ve kararsız yapıda olduğu vurgulanmıştır. Kaspaz-1'in aktivitesi olmadığı halde inflamazom kompleksinden ayrılarak sitoplazmada serbest bulunması antikorun p20'ye erişimini artıracığından protein miktarı azalmasına rağmen KYD'den 3 saat sonra sitoplazmada diffüz biçimde görülen, yüksek şiddetteki immünofloresan işaretleme açıklanabilir. Ayrıca, Western blotlamada tespit edilen p20'nin mutlaka aktif kaspaz-1'i temsil ettiği anlamına gelmeyebileceğini düşündürür. Bu nedenlerle *in situ* kaspaz-1 aktivitesinin en iyi göstergesi Il-1 β oluşumu olmalıdır. Nitekim laboratuvarımızda yapılan başka bir çalışmada, kaspaz-1 aktivitesinin zamansal değişimine dair elde edilen bulgularla uyumlu olarak 1M KCl ile 1 saat boyunca indüklenen çoklu KYD'den sonra Il-1 β 'nın sitoplazmada immünofloresan işaretlendiği hücre oranının 6 saat içerisinde bazal değerlere döndüğü tespit edilmiştir (92).

5.3. Nöroinflamasyonun Çözülmesinde NF-kappa B'nin Rolü

NF-kappa B transkripsiyon faktörü ailesi beş farklı üyesinin ikililer oluşturmasıyla işlev gösterir. KYD ile indüklenen inflamasyon gibi steril, doğuştan immün yanıtın oluştuğu durumlarda klasik yolak aktifleşir. Klasik yolakta etkili alt birimler p65, p50 ve cRel'dir (36). Bu alt birimlerin oluşturduğu ikililerden p65/p50 inflamasyonda etkiliyken, p50/p50, cRel/p50 ve cRel/p65 inflamasyonun çözülmesinde etkilidir.

p65 alt biriminin KYD'den yarım saat sonra astrositlerde aktifleştiği gösterildiği için tez çalışmamızda astrositlerdeki p65 aktivitesinin azalmasının/sonlanmasının yanı sıra cRel içeren ikililerin aktifleşmesinin inflamasyonun çözülmesine katkıda bulunabileceği öngörülmüştür. Bu amaçla nöronlarda ve nöron dışı hücrelerde (astrositlerde) KYD'den sonraki 24 saatlik süre zarfında bu alt birimlerin aktivasyonları incelenmiştir. Astrosit belirteçlerinin tüm astrositleri işaretlememesi, izlediğimiz sayısal hücresel tipleme yöntemine bu belirteçlerin elverişli olmadığını düşündürmüştür. Örneğin, bir hücrede NF-kappa B işaretlemesinin çekirdekte görülmesine rağmen astrosit belirteciyle işaretlenmemesi o hücrenin nöron veya mikroglia olarak değerlendirilmesine neden olabilir. Bununla beraber, KYD'den 24 saat sonra dahi mikrogliaların aktifleşmediğinin gösterilmesi, oligodendrositlerin sayıca az olması ve NF-kappa B üyelerini az miktarda ifade etmesi sebepleriyle değerlendirmede karıştırıcı etkilerinin olmayacağı; dolayısıyla NeuN (-) hücrelerin astrositleri yansıttığı düşünülmüştür. Bu nedenle nöronları işaretleyen NeuN ile yapılan ikili değerlendirilmeler daha güvenli bulunmuş ve NeuN (-) ve NF kappa B (+) hücrelerin çok yüksek olasılıkla astrosit olduğu düşünülerek analizler güvenle gerçekleştirilmiştir.

Astrositlerde KYD'den sonraki 5 saatlik zaman diliminde benzer düzeyde görülen p65 aktivasyonunun 24 saat içerisinde azalmaya başlaması, inflamatuvar gen ifadesinin 24 saate kadar devam ettiğini düşündürmektedir. Bununla beraber cRel'in de ilk 5 saat içinde benzer oranda astrositte aktif durumda olması ve bu oranın 24 saat sonunda artması inflamasyonun çözülmesinde etkili mekanizmaların da eş zamanlı aktif olduğunu göstermektedir. NF-kappa B aktivasyonunun sonlanmasında önemli basamaklardan biri hücre çekirdeğine geçen I-kappa B'nin çekirdekteki NF-kappa B ikililerine bağlanarak onları işlevsiz hale getirmesidir. Yapılan incelemelerle astrositlerde KYD'den hemen sonra I-kappa B çekirdekte saptanmıştır. KYD'den hemen sonra cRel'in aktifleşmesi ve I-kappa B'nin çekirdekteki aktif dimerleri bağlaması; 24 saat sonunda ise cRel aktivitesi daha

da artarken p65 aktivitesinin azalması inflamasyonun çözülmesine katkıda bulunan mekanizmalardır.

Nöronlardan salıverilen HMGB1 ve Il-1 β 'nin etkilerinin sonlanmasına dair literatür ne yazık ki yetersizdir. Ancak, kaspaz-1 aktivitesinin 3 saat içinde azalmasına ve KYD'den hemen sonra HMGB1 içeriğini salıveren hücre miktarının zamanla artmamasına rağmen p65 aktivitesinin ancak 24 saatte azalmaya başlaması astrositlerde uyarandan bağımsız olarak NF-kappa B kinetiklerinin de dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. Örneğin, fare embriyonik makrofaj kültürünün yalnızca 1 dakika TNF- α ile uyarılmasıyla p65 aktivitesinin bir saat boyunca sürdüğü gösterilmiştir (93).

Aynı zaman noktalarında birbirine yakın oranda astrosit çekirdeğinde cRel, p65 ve I-kappa B saptanması inflamasyon üzerinde etkisi farklı olan mekanizmaların aynı hücrede aktif olabileceği izlenimini vermektedir. Çalışmamızda yalnızca alt birimlerin çekirdekte konumlanmaları üzerinden değerlendirme yapılmış olup kesin olarak hangi ikililerin aktif durumda olduğu henüz incelenmemiştir. Bu nedenle astrositlerde KYD ile aktifleşen p65, inflamatuvar transkriptlerin ifadesini başlattığı düşünülen p65/p50 ikilisi yerine cRel/p65 ikilisinin bir üyesi olarak bulunuyor olabilir. Bu durumda ifade edilen genler farklı olacaktır. Örneğin p65/p50 ikilisi iNOS, COX2, TNF- α gibi inflamatuvar genlerin ifadesini sağlarken cRel içeren ikililer TGF- β , Bcl-x gibi anti-inflamatuvar/ sağ kalım genlerinin ifadesini sağlamaktadır (37). Bununla beraber, aynı hücrede örneğin p65/p50 ile cRel/p50 ikilisi beraber transkripsiyon sağlıyorsa, bunun sonucunda hücrenin net davranışını belirleyecek olan bu transkriptlerin birbirlerine üstünlüğü olacaktır. Ayrıca, cRel veya p65 aktifleştğinde klasik yolakta etkili alt birimlerin ve I-kappa B proteinlerinin transkripsiyonunu sağlamaktadır. Bu nedenle zaman içerisinde aynı hücre içinde baskın durumda olan ikililer değişebilir. Örneğin makrofajlarda yapılan bir çalışmada LPS uyarımı sonrasında p65/p50 ikilisinin aktifleşmesinin cRel ifadesini artırdığı ve sonrasında oluşan cRel/p65 ikilisinin LPS'nin indüklediği inflamasyonun çözülmesinde etkili olduğu gösterilmiştir

(41). Tüm bu durumlar dikkate alındığında bir sonraki aşamada ikililer belirlenmeli ve ifade edilen pro- ve anti-inflamatuvar transkriptlerin zaman içinde değişimi saptanmalıdır.

5.4. Nöronlarda NF-kappa B'nin Sinaps Düzenlenmesindeki Rolü

KYD ile nöronlarda NF-kappa B cRel ve p65'in aktivasyon düzeyleri farklı bulunmuştur. cRel'in naif beyinde nöronların yaklaşık üçte birinde konstitütif bir aktivitesi olduğu ve KYD ile bu oranın 24 saat sonunda arttığı görülmüştür. cRel (-/-) transgenik farenin 18 aya ulaştığında substantia nigra pars kompaktadaki dopaminerjik nöronlarının sayıca azaldığı ve bazal gangliadaki mikroglia aktivitesinde artış olduğu gösterilmiştir (94). Bu bulgular, nöronlarda cRel'in hem sağ kalım için gerekli olduğunu hem de cRel eksikliğinin inflamasyona yatkın bir durum yarattığını göstermektedir. p65'in astrositlerde nöronlardan fazla ifade edilmesine rağmen, cRel'in mikroglialardan sonra en çok ifade edildiği hücre grubunun nöronlar olması da cRel'in nöronlarda inflamasyondan farklı bir fonksiyonu olduğunu düşündürür niteliktedir (76). Literatürde cRel ve p65'in öğrenme ve sinaptik plastisiteyle ilişkisini gösteren birçok yayın bulunmaktadır (95). NMDA uyarımıyla sinapslarda p65'in I-kappa B'den ayrılarak aktifleştigi ve çekirdeğe göç ettiği gösterilmiştir (96). Benzer biçimde, hipokampüste metabotropik glutamat reseptörlerinin aktivasyonu ile NF-kappa B p65, cRel ve p50'nin sinapslardan çekirdeğe göç ederek DNA'ya bağlandığı gösterilmiştir (97). Bu nedenle KYD'den sonra nöron uzantılarında görülen p65 aktivitesi bir inflamatuvar yanıt olarak değerlendirilmemiş, KYD sırasındaki artmış glutamaterjik aktivitenin ve NMDA uyarımının sonucunda oluştuğu düşünülmüştür. cRel ve p65'in sinaptik çıkıntılarının yeniden düzenlenmesinde görev alması KYD'den sonra dendritlerde görülen yoğun işaretlenmenin nedeni olabilir.

Bu çalışmada, KYD ile nöronal çekirdeklerden hemen saliverilen HMGB1'in, KYD'den 24 saat sonra bile çekirdeğe geri dönmediği görüldü. Bununla birlikte, nörondan saliverilen eksozomların HMGB1 taşıdığı ve periferik kana karıştığı gösterildi. Kaspaz-1 aktivitesinin KYD'den 3 saat sonra azalmaya başladığı saptandı. Astrositlerde cRel ve p65'in KYD ile hemen aktifleştiği, KYD'den 24 saat sonra p65 aktivasyonunun azalmaya başladığı ve cRel aktivasyonunun arttığı tespit edildi. I-kappa B'nin de inflamasyonun tetiklenmesiyle astrositlerde çekirdeğe göç ettiği görüldü. Sonuç olarak, KYD ile tetiklenen inflamasyonun astrositler tarafından çift yönlü düzenlendiği; inflamasyonun çözülmesinde rol oynayan süreçlerin, pro-inflamatuvar süreçlerle birlikte yönetildiği düşünüldü. Çalışmanın zaman içinde oluşan çiftlerin ve bu çiftlerin transkripsiyon ürünlerinin tek hücre düzeyinde saptanmasıyla devamına karar verildi. Bu bulgulardan ayrı olarak, cRel'in nöronlarda konstitütif transkripsiyonel aktivite gösterdiği tespit edildi. KYD sonrası nöronlarda aktifleşen p65 ve cRel'in sinaptik çıkıntılarının yeniden düzenlenmesinde etkili olabileceği düşünüldü.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- KYD ile HMGB1 15 dakika içinde nöronlardan salıverilmektedir. Salıverilen HMGB1, 24 saat içinde henüz yerine konmamaktadır. Bu bulgu, KYD ile tetiklenen inflamasyonun çözülmesine HMGB1'in nöronlar tarafından geri alınmasının bir katkısı olmadığını göstermektedir.
- HMGB1'in nöron çekirdeklerine yeniden döndüğü noktanın belirlenmesi için daha ileri zaman noktaları değerlendirilmeli ve HMGB1 mRNA düzeyi incelenmelidir.
- KYD ile kortekste nöronlardan salıverilen eksozomların HMGB1 taşıdıkları gösterilmiştir. Ancak, periferik kandan ayrıştırılan nöron kökenli eksozomlar için elde edilen plazmanın yetersizliği nedeniyle veriler cesaret verici ön bulgu düzeyinde kalmıştır.
- Periferik kanda eksozomlar aracılığıyla taşınan HMGB1'in değerlendirilmesi için örnekler havuzlanacak şekilde deney dizaynı yapılmalı veya sıçan serumlarında eksozom izolasyonu deneyleri tekrarlanmalıdır.
- KYD'den hemen sonra aktiveleşen kaspaz-1'in etkinliği KYD'den 3 ve 5 saat sonra 1 saat sonrasına kıyasla azalmış bulunmuştur. Enzim aktivitesinin niceliksel değerlendirilebilmesi için kaspaz-1 ile yıkıldığında nesnel olarak ölçülebilecek bir ürün ortaya çıkaran kromojenik substratla korteks dokusu muamele edilecektir. Benzer şekilde tek KYD'den sonra kortikal nöronlarda IL-1 β 'nin aktiveleşmesi ve bunun sönümlenmesinin zaman profili de bu amaçla takip edilebilir.
- Nöron dışı hücrelerde cRel ve p65'in KYD ile hemen aktiveleştiği, bu aktivasyonun en az 5 saat boyunca sürdüğü ve 24 saate cRel için arttığı; p65 için ise azalma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Pro-inflamatuvar ve inflamasyonun çözülmesinde rol oynayan yolakların eş zamanlı aktiveleştiğini doğrulamak için aktif durumdaki ikililer tespit edilecektir.

- p65 ve cRel'e bağlanarak bu alt birimleri DNA'dan ayıran I-kappa B'nin nöron dışı hücrelerde çekirdeğe göç ettiği görülmüş; böylece, I-kappa B'nin de inflamasyonun çözülmesine katkı sağladığı düşünülmüştür. I-kappa B'nin çekirdekte hangi dimerlere bağlı durumda olduğu tespit edilmelidir.
- KYD'den sonra incelenen 24 saatlik zaman diliminde indüklenen pro-ve anti- inflamatuvar transkriptler belirlenmeli, bu transkriptlerin zamansal profili ortaya konmalıdır.
- cRel'in nöronların bir kısmında konstitütif olarak transkripsiyonel aktivite gösterdiği ve KYD ile 24 saat sonunda cRel'in aktifleştiği saptanmıştır. Bu nöronların özellikleri tanımlanmalıdır.
- Nöronlarda KYD'den sonra görülen kısmi p65 aktivitesinin fonksiyonel sonuçlarını tayin edebilmek için sinaptik plastisite ve inflamasyonla ilgili transkriptler değerlendirilmelidir.
- Sonuç olarak KYD'nin tetiklediği inflamatuvar cevap, nöronlarda kaspaz-1 etkinliğinin bitmesi ve astrositlerde anti-inflamatuvar c-Rel ve I-kappa B aktivitesini içeren kompleks bir süreçle yaklaşık 24 saat içinde sonlanmaktadır. Tek hücre transkriptom çalışmaları bu olayların hücresele detaylarını ortaya koymak için gereklidir.

7. KAYNAKLAR

1. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia*. 2018;38(1):1-211.
2. American Headache S. The American Headache Society Position Statement On Integrating New Migraine Treatments Into Clinical Practice. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2019;59(1):1-18.
3. Dalkara T, Moskowitz MA. From cortical spreading depression to trigeminovascular activation in migraine. In: Dalkara T, Moskowitz MA, editors. *Neurobiological Basis of Migraine: Wiley-Blackwell*; 2017. p. 267-84.
4. 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 (New York, NY)*. 2013;339(6123):1092-5.
5. Perkins ND. The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(2):121-32.
6. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet (London, England)*. 2017;390(10100):1211-59.
7. Lipton RB, Bigal ME, Steiner TJ, Silberstein SD, Olesen J. Classification of primary headaches. *Neurology*. 2004;63(3):427-35.
8. Leao AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*. 1944;7:359-90.
9. Ayata C, Lauritzen M. Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiological reviews*. 2015;95(3):953-93.
10. Ayata C. Cortical spreading depression triggers migraine attack: pro. *Headache*. 2010;50(4):725-30.
11. Lashley KS. Patterns of Cerebral Integration Indicated by the Scotomas of Migraine. *Archives of Neurology & Psychiatry*. 1941;46(2):331-9.
12. Milner PM. Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leao. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1958;10(4):705.
13. Olesen J, Larsen B, Lauritzen M. Focal hyperemia followed by spreading oligemia and impaired activation of rCBF in classic migraine. *Annals of neurology*. 1981;9(4):344-52.
14. Woods RP, Iacoboni M, Mazziotta JC. Bilateral Spreading Cerebral Hypoperfusion during Spontaneous Migraine Headache. *New England Journal of Medicine*. 1994;331(25):1689-92.
15. Sanchez del Rio M, Bakker D, Wu O, Agosti R, Mitsikostas DD, Ostergaard L, et al. Perfusion weighted imaging during migraine: spontaneous visual aura and headache. *Cephalalgia*. 1999;19(8):701-7.
16. Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, et al. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001;98(8):4687-92.

17. Bowyer SM, Aurora KS, Moran JE, Tepley N, Welch KM. Magnetoencephalographic fields from patients with spontaneous and induced migraine aura. *Annals of neurology*. 2001;50(5):582-7.
18. Milakara D, Grozea C, Dahlem M, Major S, Winkler MKL, Lüchl J, et al. Simulation of spreading depolarization trajectories in cerebral cortex: Correlation of velocity and susceptibility in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *NeuroImage: Clinical*. 2017;16:524-38.
19. M. SA, A M-C. Physiology of the meningeal sensory pathway. In: Dalkara T, Moskowitz MA, editors. *Neurobiological Basis of Migraine: Wiley-Blackwell*; 2017. p. 31-47.
20. Levy D. Meningeal neurogenic inflammation and dural mast cells in migraine pain. *Neurobiological Basis of Migraine: Wiley-Blackwell*; 2017. p. 107-23.
21. Pietrobon D, Moskowitz MA. Pathophysiology of migraine. *Annual review of physiology*. 2013;75:365-91.
22. Thompson CS, Hakim AM. Cortical spreading depression modifies components of the inflammatory cascade. *Molecular neurobiology*. 2005;32(1):51-7.
23. Urbach A, Bruehl C, Witte OW. Microarray-based long-term detection of genes differentially expressed after cortical spreading depression. *The European journal of neuroscience*. 2006;24(3):841-56.
24. Eising E, Shyti R, t Hoen PAC, Vijfhuizen LS, Huisman SMH, Broos LAM, et al. Cortical Spreading Depression Causes Unique Dysregulation of Inflammatory Pathways in a Transgenic Mouse Model of Migraine. *Molecular neurobiology*. 2017;54(4):2986-96.
25. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nature medicine*. 2002;8(2):136-42.
26. Zhang X, Levy D, Noseda R, Kainz V, Jakubowski M, Burstein R. Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(26):8807-14.
27. Ayata C, Jin H, Kudo C, Dalkara T, Moskowitz MA. Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Annals of neurology*. 2006;59(4):652-61.
28. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*. 2014;157(5):1013-22.
29. Chen SP, Qin T, Seidel JL, Zheng Y, Eikermann M, Ferrari MD, et al. Inhibition of the P2X7-PANX1 complex suppresses spreading depolarization and neuroinflammation. *Brain : a journal of neurology*. 2017;140(6):1643-56.
30. Albrecht DS, Mainero C, Ichijo E, Ward N, Granziera C, Zürcher NR, et al. Imaging of neuroinflammation in migraine with aura. *Neurology*. 2019:10.1212/WNL.0000000000007371.
31. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell*. 2010;140(6):871-82.

32. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010;140(6):771-6.
33. Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Frontiers in immunology*. 2016;7:160.
34. Pennypacker KR, Kassed CA, Eidizadeh S, Saporta S, Sanberg PR, Willing AE. NF-kappaB p50 is increased in neurons surviving hippocampal injury. *Experimental neurology*. 2001;172(2):307-19.
35. Neal JW, Gasque P. How does the brain limit the severity of inflammation and tissue injury during bacterial meningitis? *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2013;72(5):370-85.
36. Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF-kappaB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell*. 2017;168(1-2):37-57.
37. Lawrence T, Fong C. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010;42(4):519-23.
38. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009;1(6):a001651.
39. Bunting K, Rao S, Hardy K, Woltring D, Denyer GS, Wang J, et al. Genome-wide analysis of gene expression in T cells to identify targets of the NF-kappa B transcription factor c-Rel. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;178(11):7097-109.
40. Gilmore TD, Gerondakis S. The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease. *Genes & cancer*. 2011;2(7):695-711.
41. Muxel SM, Laranjeira-Silva MF, Carvalho-Sousa CE, Floeter-Winter LM, Markus RP. The RelA/cRel nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) dimer, crucial for inflammation resolution, mediates the transcription of the key enzyme in melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages. *Journal of pineal research*. 2016;60(4):394-404.
42. Sarnico I, Lanzillotta A, Boroni F, Benarese M, Alghisi M, Schwaninger M, et al. NF-kappaB p50/RelA and c-Rel-containing dimers: opposite regulators of neuron vulnerability to ischaemia. *Journal of neurochemistry*. 2009;108(2):475-85.
43. Valerio A, Dossena M, Bertolotti P, Boroni F, Sarnico I, Faraco G, et al. Leptin is induced in the ischemic cerebral cortex and exerts neuroprotection through NF-kappaB/c-Rel-dependent transcription. *Stroke*. 2009;40(2):610-7.
44. Durand D, Carniglia L, Caruso C, Lasaga M. Reduced cAMP, Akt activation and p65-c-Rel dimerization: mechanisms involved in the protective effects of mGluR3 agonists in cultured astrocytes. *PloS one*. 2011;6(7):e22235.
45. Saldana M, Mullol J, Aguilar E, Bonastre M, Marin C. Nuclear factor kappa-B p50 and p65 subunits expression in dementia with Lewy bodies. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2007;33(3):308-16.
46. Taetzsch T, Levesque S, McGraw C, Brookins S, Luqa R, Bonini MG, et al. Redox regulation of NF-kappaB p50 and M1 polarization in microglia. *Glia*. 2015;63(3):423-40.
47. Sen R, Smale ST. Selectivity of the NF-{kappa}B response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(4):a000257.

48. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFkappaB system. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine*. 2016;8(3):227-41.
49. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81(1):1-5.
50. Stros M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1799(1-2):101-13.
51. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1alpha, IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cellular & molecular immunology*. 2017;14(1):43-64.
52. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO reports*. 2002;3(10):995-1001.
53. Hanke ML, Kielian T. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2011;121(9):367-87.
54. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, et al. HMGB1 in health and disease. *Molecular aspects of medicine*. 2014;40:1-116.
55. Lamkanfi M, Sarkar A, Vande Walle L, Vitari AC, Amer AO, Wewers MD, et al. Inflammasome-Dependent Release of the Alarmin HMGB1 in Endotoxemia. *The Journal of Immunology*. 2010:1000803.
56. Nakahara T, Tsuruta R, Kaneko T, Yamashita S, Fujita M, Kasaoka S, et al. High-mobility group box 1 protein in CSF of patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurocritical care*. 2009;11(3):362-8.
57. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(8):569-79.
58. Kawikova I, Askenase PW. Diagnostic and therapeutic potentials of exosomes in CNS diseases. *Brain research*. 2015;1617:63-71.
59. Zhang B, Yin Y, Lai RC, Lim SK. Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. *Frontiers in immunology*. 2014;5:518.
60. Faure J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, et al. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Molecular and cellular neurosciences*. 2006;31(4):642-8.
61. Zhang G, Yang P. A novel cell-cell communication mechanism in the nervous system: exosomes. *Journal of neuroscience research*. 2018;96(1):45-52.
62. Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming F, J., Belly A, Bodon G, et al. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2011;46(2):409-18.
63. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer D, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*. 2008;10(12):1470-6.
64. Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, et al. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by

exosomes and impacts neuronal survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(20):6838-51.

65. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, et al. Cells release prions in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(26):9683-8.

66. Rajendran L, Hoshino M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, et al. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(30):11172-7.

67. Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(7):463-77.

68. de Rivero Vaccari JP, Brand F, 3rd, Adamczak S, Lee SW, Perez-Barcena J, Wang MY, et al. Exosome-mediated inflammasome signaling after central nervous system injury. *Journal of neurochemistry*. 2016;136 Suppl 1:39-48.

69. Dehghani Mohammadi A. Parenchymal Neuroinflammation in Familial Hemiplegic Migraine Type I Transgenic Mouse Model After Cortical Spreading Depression [PhD]: Hacettepe University; 2019.

70. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PloS one*. 2008;3(11):e3694.

71. Ma J, Qiu J, Hirt L, Dalkara T, Moskowitz MA. Synergistic protective effect of caspase inhibitors and bFGF against brain injury induced by transient focal ischaemia. *British journal of pharmacology*. 2001;133(3):345-50.

72. Karatas H, Aktas Y, Gursoy-Ozdemir Y, Bodur E, Yemisci M, Caban S, et al. A nanomedicine transports a peptide caspase-3 inhibitor across the blood-brain barrier and provides neuroprotection. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(44):13761-9.

73. Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkiewicz M, Sand J, Beer H-D. Caspase-1: The inflammasome and beyond. *Innate Immunity*. 2014;20(2):115-25.

74. Sun W, Cornwell A, Li J, Peng S, Osorio MJ, Aalling N, et al. SOX9 Is an Astrocyte-Specific Nuclear Marker in the Adult Brain Outside the Neurogenic Regions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2017;37(17):4493-507.

75. Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1996;44(10):1167-71.

76. Saunders A, Macosko EZ, Wysoker A, Goldman M, Krienen FM, de Rivera H, et al. Molecular Diversity and Specializations among the Cells of the Adult Mouse Brain. *Cell*. 2018;174(4):1015-30.e16.

77. Takizawa T, Shibata M, Kayama Y, Shimizu T, Toriumi H, Ebine T, et al. High-mobility group box 1 is an important mediator of microglial activation induced by cortical spreading depression. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2016;37(3):890-901.


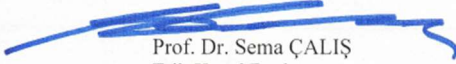
78. Fang P, Schachner M, Shen YQ. HMGB1 in development and diseases of the central nervous system. *Molecular neurobiology*. 2012;45(3):499-506.

79. Sen ZD. Elektrokonvulzif Nöbetlerin Farelerde Noroinflamatuvar Yanıt Üzerindeki Olası Etkisi ve Bu Etkinin Doğurduğu Sonuçların İncelenmesi [PhD]: Hacettepe Üniversitesi; 2017.
80. Lu B, Wang H, Andersson U, Tracey KJ. Regulation of HMGB1 release by inflammasomes. *Protein & Cell*. 2013;4(3):163-7.
81. Takizawa T, Shibata M, Kayama Y, Toriumi H, Ebine T, Koh A, et al. Temporal profiles of high-mobility group box 1 expression levels after cortical spreading depression in mice. *Cephalgia*. 2015;36(1):44-52.
82. Liu S, Stolz DB, Sappington PL, Macias CA, Killeen ME, Tenhunen JJ, et al. HMGB1 is secreted by immunostimulated enterocytes and contributes to cytomix-induced hyperpermeability of Caco-2 monolayers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2006;290(4):C990-C9.
83. Hernández-Pando R, Barrios-Payán J, Mata-Espinosa D, Marquina-Castillo B, Hernández-Ramírez D, Botasso OA, et al. The Role of High Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) in the Immunopathology of Experimental Pulmonary Tuberculosis. *PloS one*. 2015;10(7):e0133200.
84. Sun B, Dalvi P, Abadjian L, Tang N, Pulliam L. Blood neuron-derived exosomes as biomarkers of cognitive impairment in HIV. *AIDS*. 2017;31(14):F9-F17.
85. Erdener SE. Migren Atagi Sirasinda Serum Inflamazom Aktivasyonu Belirteçlerinin Analizi: Hacettepe Üniversitesi; 2014.
86. Maness PF, Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci*. 2007;10(1):19-26.
87. Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Miller BL, et al. Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology*. 2015;85(1):40-7.
88. Janas AM, Sapoń K, Janas T, Stowell MHB, Janas T. Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2016;1858(6):1139-51.
89. Poudel B, Gurung P. An update on cell intrinsic negative regulators of the NLRP3 inflammasome. *Journal of leukocyte biology*. 2018.
90. Silverman WR, de Rivero Vaccari JP, Locovei S, Qiu F, Carlsson SK, Scemes E, et al. The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(27):18143-51.
91. Boucher D, Monteleone M, Coll RC, Chen KW, Ross CM, Teo JL, et al. Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *The Journal of experimental medicine*. 2018;215(3):827-40.
92. Yemisci M SB, Yilmaz-Ozcan S, Donmez-Demir B, Karatas-Kursun H, Eren-Kocak E, Dalkara T. Cortical spreading depression induces expression of BDNF and pro-BDNF proteins, which may impact neuroinflammation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2019;39(1_suppl):519.

93. Werner SL, Kearns JD, Zadorozhnaya V, Lynch C, O'Dea E, Boldin MP, et al. Encoding NF-kappaB temporal control in response to TNF: distinct roles for the negative regulators Ikbalpha and A20. *Genes & development*. 2008;22(15):2093-101.
94. Baiguera C, Alghisi M, Pinna A, Bellucci A, De Luca MA, Frau L, et al. Late-onset Parkinsonism in NFkappaB/c-Rel-deficient mice. *Brain : a journal of neurology*. 2012;135(Pt 9):2750-65.
95. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF-KappaB in Long-Term Memory and Structural Plasticity in the Adult Mammalian Brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2015;8(69).
96. Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA. Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF-kappa B in primary neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(21):9618-22.
97. O'Riordan KJ, Huang IC, Pizzi M, Spano P, Boroni F, Egli R, et al. Regulation of nuclear factor kappaB in the hippocampus by group I metabotropic glutamate receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(18):4870-9.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışmasıyla İlgili Etik Kurul İzinleri

	T.C. HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Sayı : 52338575 -18	
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI	
TOPLANTI TARİHİ	: 21.02.2017 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2017/02
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2017/10
KARAR NUMARASI	: 2017/10 -5
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Turgay DALKARA
HAYVAN DENEYLERİNDEN	
SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Prof. Dr. Müge Yemişçi ÖZKAN, Doç. Dr. Hülya Karataş KURŞUN, Dr. Nebiye Buket DEMİR, Zeynep KAYA
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Prof. Dr. Müge Yemişçi ÖZKAN, Doç. Dr. Hülya Karataş KURŞUN, Doç. Dr. Emine Eren KOÇAK, Dr. Nebiye Buket DEMİR, Dr. Sinem Yılmaz ÖZCAN, Zeynep KAYA
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 140 Adet Swiss Albino Fare (25-35 gr)
<p>Üniversitemiz Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Turgay DALKARA' nın araştırma yürütücüsü olduğu 2017/10 kayıt numaralı "Kortikal Yayılan Depolarizasyonun Tetiklediği Nöroinflamasyonun Çözülmesi ve Bunun Migren Patofizyolojisindeki Yeri" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi' ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.</p>	
<p>Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.</p>	
 Prof. Dr. Sema ÇALIŞ Etik Kurul Başkanı	
<p>Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 06100 Sıhhiye-Ankara Ayrıntılı Bilgi için: Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php</p>	



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 -62

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 07.06.2018 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2018/06
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2018/30
KARAR NUMARASI	: 2018/30 – 01
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Turgay DALKARA
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Zeynep KAYA, Prof. Dr. Müge Yemişçi ÖZKAN,
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: Dr. Buket Nebiye DEMİR, Doç. Dr. Hülya Karataş KURŞUN
DİĞER YARDIMCI	: Prof. Dr. Emine Eren KOÇAK, Dr. Sinem Yılmaz
ARAŞTIRMACILAR	: ÖZCAN
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	: <i>27 Adet Swiss Albino(25-35 gr), 3 Adet C57BL/6J</i>
SAYISI	: <i>(25-35 gr.), 15 Adet C57BL/6J-Thy1-COP4/EYFP</i> <i>(25-35 gr.)</i>

Üniversitemiz Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Turgay DALKARA'nın araştırma yürütücüsü olduğu 2018/30 kayıt numaralı "*Migren Baş Ağrısına Yol Açan Nöroinflamasyonun Çözülme ve Sonlanma Mekanizmaları*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Araştırma yürütücüsü Kurulumuza araştırma projesinin bitiş tarihini bildirmek ve proje sonuç raporunu sunmak ile yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

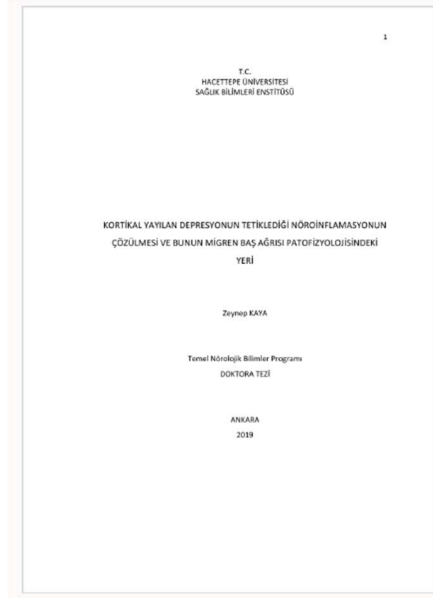


Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Zeynep Kaya
Ödev başlığı: Revizyon sonrası
Gönderi Başlığı: KORTİKAL YAYILAN DEPRESYONU.
Dosya adı: TEZ-ZK-turnitin rev sonrası.docx
Dosya boyutu: 29.82M
Sayfa sayısı: 89
Kelime sayısı: 16,133
Karakter sayısı: 114,825
Gönderim Tarihi: 26-Ağu-2019 05:05PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1163621077



1

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KORTİKAL YAYILAN DEPRESYONUN TETİKLEDİĞİ NÖROİNFLAMASYONUN
ÇÖZÜLMESİ VE BUNUN MİGREN BAŞ AĞRISI PATOFİZYOLOJİSİNDEKİ
YERİ

7aunna VAVA

Eşleşmelere Genel Bakış

%2

- 1 nazanyildiz.blogspot.c...
internet kaynağı %<1
- 2 www.turkpsikiyatri.com
internet kaynağı %<1
- 3 docplayer.biz.tr
internet kaynağı %<1
- 4 digital.lib.washington.e...
internet kaynağı %<1
- 5 www.openaccess.hace...
internet kaynağı %<1
- 6 polen.itu.edu.tr
internet kaynağı %<1
- 7 www.pnas.org
internet kaynağı %<1
- 8 Xiang Liu, Xiaoping Su, ...
Yayın %<1

Sayfa: 1 / 89 Kelime Sayısı: 16133

Text-only Report High Resolution Açık

9. ÖZGEÇMİŞ

EĞİTİM

- Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıp-Bilim Doktoru Bütünleşik Programı (2011-2019; mezuniyet notu: 3.55/4.00)
- Temel Nörolojik Bilimler Doktora Programı (2013-2019; mezuniyet notu: 3.81/4.00)
- Ankara Atatürk Anadolu Lisesi (2007-2011, üniversite giriş sınavı sıralaması: 1,5 milyon öğrenci içinden 236.)

ÖDÜLLER

- Prof. M. Şeref Zileli Ödülü, yılın başarılı stajyeri, 2016
- Türkiye Nöroloji Derneği, Tıp Fakültesi Öğrenci Bursları, 2016 (Münih, Ludwig-Maximilians Üniversitesi'nde tamamlanmış olan staj için verilen)
- En iyi üçüncü sözlü sunum ödülü, 16. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2019

DEVAM EDEN PROJELER

- Kortikal Yayılan Depresyonunun Tetiklediği İnflamasyonun Çözülmesi ve Bunun Migren Baş Ağrısı Patofizyolojisindeki Yeri, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (Haziran 2017-)
- Migren Baş Ağrısına Neden Olan Nöroinflamasyonun Çözülme ve Sonlanma Mekanizmaları, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (Kasım 2018-)

KONGRE SUNUMLARI

- 16. Türk Sinirbilim Kongresi, 20-23 Mayıs 2018, Sözlü sunum
“Kortikal Yayılma Depresyonunun Tetiklediği Meningeal İnflamasyonda NF-kappa B p65'in Rolü”
- 49. *Society for Neuroscience* Kongresi, 19-23 Ekim 2019, Sözlü sunum (nanosempozyum)
“Resolution of Parenchymal Neuroinflammation Triggered by Cortical Spreading Depression”

STAJLAR

- Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (Haziran 2012)
- Hacettepe Hastaneleri, İn Vitro Fertilizasyon Laboratuvarı (Temmuz 2012)
- Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi (Ağustos 2013)
- Yeni Nesil ve Kablosuz Haberleşme Laboratuvarı, Elektrik ve Elektronik Mühendisliği Bölümü, Koç Üniversitesi, "Minerva Projesi", İstanbul (Temmuz 2015)
- Ludwig-Maximilians Üniversitesi, İnme ve Demans Araştırma Enstitüsü, Münih, Almanya (Haziran ve Temmuz 2016)

KURSLAR

- Elektronöromyografi kursu (30 Nisan 2015, Selçuk Üniversitesi, Konya)
- Hücresel Görüntüleme Teknikleri Çalıştayı (12-15 Aralık 2016, İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü)
- Laboratuvar Hayvanları Kullanım Sertifikası (Yayın tarihi: 10 Mart 2015, Belge numarası: 305, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Etik Kurulu)

ÜYELİKLER

- Türk Nöroloji Derneği
- Türkiye Beyin Araştırmaları ve Sinir Bilimleri Derneği
- Society for Neuroscience

YABANCI DİLLER

- İngilizce (ileri) (YDS sonucu: 95/100 (A), sınav tarihi:24.03.2019)
- Almanca (başlangıç)