



**T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİGREN PATOFİZYOLOJİSİNDE ADENOSİN TRİFOSFAT VE
RESEPTÖRLERİNİN ROLÜ VE OLASI TEDAVİ
PROTOKOLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Erkan KILINÇ

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**Temmuz 2014
BOLU**



**T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİGREN PATOFİZYOLOJİSİNDE ADENOSİN TRİFOSFAT VE
RESEPTÖRLERİNİN ROLÜ VE OLASI TEDAVİ
PROTOKOLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Erkan KILINÇ

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI*
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatma TÖRE**

**ORTAK TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Seyit ANKARALI**

**Temmuz 2014
BOLU**

***AİBÜ ve Düzce Üniversitesi Fizyoloji Ortak Doktora Programı**

Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Fizyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kenan GÜMÜŞTEKİN*

(imza)

(Fizyoloji, AİBÜ)

Prof. Dr. Fatma TÖRE**

(imza)

(Fizyoloji, AİBÜ)

Doç. Dr. Seyit ANKARALI

(imza)

(Fizyoloji, Düzce Ü.)

Doç. Dr. Şerif DEMİR

(imza)

(Fizyoloji, Düzce Ü.)

Prof. Dr. Mustafa GÜL

(imza)

(Fizyoloji, Atatürk Ü.)

21/07/2014

Bu tez ile AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Erkan KILINÇ 'ın Doktora derecesini onaylamıştır.

Doç. Dr. M.Esra KOÇOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

(imza)

*Jüri başkanı
**Tez danışmanı

ÖZET

Migren Patofizyolojisinde Adenozin Trifosfat ve Reseptörlerinin Rolü ve Olası Tedavi Protokollerinin Geliştirilmesi

Migren, yenileyici tek taraflı baş ağrısı ile karakterize nörovasküler bir hastalıktır. Dura mater, baş ağrılarınin oluşumundan sorumlu en önemli yapılardan biridir ve çok sayıda mast hücresi içermektedir. Meninkslerin trigeminal innervasyonu migren ağrısı için morfolojik bir substrat sağlar. Purinoseptörleri aracılığıyla ağrıya yol açan ATP' nin, migren patofizyolojisinde rolü olabileceği hipotezimizin temelini oluşturmaktadır. Sunulan çalışmada ATP ve reseptörlerinin migren patofizyolojisindeki rolleri ve olası tedavi protokollerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada *suction elektrot* ve Ca^{+2} -görüntüleme yöntemleri kullanıldı. Elektrofizyolojik kayıtlar için yapay BOS içinde sıçan hemi kranyumları hazırlandı ve ATP (100 μ M), ADP (100 μ M), AMP (100 μ M), adenozin (100 μ M), α - β MeATP (20 μ M, P2X₂, P2X₃, P2X_{2/3} agonisti), 2MeSADP (20 μ M, P2Y₁ agonisti), BzATP (100 μ M, P2X₇ agonisti), Suramin (100 μ M, P2 antagonisti), A-317491 (1 μ M, P2X₃ antagonisti); Ca^{+2} -görüntüleme için saf nöron ve mast hücre-nöron ko-kültürüne ATP (100 μ M), Compound 48/80 (10 μ g/ml) ve Suramin (100 μ M) uygulandı. Ayrıca hemi kranyumlara *ex-vivo* ATP (100 μ M) ve Compound 48/80 (10 μ g/ml) uygulandı. Veriler t-testi ile SPSS 17.0 ' da analiz edildi.

ATP ve α - β MeATP meninkslerde ağrı spike' larını artırırken ($p<0,01$) BzATP, 2MeSADP, ADP, AMP ve adenozin etki oluşturmadi. ATP nöronlara Ca^{+2} girişini artırdı ($p<0,05$). Compound 48/80 mast hücre-nöron ko-kültüründe Ca^{+2} girişini artırdı ($p<0,05$) ve bu Suramin tarafından bloke edildi. Compound 48/80 mast hücre degranülasyonunu ve meningiyal arterlerin çapını artırdı ($p<0,05$).

Migren patofizyolojisinde, ATP P2X₂, P2X₃ ve P2X_{2/3} reseptörleri üzerinden ağrı spike' larını tetikleyerek direk, mast hücreleri ise ATP aracılığı ile dolaylı rol oynamaktadır. P2X₂, P2X₃ ve P2X_{2/3} reseptör antagonistleri migrenin yeni tedavi seçeneği olabilir.

Anahtar Kelimeler: Migren, ATP, ATP reseptörleri, ağrı, nosiseptör.

ABSTRACT

The Role of Adenosine Triphosphate and Its Receptors In Migraine Pathophysiology and To Develop Possible Treatment Protocols

Migraine is a neurovascular disease characterized by recurrent unilateral headache. The dura mater is one of the most important structures in the generation of headaches and it contains many mast cells. Trigeminal innervations of meninges provide a morphological substrate for migraine pain. The fact that ATP lead to pain via its purinoceptors that could play a role in migraine pathophysiology constituted basis of our hypothesis. In the present study, it was aimed to investigate the role of ATP and its receptors in migraine pathophysiology and to develop possible treatment protocols.

In the study, *suction electrode* and Ca^{+2} -imaging methods were used. Rat hemi skulls in artificial cerebrospinal fluid were prepared for electrophysiologic recordings. The preparations were applied ATP (100 μM), ADP (100 μM), AMP (100 μM), adenosine (100 μM), α - β MeATP (20 μM , P2X_2 , P2X_3 , $\text{P2X}_{2/3}$ agonist), 2MeSADP (20 μM , P2Y_1 agonist), BzATP (100 μM , P2X_7 agonist), Suramin (100 μM , P2 antagonist), A-317491 (1 μM , P2X_3 antagonist). For Ca^{+2} -imaging, pure neuron and mast cell-neuron co-culture were exposed to ATP (100 μM), Compound 48/80 (10 $\mu\text{g/ml}$) and Suramin (100 μM). In addition, hemi skulls were exposed *ex-vivo* to ATP (100 μM) and compound 48/80 (10 $\mu\text{g/ml}$). The data were compared with t-test by using SPSS 17.0.

While ATP and α - β MeATP increased pain spikes ($p<0,01$); BzATP, 2MeSADP, ADP, AMP and adenosine did not reveal any effect in meninges. ATP increased Ca^{+2} influx in the neurons ($p<0,05$). Compound 48/80 increased Ca^{+2} influx in mast cell-neuron co-culture ($p<0,05$) and this was blocked by Suramin. Compound 48/80 increased mast cell degranulation and diameters of meningeal arteries ($p<0,05$).

In migraine pathogenesis, while ATP directly plays a role by inducing pain spikes via its P2X_2 , P2X_3 ve $\text{P2X}_{2/3}$ receptors, mast cells take part indirectly through ATP. P2X_2 , P2X_3 ve $\text{P2X}_{2/3}$ receptor antagonists may be new treatment options for migraine headache.

Keywords: Migraine, ATP, ATP receptors, pain, nociceptor.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca tezimin planlanması, yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesi aşamalarında yardımlarını esirgemeyen; kendisinden bilime ve yaşama dair çok şey öğrendiğim ve bundan sonra da öğreneceğim bir çok şey olduğuna inandığım, Lisansüstü eğitimim boyunca danışmanlığımı yapmış olan, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fatma TÖRE' ye saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Kendisiyle tanıştığım günden itibaren bilimsel araştırmalarımnda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve beni her zaman araştırmaya teşvik eden Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocam Sayın Prof. Dr. Kenan GÜMÜŞTEKİN' e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü katkılarından dolayı ortak tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Seyit ANKARALI' ya ve tez izleme komitesi üyesi Doç. Dr. Şerif DEMİR' e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarımı yapmak üzere Finlandiya' ya gitmek için yurtdışı doktora araştırma desteği sağlayan Türkiye Cumhuriyeti Yükseköğretim Kurulu Başkanlığı' na ve yurtdışı görevlendirmemi yapan Abant İzzet Baysal Üniversitesi Rektörlüğü' ne teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Doğu Finlandiya Üniversitesi A.I. Virtanen Enstitüsü' ne ve çalışmalarımı yapmak için gerekli laboratuvar, alet ve ekipmanlarını kullanmama izin veren ayrıca deneylerde kullandığım kimyasal maddeleri araştırma bütçesinden karşılayan Virtanen Enstitüsü Nörobiyoloji Bölümü' nde grup lideri olan Sayın Prof. Dr. Rashid GINIATULLIN' e çok teşekkür ederim.

Tezimin yazılma aşamasında sayfa düzeni vb konularda yardım aldığım, ayrıca anabilim dalımızda ihtiyaç duyduğumuz hemen her konuda bizlere yardımcı olan, yardımsever kişiliğine imrendiğim çok değerli çalışma arkadaşım Fizyoloji Anabilim Dalı Öğr. Gör. Sayın B. Selim BENEK' e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında manevi desteğini her zaman sürdüren, bana olan inancını asla yitirmeyen, çalışmalarımı sevgisiyle ilham katan ve yaşama isteğimi artıran, akademik başarımda büyük paya sahip olan, tahammül anlayışına hayran kaldığım, kendisine bir ömür mutluluk borçlu olduğum çok değerli biricik nişanlım Sayın Dr. Yasemin BARANOĞLU' na çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER	vii
ŞEKİLLER	viii
FOTOĞRAFLAR	ix
GRAFİKLER	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Migren	8
2.1.1. Epidemiyoloji.....	8
2.1.2. Teşhis	9
2.1.3. Migreni tetikleyen etkenler	9
2.1.4. Patofizyoloji.....	10
2.1.5. Migrenin geleneksel vasküler teorisi	12
2.1.6. Trigeminovasküler sistem, nörojenik inflamasyon ve nörojenik teori	13
2.1.7. Kortikal yayılan depresyon	15
2.1.8. Baş ağrısı tetikleyicisi olarak KYD	18
2.1.9. Periferdeki migrenin kaynağı.....	19
2.1.10. Serotonin rolü	21
2.1.11. Merkezi sinir sistemindeki migrenin kaynağı.....	21
2.2. Ekstrasellüler (Nörotransmitter Olarak) ATP	24
2.2.1. Purinerjik hipotez.....	25
2.2.2. Purinerjik ko-transmisyon	25
2.2.3. Pürin reseptörleri.....	26
2.2.4. ATP' nin kaynakları, salınması ve parçalanması	28
2.2.5. Nörotransmisyonun fizyolojisi ve patofizyolojisi.....	30

2.2.6. Nöron koruma özelliği	31
2.2.7. Nöron–glia etkileşimleri	31
2.2.8. Pürin transmitter ve reseptör plastisitesi	32
2.2.9. Vasküler tonus ve anjiyogenezisin ikili pürinerjik nöral ve endotelial kontrolü	33
2.2.10. Ağrı ve pürinerjik mekanosensör transdüksiyon	33
2.3. Sinir Sistemindeki Pürinerjik Haberleşme	35
2.3.1. Pürin ve pürimidin reseptörleri	35
2.3.2. P1 pürinerjik reseptörler	35
2.3.3. P2X reseptörleri	35
2.3.4. P2Y reseptörleri	37
2.3.5. Merkezi sinir sisteminde P2X reseptörü aracılığı ile sinaptik akımlar	38
2.3.6. Nöronal-gliyal ağlardaki haberleşme	39
2.3.7. Plastisite, gelişim ve yenilenme	39
2.3.8. Periferel nörotransmisyon ve nöromodülasyonda nükleotit reseptörler ...	41
2.3.9. Merkezi sinir sistemi patolojileri	42
2.3.10. Periferel patolojiler	45
2.4. ATP P2X3 reseptörleri ve nöronal duyarlılaşma	46
2.4.1. ATP (duyarlılaşmanın kimyasal bir tetikleyicisi)	47
2.4.2. Nörojenik inflamasyon ve nöronal duyarlılaşmada P2X3 reseptörlerinin rolü	48
2.4.3. Hücre içi sinyalleşme P2X3 reseptör up-regülasyonu yoluyla duyarlılaşmayı tetiklemektedir	49
2.5. Dura Mater ve Migren	50
2.5.1. Dura mater' in nöroanatomi	50
2.6. Mast Hücre Biyolojisinde P2 Reseptör-Aracılı Haberleşme	53
2.6.1. Mast hücreleri üzerindeki P2 reseptörlerinin ekspresyonu	54
2.6.2. Mast hücrelerinin P2 reseptör aracılı cevapları	56
2.6.3. Degranülasyon	58
2.6.4. Hücre içi haberleşme	60
2.6.5. Sitokin/kemokin ekspresyonu ve sekresyonu	61
2.6.6. Hücreler arası iletişimde ATP: mast hücrelerinin rolü	62
2.6.7. Mast hücre degranülatörü compound 48/80	67

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	69
3.1. Elektrofizyolojik Kayıtlar.....	69
3.1.1. Dura mater için yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) hazırlanması.....	70
3.1.2. Sıçanlardan hemi kranyum (hemi skull) preparatlarının hazırlanması ve elektrofizyolojik kayıtların alınması.....	70
3.1.3 ATP ve diğer farmakolojik ajanların uygulanması.....	75
3.2. Rat Trigeminal Gangliyon Nöron Kültürü	76
3.2.1. Gerekli ekipman.....	76
3.2.2. Reaktiflerin hazırlanması	76
3.2.3. Minik petrielerin (cover slip) polilizin ile kaplanması	76
3.2.4 Trigeminal gangliyon izolasyonu ve nöron kültürünün hazırlanması	77
3.3. Peritoneal Primer Mast Hücre Kültürünün Hazırlanması	78
3.4. Mast Hücre-Nöron Ko-Kültürünün Hazırlanması.....	78
3.5. Ca^{+2} -Görüntüleme	79
3.5.1. Temel solüsyonun hazırlanışı	79
3.5.2. ATP ve diğer maddelerin hazırlanması	79
3.5.3. ATP ve diğer maddelerin uygulanması ve Ca^{+2} -görüntüleme.....	80
3.6. Dural Damar Cevaplarının Belirlenmesi	81
3.7. Dural Mast Hücrelerinin Sayılması	83
4. BULGULAR	84
4.1. Elektrofizyolojik Kayıtlar.....	84
4.2. Dura Mater Mast Hücreleri ve Meningial Arterler	91
4.3. Ca^{+2} -Görüntüleme	95
5. TARTIŞMA	99
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	105
7. KAYNAKLAR	106
8. EKLER.....	116
ÖZGEÇMİŞ.....	117

ÇİZELGELER

Tablo		Sayfa
2.1.	Migreni tetikleyen etkenler ve görülme sıklığı	10
2.2.	Periferik ve merkezi sinir sistemindeki nöronlarda ATP' nin bir ko-transmitter olarak dağılımı	26
2.3.	Pürin ve pürimidin reseptörlerinin özellikleri	27
2.4.	P2 reseptörlerinin agonist profili	36
2.5.	Sinir sisteminde ATP' nin bazı önemli görevleri	44
2.6.	Mast hücrelerinin sentezlediği P2 reseptör alttipleri	56
2.7.	Mast hücrelerindeki P2 reseptör aktivasyonunun etkileri	58

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1.1. Dural duysal sinir terminallerinde nosisepsiyonun tetiklenmesinde mast hücrelerinin rolü	7
2.1. Trigeminovasküler aktivasyon ve ağrı prosesi ile ilgili nöronal yollar	11
2.2. Migren patofizyolojisi, trigeminovasküler sistem	13
2.3. Meninkslerdeki nörojenik inflamasyonun oluşumunda kompleks kimyasal etkileşimler	14
2.4. Kortikal yayılan depresyon EEG' si	15
2.5. Migren baş ağrısının önerilen mekanizması	19
2.6. ATP' nin salınım, parçalanma ve resepsiyon mekanizmaları	30
2.7. Rat dura mater ensefali' nin innervasyonu ve kan damarları	51
2.8. Trigeminal sinir bölümleri ve dermatomlar	52
2.9. Ekstrasellüler nükleotitlerin kaynakları ve mast hücrelerinin P2 reseptör aracılı cevapları	60
2.10. ATP mast hücreleri için bir otokrin/parakrin	63
2.11. MSS' de hücreler arası iletişimde mast hücreleri ve ATP' nin rolü	65
3.1. Rat dural trigeminal sinirin proksimal ucu ve dural reseptif alan	73
3.2. Düşük resolüsyon intrasellüler kayıt tekniği ile trigeminal sinir membran potansiyelindeki değişikliklerinin kaydedilmesi şematize edilmiştir	74
3.3. Dura mater'e uygulama probu aracılığıyla farmakolojik ajanların uygulanması ve kaydedici elektrot ile spike kayıtlarının alınması şematize edilmiştir	75
3.4. Dura mater sayım alanları	83

FOTOĞRAFLAR

Resim	Sayfa
3.1. Elektrofizyolojik kayıta kullanılan cam elektrotlar	69
3.2. Kranyumun sagittal düzlem boyunca ikiye bölünmesi	71
3.3. Dura mater yapışık a) sol b) sağ hemi skull (kranyum)	71
3.4. Hemi skull' un plastik cam küvete fiksasyonu	72
3.5. Trigeminal sinirin proksimal ucunun cam elektrot içine çekilmesi	73
3.6. Trigeminal sinirin proksimal ucu elektrot içinde ve düzenek hazır	74
3.7. Kranyum tabanında trigeminal gangliyonun çıkarılması	78
3.8. Hemi skull'ların içinde vazelin bulunan petri kaplarına fikse edilmesi	81
3.9. Beynin uzaklaştırılması ile kranyumda oluşan boşluk	82
4.1. <i>Suction electrode</i> düzeneğinde spontan <i>spike</i> ' lar	84
4.2. Büyük ve hızlı <i>spike</i> ' ların TTX (1 μ M) tarafından bloke edilmesi	85
4.3. Tek bir nörondan kaynaklanan ve açık afterhiperpolarizasyona sahip aksiyon potansiyeli	85
4.4. Kontrol ve compound 48/80 uygulaması sonrası dural mast hücrelerinin görünümü	92
4.5. Granüle ve degranüle mast hücrelerinin görünümü	92
4.6. Dura mater' de middle meningeal arter ve etrafında mast hücrelerinin görünümü	93
4.7. Dura materde compound 48/80' in kontrol grubuna göre arterleri dilate ettiği görülmektedir	94

GRAFİKLER

Grafik	Sayfa
4.1. ATP' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' larını tetikleyici etkisi ve bunun suramin tarafından bloke edilmesi	86
4.2. ATP' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' larını tetikleyici etkisinin reseptör desensitizasyonu değil suramin' in etkisi sonucu bloke edilmesi	86
4.3. ADP' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' ları üzerine etkisi	87
4.4. AMP' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' ları üzerine etkisi	87
4.5. Adenozin' in dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' ları üzerine etkisi	88
4.6. BzATP' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' ları üzerine etkisi	89
4.7. α,β -MeATP ' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' larını tetikleyici etkisi	89
4.8. α,β -MeATP ' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' larını tetikleyici etkisi ve bunun suramin tarafından bloke edilmesi	90
4.9. α,β -MeATP ' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' larını tetikleyici etkisi ve bunun A317491 tarafından bloke edilmesi	90
4.10. 2-MeSADP' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' ları üzerine etkisi	91
4.11. Compound 48/80' in dura mater mast hücreleri üzerine degranüle edici etkisi	91
4.12. Compound 48/80' in meningeal arterler üzerine vazodilatör etkisi	93
4.13. ATP' nin dural mast hücre sayısı ve degranülasyonu üzerine etkisi	94
4.14. ATP' nin meningeal arterler üzerine etkisi	95
4.15. ATP eklenmesi ile trigeminal gangliyon nöronlarında Ca^{+2} geçişlerinin artması	96
4.16. ATP' nin trigeminal gangliyon nöronlarında Ca^{+2} geçişlerini anlamlı arttırması	96

4.17.	ATP' nin peritoneal mast hücreleri üzerine etkisi	97
4.18.	Compound 48/80 'in nöron-mast hücre ko-kültüründe Ca^{+2} geçişlerini artırması	97
4.19.	Nöron-mast hücre ko-kültüründe Compound 48/80 'in neden olduğu Ca^{+2} geçişlerindeki artışın suramin tarafından önlenmesi	98

SİMGE VE KISALTMALAR

2MeSADP	: 2-Methylthio-ADP
A23187	: Kalsiyum İyonofor
A2A	: Adenozin 2A reseptörü
A317491	: P2X3 reseptör antagonisti
AA	: Araşidonik Asit
ACh	: Asetilkolin
ADP	: Adenozin Difosfat
AMP	: Adenozin Monofosfat
ATP	: Adenozin-5'-Trifosfat
Aδ	: A-Delta
BMMCs	: Kemik İliği Mononükleer Hücreleri
BOLD	: Kanın Oksijenlenme Seviyesine Bağımlı Görüntüleme
BzATP	: Benzoylbenzoyl-ATP
C5a	: Kompleman Faktör 5a
Ca⁺²	: Kalsiyum
cAMP	: Döngüsel Adenozin-Mono-Fosfat
CASK	: Kalsiyum/Kalmodulin Bağımlı Serin Protein Kinaz
CBMCs	: İnsan Spinal Kord Kan Mast Hücreleri
CD34⁺	: Hücre Yüzey Glikoprotein
CGRP	: Kalsitonin Gen İlişkili Peptit
c-KİT	: Mast-Kök Hücre Büyüme Faktörü Reseptörü
Cl⁻	: Klor
CO₂	: Karbondiosit
CREB	: cAMP Cevap Elementi-Bağlanma Proteini
CSF	: Koloni Stimüle Edici Faktör
Da	: Dalton
DAG	: Diaçil Gliserol
DRG	: Dorsal Kök Gangliyonu
EC50	: Maksimum Etkinin %50'sini Oluşturan İlaç Dozu

EEG	: Elektro Ensefalo Grafi
E-NDPK	: Ektonükleotit Difosfokinaz
E-NTPDaz	: Ekto-Nükleozit Trifosfat Difosfohidrolaz
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERK	: Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
FACS	: Floresanla Aktive Hücre Ayırıcı
FcεRI	: Yüksek Affiniteli IgE Reseptör
fMRI	: Fonksiyonel Manyetik Rezonans Görüntüleme
GFAP	: Gliyal Fibrillar Asidik Protein
Gi	: İnhibitör G-protein
GM-CSF	: Granülosit/Makrofaj-Koloni Stimüle Edici Faktör
GPR17	: G-Protein Kenetli Reseptör-17
Gq/11	: Gq-protein
Gs	: Stimülatör G-protein
GTP	: Guanozin-Tri-Fosfat
Gα	: G-protein (alfa alt ünitesi)
HLMCs	: İnsan Akciğer Mast Hücreleri
HMC-1	: İnsan Mast Hücre Hattı -1
IFNγ	: İnterferon gama
IgE	: İmümglobülin-E
IL	: İnterlökin
IL-1β	: İnter Lökin-1 Beta
IP3	: İnositol triFosfat
JNK	: c-Jun N-Terminal Kinaz
K⁺	: Potasyum
KCl	: Potasyum Klorür
KN-62	: P2X7 Reseptör Antagonisti
KYD	: Kortikal Yayılan Depresyon
LIF	: Lökemi İnhibitör Faktör
LPS	: Lipopolisakkarit
LTD	: Uzun Süreli Depresyon

LTP	: Uzun Süreli Potensiyalizasyon
MAPK	: Mitojenle Aktiflenmiş Protein Kinaz
MC	: Mast Hücresi
MCP-1	: Monosit Kemoatraktan Protein-1
MCP-1	: Monosit Kemotaktik Protein-1
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
MIP	: Makrofaj İnflamatuvar Protein
MMA	: Middle Meningial Arter
MQ	: Millique
mRNA	: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NA	: Noradrenalin
Na⁺¹	: Sodyum
nACh	: Nikotinik Asetilkolin
NAD⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NANC	: Non-Adrenerjik ve Non-Kolinerjik
NBA	: Nörobazal-A
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
Nİ	: Nörojenik İnflamasyon
NK-1	: Nörokinin-1
NKA	: Nörokinin A
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat
NO	: Nitrik Oksit
NTS	: Nükleus Traktus Solitarius
oATP	: Okside-ATP
P1	: Pürinerjik reseptörler-1
P2	: Pürinerjik reseptörler-2
P2	: Pürinerjik-2
P2T	: Pürinerjik Reseptör (plateletler üzerinde, ADP' ye seçici)
P2U	: Pürinerjik Reseptör (ATP' ye ek olarak pürimidinleri de tanır)
P2X	: Pürinerjik-2X

P2Y	: Pürinerjik-2Y
P2Z	: Pürinerjik Reseptör (makrofajlar üzerinde, ADP' ye seçici)
PAF	: Paraformaldehit
PAG	: Periakueduktal Gri
PAMPs	: Patojen İle İlişkili Moleküler Patern
PBS	: Phosphate-buffered saline
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PGE	: Prostaglandin-E
PIP2	: Fosfatidil-inositol-bi-fosfat
PKC	: Protein Kinaz-C
PLA2	: Fosfolipaz A2
PLC	: Fosfo Lipaz-C
PLCγ	: Fosfolipaz-C gama
PMA	: Forbol-12-Miristat-13-Asetat
PPADS	: Piridoksalfosfat-6-Azofenil-2,4 Disülfonik Asit
RBL-2H3	: Rat Bazofilik Lökemi Hücre Hattı
RO-3	: P2X3 antagonisti
siRNA	: small interfering RNA
Sis-LTE	: Sisteinil-Lökotrien
SP	: Substans-P
Th2	: Yardımcı T-hücre-2
TLR	: Toll-Like Reseptör
TNC	: Trigeminal Nükleus Kaudalis
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNP-ATP	: Trinitrofenil Adenozin-5'-Trifosfat
TRPV1	: Transient Receptor Potential Vanilloid-1
TS	: Temel Solüsyon
TTX	: Tetratoksine
UDP	: Üridin Di-Fosfat
UTP	: Üridin-5'-Tri-Fosfat
VIP	: Vazoaktif İntestinal Peptit

VNUT : Veziküler Nükleotit Transporter
yBOS : Yapay Beyin Omurilik Sıvısı
 α - β MeATP : Alfa-Beta Metilen ATP
 β -FGF : Beta-Temel Fibroblast Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Migren, genellikle tek taraflı zonklayıcı, orta veya şiddetli, günlük bedensel hareketlerle artış gösteren, 4-72 saat süren baş ağrısı ile karakterize ve mide bulantısı, kusma, fotofobi ve fonofobinin eşlik ettiği yenileyici bir baş ağrısı hastalığıdır (1). Auralı veya aurasız olarak ortaya çıkar (2). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar migrenin dünya genelindeki popülasyonun yaklaşık % 15' ini etkilediğini ortaya koymuştur (3-5). Prevalans çalışmaları migren tipi baş ağrısının, erişkin kadınlarda %12-24; erkeklerde ise %5-12 olup kadınlarda erkeklerden 3 kat daha fazla olduğunu göstermiştir (6-10). Önemli derecede iş gücü kaybına neden olan migren baş ağrısının patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Günümüzde tam iyileşme sağlayan bir tedavi henüz geliştirilememiş olup tedavide kullanılan ilaçlar sadece profilaktik ve semptomların giderilmesine yöneliktir. Migren patofizyolojisinin aydınlatılması, etkin bir tedavi protokolünün geliştirilmesi açısından büyük bir önem taşımaktadır.

Migren patofizyolojisi ile ilgili bu güne kadar farklı teoriler öne sürülmüştür. Bunlar arasında vasküler teori (11-13) nörovasküler (nörojenik inflamasyon) teori (14-18), depolarizasyon (kortikal yayılan depresyon) teorisi (19-23), serotonin teorisi ve son zamanlarda üzerinde çalışılan sitokin teorisi (24,25).

Migren patofizyoloji ile ilgili ilk olarak vasküler teori ortaya atılmış (11) ve daha sonra gelen araştırmacılar tarafından yoğun olarak çalışılmıştır. Vasküler teoriye göre migren atakları sırasında önce serebral vazokonstriksiyon olmakta bunu eksternal ve internal karotis arterlerde dilatasyon ve aşırı pulsasyon izlemektedir (26-28). Bu vasodilatasyon ve vasküler pulsasyon gerim reseptörlerini aktive etmekte ve perivasküler sinirlerin uyarılmasıyla da ağrı ortaya çıkmaktadır (29,30). Daha sonra nörojenik inflamasyon (Nİ) ilk defa Dalessio (18,31) tarafından ortaya atılmış ve Moskowitz (32) tarafından genişletilmiştir. Buna göre migren steril bir inflamasyon sonucu meydana gelen vazodilatasyon ile ortaya çıkmaktadır (26). Nöronal aktivasyona yol açan patolojik değişikliklere vasküler değişiklikler eşlik etmektedir (33,34). Nöronal aktivasyon ağrıya duyarlı olan yapılarda vazodilatasyona bu ise trigeminal duysal sinirlerin aşırı aktivasyonu yoluyla substans-P (SP) ve kalsitonin

gen ilişkili peptit (CGRP) gibi nöropeptitlerin salınımına ve sonuçta ağrıya neden olmaktadır (15,35,36). Nörojenik inflamasyonun iki farklı bileşeni vardır (16) birisi plazma protein ekstrasvazasyonu diğeri ise nörojenik vazodilatasyondur. Trigeminal duysal nöronlardan salınan SP ve diğeri nöropeptitler dura materde sekonder bir inflamasyona yol açmaktadır.

Hemen her organda bulunan ve özellikle dura materde bol miktarda yerleşik olan mast hücreleri çok işlevli efektör hücrelerdir (37,38). Dokularda kan damarları ve sinirlere çok yakın bir şekilde yerleşim gösterirler (39). Mast hücreleri çeşitli uyaranlara cevap olarak ATP, adenosin, SP, CGRP, vazoaaktif intestinal peptit (VIP), serotonin (5-HT), nitrik oksit (NO), histamin, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), interleükin(IL)-6 gibi çok sayıda vazoaaktif, nosiseptif ve proinflamatuvar molekül sentezlerler (37, 40-43). Mast hücre sinir iletimini etkileyebilmekte buna karşın sinir hücreleri de mast hücre davranışını değiştirebilmektedir (41,44,45). Bergerot ve arkadaşları (46) tarafından yapılan bir çalışmada uzun süreli sempatektomi uygulamasının sıçanlarda dural mast hücre aktivasyonunda artışa neden olduğu bildirilmiştir. Dura materde kan damarları ve sinirlere yakın yerleşim göstermeleri ve hücre membranlarında nöropeptit reseptörleri ihtiva etmeleri migren patofizyolojisinin nörojenik inflamasyon teorisinde mast hücre, duysal sinir ve dural kan damarları üçlü etkileşiminin göz ardı edilemeyeceğini düşündürmektedir.

Migren patofizyolojisine dair ileri sürülen kortikal yayılan depresyon, bir odaktan başlayan nöronal ve glial depolarizasyon dalgasının yavaş bir şekilde tüm serebral korteks boyunca bir kaç dakika süreyle ilerlemesi ve devamında ise nöronal aktivitenin uzun süreli baskılanmasıdır (19,20,26,47). Kortikal yayılan depresyonu tetikleyen faktörlerin neler olduğu henüz tam olarak ortaya konamamıştır ancak genetik yatkınlık, iyon kanalopatileri ve elektrolit dengesindeki değişiklikler, stres, diyetle ilişkili nedenler ve trigeminovasküler sistemden vazoaaktif peptitlerin salınması gibi faktörlerin kortikal yayılan depresyon oluşumunda rol oynadığı kabul edilmektedir (48,49). Ayrıca bazı araştırmacılar kortikal yayılan depresyon sırasında depolarizasyon dalgasının ilerleyebilmesi için potasyum, glutamat ve purinerjik reseptörlerin gerekli olduğunu göstermişlerdir (50,51). Kortikal yayılan depresyonun migren aurasının altında yatan nörofizyolojik etken olduğu düşünülmektedir. Ekstrasellüler potasyum (K^+) ve glutamat seviyelerinde aşırı artış ve ayrıca

intasellüler sodyum (Na^+) ve kalsiyum (Ca^{+2}) seviyelerindeki artış ile karakterizedir. Bu iyonik değişimler yavaş ilerleyen depolarizasyon üretirler. Kortikal yayılan depresyon farmakolojik olarak K^+ ve glutamat uygulaması ve Na^+-K^+ pompa inhibitörü uygulaması veya elektriksel yada kimyasal stimülasyonla da oluşturulabilir (20). Sanchez-del-Rio ve arkadaşları (52) auralı migren alt tipi olan ailesel hemiplejik migrende bir çok farklı mutasyonların, nörona sürekli Na^+ girişine veya K^+ ve glutamatın sinaptik aralıktan temizlenmesinde azalmaya veya aşırı sinaptik glutamat salınmasına neden olarak beynin uzamış kortikal depresyona daha yatkın hale geldiğini belirtmişlerdir. Bu mutasyonlardan biri beyinde özellikle serebral korteks, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nukleuslarında, soma ve dendritlerde eksprese edilen ve eksitator presinaptik nörondan nörotransmitter salınımı ile ilgili olan P/Q kalsiyum kanallarında meydana gelmekte ve kanalın uzun süreli aktivasyonuna neden olmakta, böylece sinaptik aralıkta glutamat seviyesi yükselerek nöronal aktivasyona neden olmaktadır (53). Kortikal yayılan depresyon sırasında kortekste muhtemelen hidrojen iyonları, potasyum, nitrik oksit ve glutamat düzeylerindeki geçici artışlar kan akımının kısa süreli artışına ve ardından uzun süreli azalmasına neden olmaktadır.

Migren patofizyolojisinde nörojenik inflamasyon ve kortikal yayılan depresyon teorileri ayrı ayrı gelişmiş olmasına rağmen aralarında güçlü bir bağ vardır. Kortikal yayılan depresyonda depolarizasyon dalgasının beyinde ilerlerken intrakraniyal ve dural kan damarlarını innerve eden nosiseptif trigeminal liflere yayılmasının baş ağrısına neden olduğu ileri sürülmektedir (48,54). Trigeminal duysal nöronların uyarılması SP, CGRP, VIP, nörokinin-A (NK-A), 5-HT ve NO gibi vazoaaktif nöromediatörlerin salınımına neden olmaktadır (49,53,55). Sonuçta nörojenik vazodilatasyon, plazma protein ekstravazasyonuna neden olarak nörojenik inflamasyonu tetikler ve duysal sinir liflerini ağrıya daha duyarlı hale getirir.

Serotonin gastrointestinal kanaldaki enterokromaffin hücreler tarafından sentezlenir ve kan plateletleri tarafından alınarak depo edilir, bu periferik serotonin kaynağıdır ayrıca santral sinir sisteminde bir nörotransmitter olarak fonksiyon gören serotonin beyin sapında yerleşik olan rafe nukleusundaki serotonerjik nöronlar tarafından sentezlenir ve tüm santral sinir sistemine iletilir. Kandaki plateletlerde bulunan serotonin periferik damarlarda vazokonstriktif etkiye sahiptir (56).

Migren atakları sırasında plazma serotonin seviyelerinde azalma olması (57,58) ve buna karşın serotonin reseptör agonistleri, seçici serotonin geri-alım inhibitörleri ve serotonin sentezi için öncül moleküllerin migren ataklarını sonlandırması (59,60) bu alanda çalışan araştırmacıları migren patofizyolojisinde serotoninin önemli bir rol oynayabileceği fikrine götürmüştür.

Serotonin seviyesindeki azalmanın kraniyal damarlarda vasodilatasyona neden olduğu ve bu vazodilatasyonun damarları innerve eden duysal lifleri zararlı stimuluslara karşı daha duyarlı hale getirerek ağrıya neden olduğu düşünülmektedir (61,62). Ayrıca son zamanlarda bulunan 5-HT₇ reseptörü üzerinden serotoninin kraniyal vazodilatasyonu ve migren ağrısını tetiklediği savunulmaktadır (63).

Sitokinler ve reseptörlerinin tüm santral sinir sistemi hücrelerinde ekspresse ediliyor olması ve son zamanlarda TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin merkezi ve periferik hiperaljeziye aracılık ettiğinin gösterilmesi üzerine sitokinlerin nörojenik inflamasyonda rolü olabileceği düşünülmüştür (64,65). Ancak yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların çelişkili olmasından dolayı (66) sitokinlerin migren patofizyolojisindeki rolü tartışmalıdır.

ATP hücre içi bir enerji kaynağı ve aynı zamanda ekstrasellüler bir sinyal molekülüdür (67). ATP' nin merkezi ve periferik sinir sistemindeki çoğu sinirlerde ya tek başına bir transmitter yada ko-transmitter olarak görev aldığı bilinmektedir (68). Örneğin periferik sistemde duysal-motor sinirlerde ATP + CGRP + SP birlikte salınımı; merkezi sistemde hipokampus ve dorsal kökte ATP + glutamate birlikte salınımı gibi (69). ATP' nin hızlı eksitator bir nörotransmitter işlevinin yanısıra güçlü uzun süreli trofik etkileri (hücre çoğalması, büyümesi, gelişimi ve hastalıkta ve sitotoksitede) olduğu da iyi bilinmektedir (70,71).

ATP ekzositoz yoluyla yada membran kanalları yoluyla (konnesinler, volümle düzenlenen klor kanalları veya P2X₇) salınan yaygın bir gliotransmitter işlevine sahiptir ve astrositlerden ATP' nin salınımını da düzenler (72). Sinaptik aralığa salındıktan sonra ATP ektonukleotidazlar tarafından hızlı bir enzimatik yıkıma maruz kalır, bu durum fonksiyonel olarak önemlidir çünkü ATP metabolitleri çeşitli purinerjik reseptörler için fizyolojik bir ligand olarak işlev görürler (73).

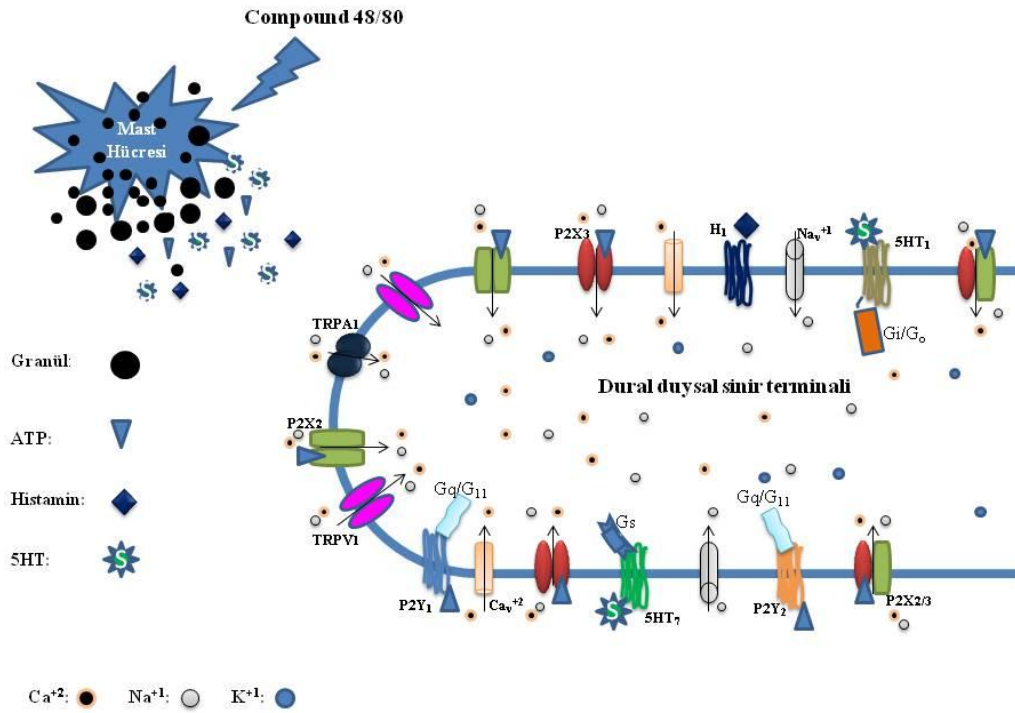
Daha önce yapılan insan ve hayvan çalışmaları, ATP' nin purinoseptörleri aracılığıyla ağrıya yol açtığını göstermiştir (74-76). ATP' nin santral sinir sistemi boyunca yaygın dağılım gösteren nöronlarda ve glialarda bulunan çeşitli purinerjik reseptör alt tipleri gösterilmiştir (73). ATP' nin aktive ettiği reseptörler yapı ve sinyal transdüksiyon mekanizmalarındaki farklılığa bağlı olarak iyonotropik (P2X) ve G-protein kenetli metabotropik (P2Y) reseptörler olmak üzere iki gruptur (77-79). P2X reseptörleri yedi alt grubu sahiptir, bunlar; P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇' dir (80). Ligand bağımlı katyon kanalları olan P2X reseptörlerine ATP bağlandığında kanalın poru Na⁺, K⁺ ve Ca⁺² 'a geçirgen olur (79,81). G-protein kenetli transmembran P2Y reseptörleri ise ATP bağlandığında fofsolipaz-C(PLC)/inositoltrifosfat(IP₃) endoplazmik retikulum(ER)-Ca⁺² salınım yolunu aktifleyen Gq/G₁₁ proteini kullanan P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ ve P2Y₁₁ reseptörleri ve ayrıca adenil siklazı inhibe ederek iyon kanallarını modüle eden Gi/o ile kenetli olan P2Y₁₂, P2Y₁₃ ve P2Y₁₄ reseptörleri olmak üzere iki genel alt gruba ayrılır (79). İyonotropik P2X₃ reseptörü özellikle nosisepsiyonla ilişkilidir (75). P2X reseptörleri ile karşılaştırıldığında P2Y reseptörlerinin dokulardaki dağılımı tamamen farklıdır ve ağrıda P2Y reseptörlerinin rolü daha az çalışılmıştır, ancak P2Y₁ ve P2Y₂ reseptörlerinin nosisepsiyonla ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır (82). Trigeminal sistemin baş ve yüzün ağrı sinyallerini trigeminal nucleus caudalis taşıyarak migren patofizyolojisinde kilit bir rol oynadığı düşünülmektedir (83). Özellikle trigeminal gangliyon ve dorsal kök gangliyonunda P2Y₁ reseptörü küçük çaplı nöronlarda bulunmaktadır (68,84,85). Ayrıca P2Y₂ reseptörünün de küçük çaplı dorsal kök gangliyon nöronlarında ekspresse olduğu (86) ve *transient receptor potential vanilloid-1* (TRPV1) reseptörleri aracılığıyla nosiseptif iletimde rol oynayabileceği bildirilmiştir (86-88). ATP, P2Y reseptörlerinin kraniyo-fasyal ağrı iletimindeki rollerinin ortaya çıkarılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. P2X₃ reseptörleri periferik nosiseptif duysal nöronlar için sınırlı olduğundan ağrı tedavileri için umut vadeden hedeflerdir (89). ATP' nin migren baş ağrısında, bazal serebral arter ve dural kan damarlarına yakın yerleşmiş primer afferentlerin nosiseptif terminallerini aktive ederek ağrıya katkıda bulunduğu düşünülmektedir, ayrıca iyonotropik P2X reseptörlerinin trigeminal duysal nöronlar üzerine eksitator etkileri olduğu önerilmektedir (90).

Mast hücreleri çeşitli purinoseptörleri (P2X₁, P2X₄, P2X₇, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃) sentezlerler ve ATP bu reseptörler aracılığı ile mast hücre degranülasyonu ve sitokin sekresyonunda önemli bir role sahip olup (40,91) mast hücre mediyatörleri de nosiseptörleri duyarlaştırır (92-94).

Migren patofizyolojisi ile ilgili yukarıda bahsedilen teorilerin hepsi birlikte ele alındığında serebral, dural kan damarlarında vazodilatasyon, bu vazodilatasyona bağlı olarak gelişen plazma protein ekstrasvazasyonu ve bunun neden olduğu steril nörojenik inflamasyon ayrıca damarlara yakın yerleşim gösteren baş ve yüzün ağrı sinyallerini beyindeki ağrı merkezine taşıyan trigeminal duysal sinirlerin sensitizasyonu veya aktivasyonunun migren baş ağrısına neden olduğu düşünülebilir. Ancak her migren atağında bu bileşenleri tetikleyen faktörler farklı olabilir. Bu nedenle migren baş ağrısı yolağını tetikleyen moleküllerin neler olduğu, bunların kaynağı, etki mekanizmaları, etkilerini taklit eden agonistlerinin yada etkilerini bloke eden antagonistlerinin olup olmadığının araştırılması, migren patofizyolojisinin aydınlatılmasına dolayısıyla da yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanıyacaktır. Son zamanlarda ATP ve reseptörlerinin sinir sistemindeki fizyolojik etkilerine dair artan bilgiler migren patofizyolojisinde önemli bir rolü olabileceği fikrini doğurmuştur.

ATP' nin P2X ve P2Y reseptörlerinden bazılarının dorsal kök gangliyonu nöronlarında somatik periferel ağrının iletilmesinde rolü olduğuna dair yeni bilgiler, ATP' nin migren baş ağrısı gibi visseral ağrılarda da rolü olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca üzerinde henüz çok çalışılmamış olan metabotropik P2Y reseptörleri aracılığı ile de kraniyal vazodilatasyona neden olarak trigeminal duysal nöronları daha fazla sensitize etmesi sonucu ağrının oluşumunu kolaylaştırabilir. Mast hücre degranülasyonunu tetikleyerek mast hücrelerinden vazoaktif moleküllerin salınımını artırmak suretiyle nosiseptif duysal lifleri aktive edebilir. Ekstrasellüler ATP' nin özellikle iyonotropik (P2X) reseptörleri üzerinden dural trigeminal nosiseptörleri aktive ederek (hücre içine hızlı katyon girişi) migren atağının baş ağrısı fazında önemli rolü olabileceği ve bunun ilgili reseptörlerin spesifik antagonistleri ile önlenebileceği fikri hipotezimizin temelini oluşturmaktadır.

Bu hipotez kapsamında dural mast hücrelerinin aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleşen degranülasyon sonucu ATP salınmasının, migren baş ağrısında mast hücrelerinin de dolaylı rolü olduğuna kanıt sağlayacaktır (şekil 1.1). Sunulan çalışmada migren patofizyolojisini aydınlatmak ve buna bağlı olarak olası tedavi protokollerini geliştirmek amacıyla ATP ve reseptörlerinin meningeal duysal sinir terminalleri, trigeminal gangliyon nöronları ve mast hücreleri etkileşimi üzerine rolleri araştırılmıştır.



Şekil 1.1. Dural duysal sinir terminallerinde nosisepsiyonun tetiklenmesinde mast hücrelerinin rolü.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Migren

Toplumun yaklaşık % 14' ünü etkileyen en yaygın primer baş ağrısı olan migren, tek taraflı, zonklayıcı tarzda, ağır ataklarla seyreden ve fiziksel aktivite sırasında artış gösteren nörovasküler bir hastalıktır (95). Etkilenen kişilerde sıklıkla mide bulantısı, fotofobi ve fonofobi gibi semptomlar görülür (96).

Teşhis edilebilir herhangi bir sefalik patolojisi olmadığından dolayı migren patofizyolojisini anlama çabaları hala devam eden bir süreçtir (26). Şu anda migren ağrısının oluşumuna dair iki ana teori vardır. Birisi, ağrının kaynağının periferde olduğunu ve sefalik dokuyu innerve eden primer afferent nosiseptif nöronların aktivasyonu sonucu geliştiğini öne sürer. Diğeri ise migren ağrısının çıkış noktasının merkezi sinir sistemi olduğunu ve nosiseptörlerin aktivasyonundan ziyade duysal sinyallerin merkezi sinir sisteminde anormal olarak değerlendirilmesi sonucu oluştuğunu iddia etmektedir.

2.1.1. Epidemiyoloji

Dünya sağlık örgütü tarafından dünya genelinde iş gücü kaybı nedenleri arasında 19. sıraya yerleştirilen, genel ve güçten düşüren bir hastalık olan migren kadınlarda % 17.6 erkeklerde ise % 5.7 oranında ortaya çıkmaktadır (26). Ağrı ve semptomlarının ağırlığı nedeniyle ve yüksek sıklığından dolayı migren, bireyler ve toplum üzerinde önemli bir yüküdür. Migrenlilerin migren atağı sırasında iş gücü kaybına uğramalarının dışında yaşam kalitelerinde de azalma vardır. Migrenin tekrarlama sıklığı 15-24 yaşları arasında pik yapar ve yaygınlığı 35-45 yaşları arasındaki bireylerde en yüksektir. Migren sıklığı ve hastalığın yüküne dair çalışmalar kadınlarda erkeklere oranla 3 kat daha fazla olduğunu ve aile geliri ile migren sıklığı arasında ters bir ilişki olduğunu ortaya çıkarmıştır. Migrenlilerin çoğu ayda 1-4 arasında baş ağrısı atağına maruz kalır ve tüm migrenlilerin % 50' sinden daha fazlası baş ağrısı esnasında ağır derecede kötüleşme veya yatak istirahatine ihtiyaç duyduklarını bildirmişlerdir.

2.1.2. Teşhis

Migrenin teşhisi genellikle klinik ölçütlere dayanan, baş ağrısının ikincil nedenleri hariç bazı vakalarda kullanılan nöro-görüntüleme ile yapılmaktadır (26). Migrenin bir kaç alt tipi vardır. En sık maruz kalınan migren tipleri aurasız (çoğunlukla) ve tipik auralı (~% 25) migren baş ağrılarıdır. Migrenden muzdarip olan bir hastada muhtemelen zonklayıcı ağrı, asimetrik ağrı, bulantı veya kusma, ışığa, sese ve kokuya hassaslık, aura, ailesel migren geçmişi (hastaların üçte ikinde vardır) gibi faktörlerden biri veya bir kaçı bulunabilir. Teşhis ölçütünün bir parçası olmamasına rağmen, kutanöz allodini de birçok migrenli hastada yaygındır ve migrenin ağırlığı migren süresi ve sıklığı ile ilişkilidir. Daha kronik, sık, uzun süren, ağır ve daha çok iş gücü kaybına yol açan migren alt tipi aurasız migrendir.

2.1.3. Migreni tetikleyen etkenler

Elektrofizyolojik çalışmalardan elde edilen bilgilerin yanında klinik tecrübeler, migrenli kişilerin beyninin artmış bir duyarlılığa sahip olduğunu önermektedir, bu kişiler ağrının olmadığı süreçte ışığa, sese, harekete, kokulara ve diğer duysal uyaranlara karşı oransız bir duyarlılıkları olduğunu tarif etmektedirler (26). Tetiklenmiş kortikal ve beyin sapı cevapları bu aşırı duyarlılığın bazılarını taklit etmektedir. Migrenli 1750 hastanın geriye dönük bir çalışmasında, bu hastaların yaklaşık % 75' i akut migren atağı tetikleyicilerinden en az bir tanesini tecrübe ettiklerini bildirmişlerdir. Migreni tetikleyici bu etkenler azalan sıklığına göre tablo 2.1' de sıralanmıştır.

Tablo 2.1. Migreni tetikleyen etkenler ve görülme sıklığı. Bozoghlanian ve Vasudevan (26)' dan alınmıştır.

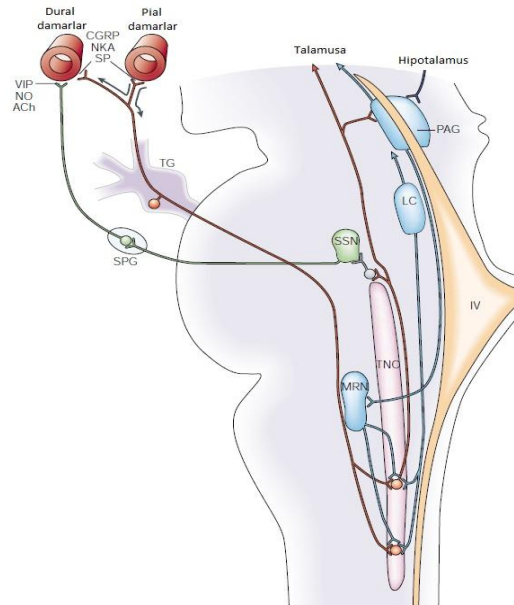
Tetikleyici Etken	Oran (%)
Duygusal Stres	80
Kadınlardaki hormonlar	65
Yemek yememe	57
Hava	53
Uyku bozuklukları	50
Kokular	44
Boyun ağrısı	38
Işıklar	38
Alkol	38
Sigara	36
Geç uyuma	32
Sıcaklık	30
Yiyecekler	27
Egzersiz	22
Cinsel aktivite	5

Auralı migrenliler ile aurasız migrenliler karşılaştırıldığında auralı olanları stres, yemek yememe, hava, uyku bozukluğu, geç uyuma, parfüm/koku, ışıklar, alkol, sıcaklık, yiyecek ve egzersiz gibi tetikleyiciler daha fazla etkilemektedir. Ayrıca bir çalışma (97) stres veya yorgunluk gibi endojen fizyolojik faktörlerin, migrenin en sık tetikleyicileri olduğu yönünde benzer sonuçlar bildirmiştir. Ayrıca hemen etkili olan ilk üç tetikleyici (yorgunluk/uyku zorlukları, stres ve yiyecek/içecek) migrenli ve migrenli olmayanlar arasında aynı olmasına rağmen, migrenlilerde ağrının ortalama şiddeti daha yüksektir. Diğer bir çalışma ise menstruasyonun, baş ağrısının ortaya çıkması ve devam etmesindeki riski artıran bir neden olduğunu göstermiştir (98).

2.1.4. Patofizyoloji

Migren patofizyolojisinin anlaşılmasına dair yeni gelişmeler olmasına rağmen esas migren jeneratörü (migreni oluşturan, ortaya çıkaran etmen) anlaşılamamıştır (26). Migren hakkında birleştirici tek bir açıklamanın ortaya çıkma olasılığı gittikçe azalmaktadır. Beyin dokusunda çoğunlukla ağrının algılanması söz konusu değilken; dura mater, trigeminal, vagus ve glossofarengiyal sinirlerin intrakranyal segmentleri, büyük intrakranyal damarların proksimalleri (baziler, vertabral ve karotid dallar) gibi

belirli yapılar ağrıya son derece duyarlıdır. Trigeminal sistemin aktivasyonunu içeren migren patofizyolojisi hipotezine göre (99) ağrı yolağı; trigeminal gangliyondan uzanan ve meningeal yapıları ve serebral damarları innerve eden psödo-unipolar nöronların depolarizasyonu, beyin sapının medüller trigeminal nukleus kaudalis (TNC) içindeki ve üst servikal spinal kord segmentlerinin dorsal kökündeki ikinci order nöronların aktivasyonuna neden olur. Trigeminal nosiseptif nöronların (birinci order) uyarılması beyin sapının rostro-kaudal eksenini boyunca aktivasyon örneklerinin somatotopik olarak dizilmesine yol açar. TNC ve servikal dorsal boynuzdaki ikinci order nöronlar nukleus rafe magnus, periaqueduktal gri (PAG), rostral trigeminal nukleus ve inen kortikal inhibitör sistemlerden gelen projeksiyonlarla düzenlenmiştir. Bu aktiflenmiş ikinci order nöronlar, daha çok beyin sapı nukleusuna, artı talamusun kontra-lateral dorsomedyal ve ventro-posteromedyal nukleusuna uzanır. Trigeminal sistemin aktivasyonunu içine alan tüm bu olaylar zinciri şekil 2.1' de şematize edilmiştir. Trigeminal ağrı insular korteks, anterior singulat korteks ve somatosensör korteksi içine alan birçok kortikal alanın aktivasyonu ile de bağlantılıdır.



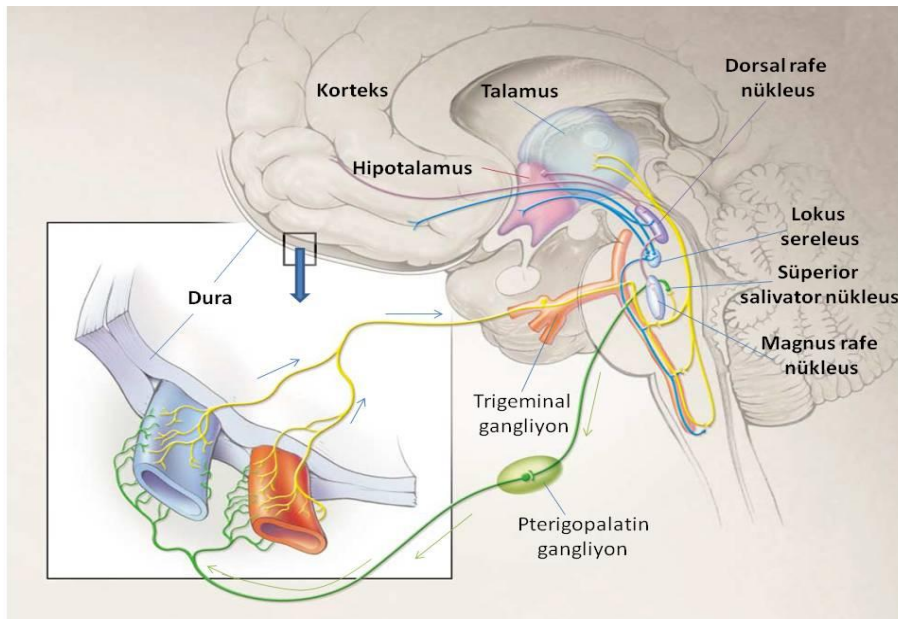
Şekil 2.1. Trigeminal sistemin aktivasyonu ve ağrı prosesi ile ilgili nöronal yollar. Pietrobon ve Striessnig (53)' den alınmıştır. IV, dördüncü ventrikül; ACh, asetilkolin; CGRP, kalsitonin genilişkili peptit; LC, lokus seruleus; PAG, periaqueduktal gri bölge; MRN, magnus rafe nukleus; NKA, nörokinin A; NO, nitrik oksit; SP, substans-P; SPG, superior sfenopalatin ganglion; SSN, superior salivator nukleus; TG, trigeminal ganglion; TNC, trigeminal nukleus pars kaudalis; VIP, vazomotor intestinal peptit.

2.1.5. Migrenin geleneksel vasküler teorisi

Harold Wolff' un orjinal vasküler hipotezi (11) 1980' lere kadar bu alanda baskın olmuştur, bu teoriye göre aura' nın nedeni geçici vazokonstriksiyonla tetiklenmiş hipoksemidir ve baş ağrısının vazokonstriksiyonu takiben geri tepmeyle meydana gelen bir vazodilatasyon ile kendi kendine olduğu zannedilmektedir (26). Sonuçta genişleyen intraserebral ve ekstraserebral damarların duvarlarındaki primer nosiseptif nöronların mekanik depolarizasyonuna yol açmaktadır. Vazojenik teorisinin temelini oluşturan, baş ağrısını geçirdiği bilinen vazokonstriktörlerin (ergotaminler) aksine baş ağrılarını sürekli bir şekilde yoğunlaştıran nitrogliserin gibi vazodilatör ilaçlardır. Ancak ilk defa, aura ile ilişkili kısa bir hiper-perfüzyondan sonra auralı migren ağrısının hipo-perfüzyonla birlikte uyumlu olarak meydana geldiği Olesen ve arkadaşları (100) tarafından gösterilerek Wolff' un fikirleri büyük ölçüde çürütülmüştür. Farmakolojik olarak tetiklenmiş migren çalışmaları buna ek destek sağlamıştır: baş ağrısını tetikleyen ilaçların çoğu bifazik etki göstermekte, hemen tüm deneklerde bir başlangıç dilatasyonu ve hafif baş ağrısı ve dilatasyon durduktan hemen sonra yatkın hastalarda migren benzeri baş ağrısı gelişmektedir. Ayrıca, baş ağrısı her vazodilatör ajan tarafından oluşturulmamaktadır (örnek: vasoaktif intestinal peptit) ve baş ağrısı vazokonstriktör ajanlarla her zaman yatıştırılamamaktadır (kokain, ergotların yüksek veya kronik dozları). İlginç bir şekilde bu gözlemlere rağmen, aurasız migren üzerine, ekstra karanyal orta meningiyal arter ve intrakranyal orta serebral arterin çevresini (ataktan önce, atak sırasında ve sumatriptan tedavisini takiben) ölçmek için yüksek çözünürlüklü direk manyetik rezonans anjiyografi kullanılarak yapılan yeni bir çalışmadan elde edilen sonuçlar tezat sonuçlar vermiştir. Çalışma atak sırasında hem ekstrakanyal hem de intraserebral arterlerin dilatasyonunu göstermiştir (başın bir yanına spesifik, tek taraflı baş ağrılı unilateral dilatasyon ve çift taraflı baş ağrısında ise bilateral dilatasyon). Sumatriptan ile tedavi de ekstraserebral damarlarda vazokonstriksiyon oluşturmaktadır ancak intraserebral damarlarda konstriksiyon oluşturmaz. Bu bulgular bir kez daha migrende vasküler mekanizmaların önemli bir görevinin olduğunu desteklemektedir.

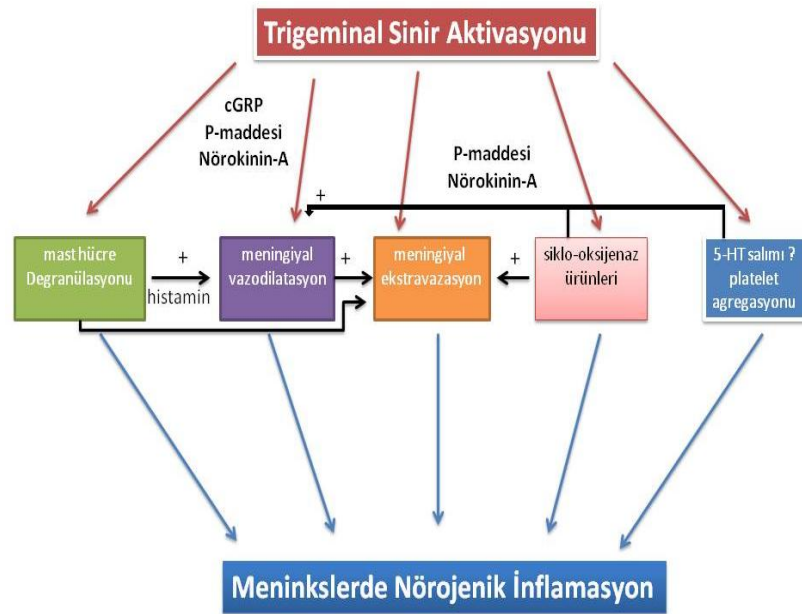
2.1.6. Trigeminovasküler sistem, nörojenik inflamasyon ve nörojenik teori

Trigeminovasküler sistem terimi genellikle vasküler baş ağrıları oluşumunun morfo-fonksiyonel temelini tanımlamak için kullanılır (101). Periferik trigeminovasküler sistem trigeminal gangliyonun duysal liflerinden oluşur, bu lifler meningeal kan damarlarından beyin sapı trigeminal çekirdek kompleksine uzanırlar (şekil 2.2). Trigeminal sistemin CGRP içeren hücre gövdeleri bipolardır ve trigeminal nükleus kaudalis içindeki nöronlarla ve C1-C2 seviyelerine inen onun ilişkili uzantıları ile fonksiyonel bağlantılara sahiptir. Merkezi trigeminovasküler sistem, merkezi sinir sisteminin noziseptif girişi daha fazla işleyen bölgeleridir: spinal trigeminal nükleus ve posterior talamus. Trigeminal lifler beyin damarlarının dilatasyonuna, serebral kan akımında artışa aracılık eder ve trigeminal vasküler refleksle katılır. Bu refleksin aktivasyonu, kortikal yayılan depresyon yada diğer lokalize serebrovasküler vazomasyon nedeniyle ortaya çıkan serebrovasküler konstrüksiyona karşı bir savunma mekanizmasıdır. Serebral sirkülasyon yüksek, sabit akım ve metabolizmaya gereksinim duyar; hipotetik olarak serebral vazokonstrüksiyon trigeminal duysal sinir lifleri tarafından algılanır (şiddetli vazodilatasyon boyunca normal sınırlar içerisindeki lokal beyin kan akımını sürdürmek için CGRP' nin antidromik salınımı sonucu ile).



Şekil 2.2. Migren patofizyolojisi, trigeminovasküler sistem. Goadsby ve ark. (49)' ndan alınmıştır.

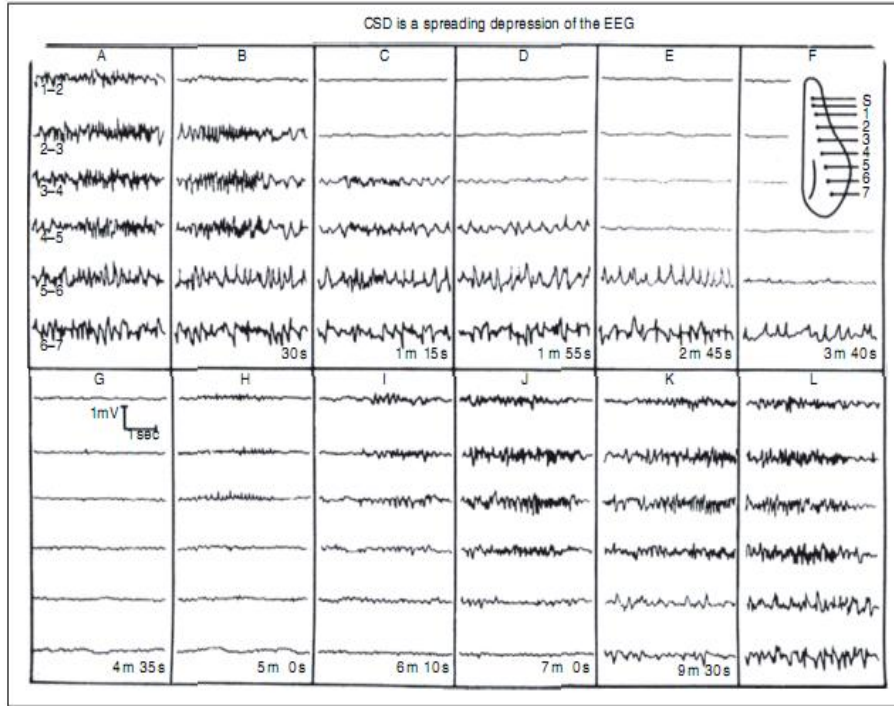
Nörojenik inflamasyon, steril, inflamatuvar bir olaydır, duysal sinir aktivasyonunun bir sonucu olarak meydana gelir ve vazodilatasyon, plazma protein ekstravazasyonu ve yerleşik mast hücrelerinden proinflamatuvar ve inflamatuvar moleküllerin salınımı ile karakterizedir (16,102). Trigeminal sinirden CGRP' nin perivasküler salınımı vazodilatasyonu ve dural mast hücre degranülasyonunu tetiklemektedir, böylece vazodilatasyonun neden olduğu plazma protein ekstravazasyonu ve mast hücre degranülasyonu nörojenik inflamasyona katkıda bulunmaktadır (şekil 2.3). Vazodilatasyonun nedeni vasküler düz kas üzerine CGRP' nin dilatör etkisidir. Ekstravazyona ise sıklıkla CGRP ile birlikte salınan SP neden olur. İnflamatuvar kaskat, CGRP' nin dura materde yerleşik mast hücreleri ve trigeminal gangliyonun satellit gliyal hücreleri üzerine etki etmesiyle tetiklenebilmektedir. Yirminci yüzyıl boyunca devam eden nörojenik teoriye göre vasküler değişiklikler anormal nöronal aktivitenin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (26). Bu teorinin savunucuları bir gerçeği vurgulamışlardır ki o da tek bir nörovasküler bölgeye lokalize olmayan tek bir aura sırasında bir kaç nörolojik semptomun sıklıkla meydana gelmesidir. Maalesef şu anda, eğer çok katı bir şekilde olaya bakılırsa hiç bir teori tek başına migrenin klinik ve tedaviye cevap özelliklerinin tümünü açıklayamaz.



Şekil 2.3. Meninkslerdeki nörojenik inflamasyonun oluşumunda kompleks kimyasal etkileşimler. Williamson ve Hargreaves (103)' den alınmıştır.

2.1.7. Kortikal yayılan depresyon

Bu alanda biriken bilgiler migren aurasının altında yatan nedenin kortikal yayılan depresyon (KYD) olduğunu ve muhtemelen baş ağrısını tetikleyici olarak işlev gördüğünü önermektedir (26). İlk defa Leao tarafından (104) 1944' te tanımlanan kortikal yayılan depresyon, serebral gri maddede kendiliğinden ilerleyen bir depolarizasyon dalgasıdır ve yavaş bir hızla beynin karşı tarafına yayılır (2–5 mm/min). Görme duyusunu çalışan fizyolog Lashley (105) 1941' de kendine özgü görsel auralarını çekti ve 3 mm/dak. hızla primer görsel korteksin karşı tarafına ilerleyen kortikal bir olayı gösteren semptomatolojiyi çıkardı. Leao (104) 1944' te tavşanlarda KYD' yi tanımladı ve bunun migren aurasına benzediğini fark etti, bununla ilgili olarak şekil 2.4' te kortikal yayılan depresyonun elektroensefalografi (EEG)' si gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Kortikal yayılan depresyon EEG' si. Leao (104)' dan alınmıştır.

Bu gözlemlere rağmen vazospazm ve kortikal iskeminin neden olduğu düşünülen (serebral anjiyografiden elde edilen bilgiler bu anlayışı çürütmesine rağmen) migren aurası teorisi 1980' lere kadar baskın teori olarak kalmıştır (26).

Bölgesel serebral kan akımının bir biri ardınca ölçümleri, oksipital kısımdan geriye doğru başlayan ve öne doğru dereceli ve sürekli yayılan azalmış beyin akımı olduğunu göstermiştir. 1990' da Olesen ve ark. (106) 63 auralı migren hastasının sonuçlarını derleyen 10 yıllık migrende bölgesel serebral kan akımı analizini yaptılar. Normal beyin dokusunda deneysel olarak çalışılan KYD başlatmak amacıyla, beyin istemli karışıklığını sağlayacak bir mekanizma genellikle gereklidir (örnek olarak elektriksel yada mekaniksel uyarı gibi). Kendiliğinden ve bir müdahale ile tetiklenmiş sinaptik aktivite KYD tarafından 5-10 dakika baskılanır ve bunu izleyen normal fonksiyonun yeniden başlaması otomatik olarak ortaya çıkar. Diğer taraftan, dışarıdan müdahale olmadan veya kendiliğinden oluşan KYD' ler hipoksida, iskemide veya hipoglisemik beyin dokusunda doğal olarak gelişirler ve tekrar normal fonksiyonlara dönmek için daha fazla zaman alır. KYD nöronal ve gliyal membranların yavaş bir şekilde ilerleyen depolarizasyon dalgasıdır ve genetik olarak tanımlanmış eşik değerin üstünde yüksek konsantrasyonlu ekstrasellüler K^{+1} çözeltisi ile tetiklenebilir, örnek olarak lissensefalik (beynin dış yüzeyinde kıvrımların olmadığı) ve girenssefalik hayvanlarda ve de insanlarda serebral iskemide ve beyin travması veya eksitatör amino asitlerin direk kortikal uygulanması, Na^{+1} / K^{+1} pompası inhibitörleri veya konsantre K^{+1} çözeltileri ile KYD tetiklenebilir. KYD oluşturmak için gerekli olan glutamat reseptörlerinden N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü, depolarizasyon dalgasının genişleyip yayılmasını güçlendirir. İyonların ve küçük moleküllerin oluklu bağlantılarla direk hücreler arasında transfer edilmesi depolarizasyon dalgasının ilerlemesine yardım edebilir. KYD' ye eşlik eden farklı serebral kan akımı değişiklikleri vardır: erken bir şekilde, KYD' den önce yada depolarizasyonun başlaması sürecinde serebral kan akımında türlerle bağlı düşüş ve bu vazokonstriksiyon genellikle bunun bir özetidir. Bunu 1-2 dakika hiperemi takip eder ve bazı türlerde bazal seviyenin % 200' üne ulaşır. Bunu daha sonra kortikal arteriyel vazokonstriksiyonun bir sonucu olarak 1-2 saat oligemi takip eder (bazal seviyenin % 40-90). KYD sonrası oligemik fazın ortasında nörovasküler birleşme ve hiperkapnik hiperemi zayıflar. Kısmi doku hipoksisi ya KYD ya da KYD sonrası oligemiden kaynaklanabilir. Vazomotor etkilere ek olarak KYD nörotransmitter ve nöromodülatör sistemleri, ikincil haberci basamaklarını, acil erken genleri, büyüme faktörlerini ve inflamatuvar mediyatörleri (TNF- α ve IL-1 β) değiştirir.

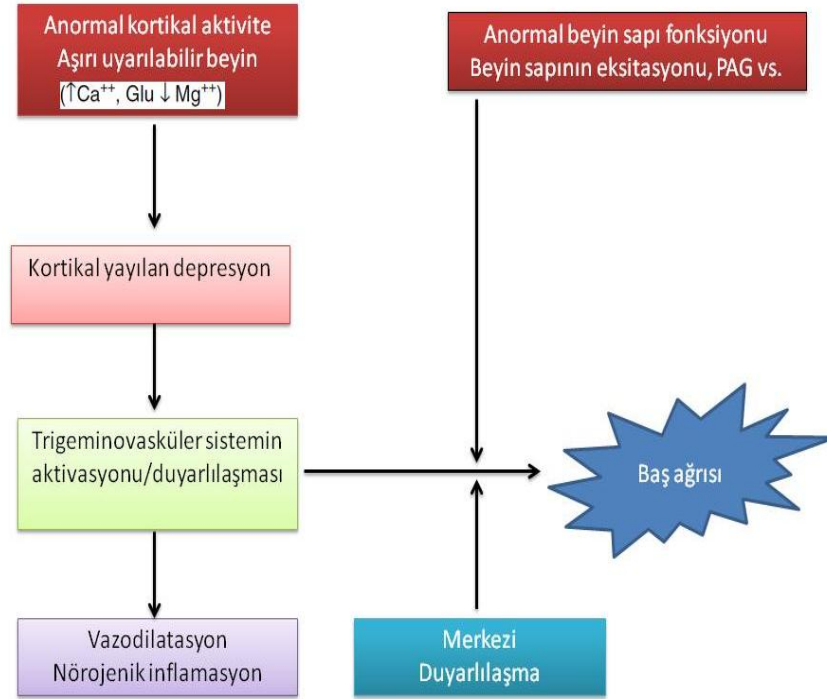
Hayvanlarda KYD üzerine ve in vitro ortamda insan neokortikal ve hipokampal doku çalışmalarından elde edilen bilgiler ile ilgili bol miktarda literatür varken, in situ insan beyinde KYD' yi doğrulayan kanıtlar henüz son zamanlarda elde edilmiştir (26). Bunlar migren ve hasarlanmış insan beyinde epidural ve intrakortikal kayıtlar esnasında fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRI) tekniği kullanılarak elde edilmiştir. fMRI sistemi kanın oksijenlenme seviyesine bağımlı görüntüleme (BOLD) kullanır, oksijenli (non-paramanyetik) ve oksijensiz (paramanyetik) kanın manyetik özelliklerinin farklılaşması esasına dayanır, manyetik duyarlılıktaki farklılıklardan dolayı sinyal şiddetinde değişiklikler oluşturmaktadır. Hadjikhani ve ark. (107) tarafından yapılan fMRI çalışması görsel aura sırasında KYD' nin en azından sekiz özelliğini gösteren ve dakikada 3,5 mm hızla ilerleyen oksipital korteks içinde düzensiz bir şekilde yayılan manyetik rezonans sinyalini içine alan BOLD sinyali değişikliklerini tespit etmiştir. Bu BOLD değişikliği ileri bir düzeyde hastanın aura semptomları ile retinotopik olarak uyumluydu. Azalmış sinyali (muhtemelen vazokonstriksiyondan dolayı) takiben artmış bir fokal BOLD vardı. Diğer kanıtlarla birlikte bu bilgiler KYD' nin migren aurasının elektrofizyolojik substratı olduğunu güçlü bir şekilde önermektedir. Migrenden muzdarip olan kişilerde KYD' nin nasıl tetiklendiği tamamen anlaşılamamışken, KYD oluşumu için gereken eşik değer migrenlilerde muhtemelen daha düşüktür. KYD gelişimini güçlendiren temel faktörlerin eksitator depolarize edici olaylar (NMDA reseptör aktivasyonu veya nöbetler gibi şiddetli nöronal aktivite) olduğu düşünüldüğünde, KYD tüm serebral aşırı uyarılabilirlikler ile ilişkili olabilir. Ailesel hemiplejik migren sendromlarından birinin (otozomal dominant kalıtılan migren tipi) artmış serebral eksitabilite ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır. Ailesel hemiplejik migren ağır ve uzun süren auralarla karakterizedir (unilateral motor eksikleri, koma). Ailesel hemiplejik migren tip-1' de presinaptik terminaller ve somatodendrik membranlar üzerindeki voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarını kodlayan bir gen üzerinde mutasyon vardır ve bu mutasyondan dolayı hücre içine Ca^{+2} girişi ve muhtemelen nörotransmitter (glutamat) salınımı artmakta ve postsinaptik depolarizasyon büyümektedir. Ayrıca, ailesel hemiplejik migren mutasyonları artmış KYD yatkınlığı ile bağlantılıdır. Aynı gen üzerinde ailesel hemiplejik tip 1 mutasyonu eksprese eden mutant fareler ile yapılan çalışmalardan elde edilen daha fazla kanıt genetik ve

hormonal faktörlerin hem KYD' yi ve hem de migrene yatkınlığı modüle ettiğini doğrulamaktadır.

2.1.8. Baş ağrısı tetikleyicisi olarak KYD

Migren aurasına neden olmasının yanı sıra KYD' nin baş ağrısını tetiklediği de önerilmiştir (26). Aurasız migrene, depolarizasyonun bilinçli olarak algılanamadığı beyin alanlarında (serebellum gibi) KYD' nin ortaya çıkmasının neden olabileceği önerilmiştir. Kemirgenlerde, KYD meningeal trigeminovasküler sistemi uyarma yeteneğindedir ve bir biri ardınca gelen ağrı yollarını tetiklemekte, meningeal inflamasyon ve plazma ekstrasvazasyonuna da neden olabilmektedir. Aktivasyon yöntemi aydınlatılamamasına rağmen, KYD glutamat, potasyum, hidrojen iyonları ve ATP gibi mediyatörlerin lokal salınımı ile bağlantılıdır, bu mediyatörler leptomeninklere (araknoid mater ile piamaterin ikisine birden verilen ad) yayılır ve orada pial nosiseptörleri uyarırlar. Bunun daha sonra onların periferik sonlanmalarından cGRP (güçlü vazodilatör), NKA ve SP gibi proinflamatuvar vazoaktif nöropeptitlerin salınımını kolaylaştırdığı sanılmaktadır, ayrıca bu proinflamatuvar vazoaktif nöropeptitler aksanal refleks prosesi yoluyla dura materdeki kollateral aksanal dallardan da salınır. Meningeal mikrodamar sistemi ve lokal immün hücreler (mast hücreleri) üzerine bu nöropeptitlerin etkisine cevap olarak, lokalize steril enflamasyon meydana geldiği öne sürülmüştür. Sonuçta baş ağrısına neden olan bu olaylar şekil 2.5' te şematize edilmiştir. Bu meningeal nosiseptörlerin mekanosensitizasyonunu yükselterek başlangıçtaki KYD ile ilgili olan aktivasyonunu büyüttüğünü ve devam ettirdiğini düşündürmüştür. Bir çok çalışma, meningeal nosiseptörlerin sürekli aktivasyonu ile KYD' nin ilişkili olduğunu dolaylı kanıtlarla göstermiştir, bununla birlikte anestezize sıçanlarda meningeal nosiseptörlerin in vivo kayıtları kullanılarak yapılan son çalışmalardan elde edilen daha fazla direkt kanıt ortaya çıkmıştır. Ayrıca, Zhang ve ark. (108) anestezize sıçanlarda, C1-C2 spinal seviyelerinde tek unite kaydı ile nöronal aktivite ölçülürken KYD' yi tetikleyerek (potasyum klorür, KCl, veya pinprick ile sıçanda görsel korteksi uyatarak) bunu ilk kez göstermiş oldular, KYD spinal trigeminal nükleustaki merkezi trigeminovasküler nöronlarda (ikinci order nöron) ortalama devam eden ateşleme hızında iki kat artışa neden oldu. Bu artmış aktivite görsel auranın başlamasından baş ağrısının

başlamasına kadar olan klasik gecikmeyle uyumlu olarak merkezi birimlerin % 72' si ve periferel birimlerin % 78' inde KYD' den sonra ortalama 25 dakika gecikmeyle meydana geldi. Birimlerin geri kalan kısmında, merkezi birimlerin % 28' inde ve periferel birimlerin % 22' sinde KYD dalgası ile eş zamanlı olarak artmış ateşleme meydana geldi. Çalışmayı yapan araştırmacılar, aksonları pia mater içine uzanan meningeal nosiseptörlerin aktivasyonu için cazip bir mekanizma öne sürmüşlerdir, buna göre KYD' nin ilerlemesi sırasında korteks yüzeyinde artmış K^{+1} konsantrasyonu yoluyla reseptörler aktive olmaktadır bu da tekrar dönüp hemen merkezi nöronları etkinleştirmektedir.



Şekil 2.5. Migren baş ağrısının önerilen mekanizması. Silberstein (22)' den modifiye edilerek alınmıştır.

2.1.9. Periferdeki migrenin kaynağı

Çok miktarda dolaylı kanıt migren baş ağrısının başta meninksler ve meninkslerin büyük kan damarları olmak üzere kranyal dokuları innerve eden uyarılmış primer afferent nöronlardan kaynaklandığı fikrini ilerletmiştir (26). Bu bakış açısı, insanlarda meningeal arterlerin ve dural sinüslerin direk olarak

uyarılması sonucu ağrı oluştuğunun gözlemlenmesinden dolayı büyük oranda ilerlemiştir. Herhangi bir fark edilebilir yapısal yetersizlik durumunda, migrenlilerin çoğunluğunda biyokimyasal veya genetik anormalite, bir migren atağı sırasında meningeal duysal nöronların aralıklı aktivasyonuna neden olabilir. Bir grup klinik ve prelinik bilgiler prosesin altında akut steril inflamasyon bulunduğu görüşünü desteklemektedir. Bu steril inflamasyonun öne sürülen endojen nedenlerinden biri kortikal yayılan depresyondur. Süperior salivator nükleustaki preganglionik parasempatik nöronların aktivasyonunun meningeal inflamasyonu alevlendirdiği öne sürülen alternatif bir endojen bileşendir, aynı zamanda bu inflamasyon sfenopalatin gangliyondan kaynaklanan efferent parasempatik nöronlardan proinflatuar moleküllerin salınımına yol açmaktadır. Eğer bu mekanizma gerçekten meningeal nosiseptörleri ve migren ağrı yolağını aktiflemek için yeterli olan bir meningeal inflamatuvar prosesi iletiyorsa bunu ortaya çıkarmak için daha fazla araştırma yapılabilir. Periferal ağrı modelinde olası bir neden olarak alerjik inflamatuvar hastalık fikri olası bir bağlantı olarak mast hücreleri ile ilişkilendirilmiştir. Migren baş ağrısında meningeal inflamasyonun rolü olduğuna dair diğer bir destek ise inflamatuvar bir durumdan sonra meningeal nosiseptörlerde aşırı duyarlılık oluşmasıdır. Bu nöronal olay, muhtemelen arteryel veya ilgili intrakranyal basınçtaki dinamik değişikliklere cevap olarak meningeal veya diğer sefalik arterleri innerve eden mekanosensör nöronların ritmik aktivasyonu tarafından aracılık edilen baş ağrısının zonklayıcı doğasını izah eden bir mekanizma sağlamaktadır. Bu duyarlılaşma nosiseptörlere, önceden zararsız olan arteryel pulsasyonu nosiseptif bir fırtınaya dönüştürme ve iletme yeteneği kazandırır. Primer afferent nöronlar trigeminal nükleus kaudalis ve dorsal kök içindeki ikinci order nöronlara daha fazla sinyal götürdüğünde, bu ikinci order nöronlar sensitize olurlar ve daha önce eksitator olmayan hafif uyarıya bile reaksiyon vermeye başlarlar. Eğer migrende merkezi duyarlılaşma oluşuyorsa migrenlilerin fasyal cilt cevaplarında değişiklik olması beklenir çünkü merkezi nöronlar konvergans sinyalleri intrakranyal meningeal ve vasküler yapılardan ve de kutanöz yapılardan alırlar. Bir çalışmada akut migren atağına maruz kalan hastaların % 79' unda kutanöz allodini tespit edilmiştir ki bu migren sırasında insanlarda merkezi duyarlılaşmanın varlığını desteklemektedir. Kutanöz allodininin kendiliğinden meydana geldiği migrenli

insanların gerçek yüzdesi daha düşük olmasına rağmen, son çalışmalar akut allodoninin bir birine yakın prevalans değerlerinin olduğunu bildirmiştir (epizodik migrende % 63.2-66.8 arasında ve kronik migrende ise % 68.3-81.0 arasında). Bunların hepsi birlikte göz önüne alındığında bu gözlemler, ikinci order nöronlardaki hipersensitivitenin bir biri ardınca üçüncü ve daha yüksek seviyelerde duyarlılaşma oluşturabileceğini ifade etmektedir. Ekstrakranyal arterleri innerve eden nosiseptif afferentlerin aktiflenmesinin, zonklayıcı özelliği ile birlikte baş ağrısını hızlandırdığı önerilmektedir. Migren ağrısının diğer bir olası kaynağının atında boyun kaslarını içeren oksipital sefalik yapıları innerve eden duysal nöronlar bulunmaktadır. Ek bilgiler migren ağrısında periferik ekstrakranyal duyarlılığın rolü olduğunu desteklemektedir, süperfisyal sefalik yayılımında botoks uygulamasının çok sayıda hastada atak sıklığını azalttığı da önerilmiştir.

2.1.10. Serotonin rolü

Akut migren tedavisinde serotonin reseptörleri (5-HT) aktivasyonunun önemli olduğu bilinirken, migren oluşumundaki fonksiyonu belirsizdir (26). Bazı araştırmacılar, beyin sapı serotonerjik nüklüsünden salınan serotoninin migren patogeneze katıldığını önermişlerdir, buna muhtemelen kranyal damarlar üzerine direk etkisi, merkezi ağrı kontrol yollarındaki görevi yada beyin sapı serotonerjik nükleusunun serebral kortikal uzantıları tarafından aracılık edilmektedir. Serotoninin böyle bir rolü olduğuna dair kanıt serotonin geri alımını bloke eden trisiklik antidepresanlardan gelmektedir, bunlar başarılı profilaktik anti migren ajanlardır. Aksine daha fazla seçici serotonin geri alım inhibitörleri migreni önlemede çok etkili değildir. Başka deliller inen ağrı inhibitör sistemindeki aksaklığın düşük serotonin durumundan kaynaklandığını göstermiştir ki bu KYD ile birlikte trigeminovasküler nosiseptif yolların aktivasyonunu kolaylaştırmaktadır.

2.1.11. Merkezi sinir sistemindeki migrenin kaynağı

Lambert (109) tarafından yapılan "migrende periferik patolojinin eksikliği" başlıklı bir yayında, migrende ağrının periferde oluştuğuna dair kanıtın dolaylı olduğu tartışılmıştır (26). Lambert migren ağrısı için periferik patoloji fikrini

sürdürmek amacıyla şunları ileri sürmüştür: biyolojik çarkın 5 parçasının yerinin belirlenmesi ve tasvir edilmesi gerekmektedir bunlar 1) nihai jeneratör 2) nihai jeneratörün patolojiyi oluşturmasını mümkün kılan çark 3) gerçek bir patolojik markır 4) patolojiyi ağrı sinyaline dönüştüren bir çark 5) ağrı sinyalini kortekse ileten şebeke ağı. Bahsedilen bu noktalardan (4) ve (5) tam olarak tanımlamıştır fakat (2) ve (3) keşfedilmeyi beklemektedir. Bir numaralı nihai jeneratör ki, bu migrenin ayırt edilebilen bir kaç farklı özelliğini oluşturmaktadır, bunlar migrenin kalıtılabilirliği, tek taraflılığı, geniş spektrumlu semptomları, sıklığı ve süresidir. Bunların hepsini merkezi sinir sisteminin dışındaki bir jeneratörün oluşturduğunu görmek zordur. Ona göre, olası jeneratörler olarak korteks ve beyin sapının rolü olduğunu desteklemektedir, bunlar muhtemelen inen inhibitör ağrı yolu üzerine etki etmekte ve bu inhibisyonu serbest bırakmaktadır. Örneğin, periferik olarak etki eden etkili ilaçlar, bir patoloji üzerine etki etmeyebilir, bu ilaçlar sadece normal trigeminal trafiğin oluşumunu bir seviyeye kadar azaltabilirler ki burada bir ağrı sinyali olarak daha fazla yanlış anlaşılmaz. Lambert, migren oluşumu için içinde patoloji barındırmayan bir alternatif sunmuştur, çünkü trigeminovasküler ağdaki gürültüye inen ağrı kontrol sistemi tarafından aracılık edilmektedir. Migren baş ağrısının muhtemel kaynağının inen ağrı kontrol devrelerindeki anormallik olduğu görüşü bundan hemen hemen 25 yıl öncesinde vardı. Bu fikir ilk olarak Raskin ve ark. (110) tarafından yapılan bir çalışma üzerine kuruldu, beyin sapında periaqueductal gri (PAG) bölge diye bilinen ağrı modülatör alanının yakınında uyarı elektrotlar yerleştirilen bir kaç denekte migren benzeri baş ağrıların ortaya çıktığını bildirmiştir. Bu bilgiler, sumatriptanla sağlanmış tam rahatlamadan sonra kendiliğinden ortaya çıkan ısrarcı migren atağı sırasında beyin sapı aktivasyonunu ortaya çıkaran pozitron emisyon tomografisi (PET) çalışması ile beraber migrenin nihai baş ağrı jeneratörünü oluşturan PAG' daki fonksiyon bozukluğu düşüncesini ilerletmiştir.

Fakat şu ana kadar bu teoriyi destekleyen direk kanıt yoktur. Son zamanlarda Lambert tarafından (111) daha detaylı bir teori ortaya atıldı, buna göre PAG rostroventral medulla devresinden kaynağını alan inen ağrı kontrol yolları migrenlilerde bozulmuştu ve migren ağrısının oluşumuna yol açan onların endojen nöronal inhibitör kontrol yolundan gelen çıkıcı sefalik duysal girişler serbest

bırakılıyordu. Merkezi teori için daha fazla kanıt Sprenger ve ark. (112)' dan gelmektedir, bunlar migrenin tüm klinik tanımını beyin sapındaki nöromodülatör yapıların (lokus sereleus veya PAG gibi) anormal aktivitesi ile daha eksiksiz olarak yapmışlardır. Lokus sereleus (temel noradrenerjik nükleus) kortikal fonksiyonu düzenleyen çok önemli bir göreve sahiptir ve afferent trafiği modifiye ettiği bildirilmiştir. Bu nükeusun bağlantıları büyük ölçüde neokorteks boyunca yayılır ve akut migren ataklarının PET çalışmasında lokus sereleusu içine alan dorsolateral beyin sapının aktivasyonu gösterilmiştir. Fakat PET' in sınırlı spasyal çözünürlüğünden dolayı bu aktivasyonun kesin anatomik bölgesine dair bazı çelişkiler vardır. Migren oluşumunda rol oynadığı zannedilen diğer beyin sapı çekirdekleri nükleus rafe magnus ve hipotalamustur. Son zamanlarda Stankewitz ve ark. (113) tarafından yapılan bir çalışma, migren hastalarında herhangi bir ağrı algısından önce trigeminal nükleusun aktive olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmada, ataklar arasında, atak öncesinde ve atak fazları sırasında intranasal olarak yerleştirilmiş zararlı uyarıya (bu uyaran trigeminal sinirin ilk ve ikinci dallarının reseptif alanında yer almaktaydı) beynin verdiği cevapları karşılaştırmak amacı ile BOLD tekniği ile fMRI kullanılmıştır. Özet olarak nosiseptif uyarı sırasında spinal trigeminal nükleustaki ataklar arası BOLD sinyali migrenlilerde kontrollerden önemli ölçüde daha düşük iken migrenlilerde sinyal büyüklüğünün yüksekliği gittikçe artmıştır. Bir sonraki ataktan günler önce bu yükseklik lineer bir şekilde artmaya başlamış öyle ki sonraki atağın başlama zamanı sinyalin büyüklüğünden tahmin edilebilmiştir. Sonradan, sinyal büyüklükleri ilk durumuna yada akut baş ağrısının başladığı durumdakine düşmüştür. Farklı gruplar arasındaki kişisel ağrı dereceleri benzer olup bu sadece kontrollerden ayrılan migrenlilerde trigeminal nosiseptif girişin işlenmesi olarak değerlendirilmiştir. Çalışma, trigemino nosiseptif stimülasyon sırasında dorsal pons' un (önceleri migren jeneratörü olarak adlandırılıyordu) aktivasyonunda önemli derecede artma olduğunu fMRI ile ilk kez göstermiştir fakat her hangi bir ağrının olmadığı durumlarda (interiktal peryot ve pre-iktal peryotlar gibi) bu aktivasyonda bir artma olmamıştır.

Spinal trigeminal nöronların zararlı uyarımından sonra bu aktivite benzeri değişim, muhtemelen bir sonraki atağı oluşturmak için beynin duyarlılığında bir artış olduğunu yansıtmaktadır çünkü bu alanlar baş ağrısı başlamadan önce aktivite

uzunluğunu artırmaktadır ve bu osilasyon davranışı migren baş ağrısının oluşumunda kilit rol oynayabilirken aksine atağa özel pons aktivasyonlarının ikinci bir olay olması çok muhtemeldir (26). Muhtemelen hipotalamus ve PAG-rostro ventral medulla sistemi (muhtemelen trigeminal nükleusun duyarlılığını değiştirebilirler) içeren spesifik yapılar gerçek atak sırasında dorsal pons' un aktivasyonuna yol açmaktadırlar. Migren ağrısının oluşumundan sorumlu lokasyonlar ve olayların keşfinde birincil engel ortaya çıkarılabilir patolojilerin eksik olması ve migren atağı sırasında farklı bir ağrı yolağının aktivasyonuna dair direk kanıtın eksik olmasıdır.

2.2. Ekstrasellüler (Nörotransmitter Olarak) ATP

Purinerjik sinyalleşmenin sinir sisteminin birçok aktivitesi ile ilişkili olduğu şimdi iyi bilinmektedir, bu aktiviteler arasında nöro-koruyucu, otonomik fonksiyonların merkezi kontrolü, nöral-gliyal etkileşimler, damar tonusu ve anjiyogenezisin kontrolü, ağrı ve mekanosensör transdüksiyon ve özel duyuların fizyolojisi sayılabilir (114). ATP' nin farklı fizyolojik etkileri önceleri kısmen bilinmekteydi. Örneğin, 1929' da, Drury ve Szent-Gyorgyi (115) ATP ve adenozinin kalp ve kan damarları üzerine güçlü ekstrasellüler etkileri olduğunu gösterdiler. 1948'de Emmelin ve Feldberg (116) kedilerde ATP' nin intravenöz enjeksiyonun merkezi ve periferik mekanizmaları etkileyen kompleks etkilere yol açtığını gösterdiler. ATP' nin lateral ventriküle enjeksiyonu, kedilerde kas zayıflığı, ataksi, uykuya meyilli olmaya neden oldu. ATP' nin beynin çeşitli bölgelerine uygulanması biyokimyasal ve elektrofizyolojik değişiklikler oluşturdu. İlk defa Holton (117) tavşan kulak arterini innerve eden duysal sinirlerin antidromik uyarılması sırasında ATP salınımını göstererek sinir sisteminde ATP' nin bir nörotransmitter olarak fonksiyonu olduğunu ileri sürmüştür. Buchthal ve Folkow (118) ise asetilkolin ile kasılması uyarılmış kurbağa iskelet kası liflerinin ATP' ye maruz kalınca kasılmalarının daha da güçlendiğini bularak ATP' nin nöromüsküler kavşakta fizyolojik rolü olduğunu fark etmişlerdir. Ayrıca Ginsborg ve Hirst (119) de ratlarda, nöromüsküler kavşaktan asetilkolin (ACh) salınımının pürinler tarafından presinaptik olarak module edildiğini bildirmiştir.

2.2.1. Purinerjik hipotez

ATP tarafından non-arenerjik ve non-kolinerjik (NANC) sinir aracılı cevabın taklit edilmesi, NANC sinirlerinin uyarılması sırasında lusiferin-lusiferaz luminometre ile ATP salınımının ölçülmesi, kunakrinli bağırsakta nöronların alt populasyonlarının histokimyasal işaretlenmesi (kunakrin: peptitlere bağlanan ATP'yi seçici olarak işaretleyen floresan boya), yavaş bir şekilde parçalanabilen ATP analogu ve ATP reseptörünün seçici desensitizasyonunu sağlayan α,β -metilen-ATP (α,β -meATP)'nin NANC sinir uyarımına olan cevapları bloke etmesi purinerjik hipotez için birer deneysel kanıt olmuşlardır (114). Bu çalışmalardan hemen sonra idrar kesesinde NANC eksitator sinirler için ATP'nin bir nörotransmitter olduğuna dair kanıt sunuldu.

2.2.2. Purinerjik ko-transmisyon

Sempatik sinirlerde noradrenalin ve ATP'nin ko-transmitter olarak bulunduğu iyi bilinmektedir (114). İdrar kesesini innerve eden parasempatik sinirlerde ACh ve ATP ko-transmitter olarak bulunur. Duysal sinirlerin alt populasyonlarının SP ve cGRP'ye ek olarak ATP kullandığı gösterilmiştir ki aksan refleks aktivitesinde ATP bu peptitler ile birlikte çalışıyor gibi görünmektedir. Geçerli görüş; ATP, VIP ve NO'nun NANC inhibitör sinirlerde ko-transmitter olduğudur ancak bağırsağın farklı bölgelerinde farklıdır. Son zamanlarda, ATP'nin merkezi sinir sisteminde noradrenalin, serotonin, glutamat, dopamin ve gama aminobütirik asit (GABA) ile birlikte bir ko-transmitter olduğu gösterilmiştir. ATP ve noradrenalin (NA), hipotalamusta ATP ko-transmisyonu ile uyumlu olan vazopressin ve oksitosin salınımı için sinerjik etki göstermektedir. Glutamat dışında ATP de öğrenme ve hafıza ile ilgili olan hipokampal CA1 nöronlarında uzun süreli potansiyalizasyon ile ilişkidir (114). Tablo 2.2' de periferik ve merkezi sinir sistemindeki nöronlarda ATP'nin bir ko-transmitter olarak dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Periferik ve merkezi sinir sistemindeki nöronlarda ATP' nin bir ko-transmitter olarak dağılımı. Abbraccio ve ark. (69)' ndan alınmıştır.

Periferik Sinir Sistemi	Nöron Tipi	Ko-transmitterler
	Sempatik Sinirler	ATP + NA + NPY
	Parasempatik Sinirler	ATP + ACh + VIP
	Duysal-Motor	ATP + CGRP + SP
	Non-adrenerjik, Non-kolinerjik	ATP + NO + VIP
	Motor Sinirler (gelişimin erken safhasında)	ATP + ACh
Merkezi Sinir Sistemi	Korteks, Kaudat nükleus	ATP + ACh
	Hipotalamus, Lokus sereleus	ATP + NA
	Hipotalamus, Dorsal kök, Retina	ATP + GABA
	Mezolimbik sistem	ATP + Dopamin
	Hipokampus, Dorsal kök	ATP + Glutamat

2.2.3. Pürin reseptörleri

Purinoseptörlerin iki farklı tipi vardır, adenosin için P1, ATP ve adenosin difosfat (ADP) için ise P2' dir. ATP' nin P2 reseptörleri üzerinden etkisi direk iken ektoenzimler tarafından çabucak yıkıldığı için yıkım ürünü olan adenosinin P1 reseptörleri üzerinden yaptığı etki ise ATP' nin dolaylı etkisidir (114). Adenosinin P1 reseptörlerinin iki alt tipi hemen hemen aynı zamanda bulunmuştur, fakat P2 reseptörlerinin farklı iki tipi ancak 1985' te Burnstock ve Kennedy tarafından önerilmiştir. Bir yıl sonra iki P2 reseptör alt tipi daha adlandırılmıştır, bunlar ADP' ye seçici olan plateletler üzerindeki P2T, ve makrofajlar üzerindeki P2Z reseptörleridir. Bunları takiben ortaya çıkarılan alt tiplerden belki de en önemlisi P2U reseptörüdür ki bu ATP' ye ek olarak UTP gibi pürimidinleri de tanır. Fakat kolaylık olması açısından Abbraccio ve Burnstock (120) tarafından ligand kapılı iyon kanalı reseptörleri P2X ve metabotropik G-protein kenetli reseptörleri ise P2Y olmak üzere iki temel aileye ayrılmıştır. Bu sınıflandırma nükleotit reseptörlerin klonlanması ve transdüksiyon mekanizmaları çalışmalarına dayanmaktadır. Diğer taraftan P1 reseptörlerinin 4 alt tipi klonlanmış ve özellikleri ortaya konulmuştur. Şimdi, pürinerjik sinyalleşmenin birçok non-nöral ve nöral mekanizmalar, hem kısa süreli hem de uzun süreli trofik olaylar, ekzokrin ve endokrin sekresyon, immün cevaplar, inflamasyon, mekano-duysal transdüksiyon, platelet agregasyonu ve endotelial aracılı vazodilatasyon ve hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü ve

ölümü ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Pürin ve pürimidin reseptörlerinin özellikleri tablo 2.3' te gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Pürin ve pürimidin reseptörlerinin özellikleri. Burnstock (114)' dan alınmıştır.

Reseptör	Yaygın Dağılım Yeri	Transdüksiyon Mekanizmaları
P1 (adenozin)		
A1	Beyin, spinal kort, testis, kalp, otonom sinir sonlanmaları	Gi1, Gi2 ve Gi3, cAMP
A2A	Beyin, kalp, akciğerler, dalak	GS, cAMP↑
A2B	Kalın barsak, mesane	GS, cAMP↑
A3	Akciğer, karaciğer, beyin, testis, kalp	Gi2, Gi3 ve Gq/11, cAMP↓ IP3
P2X		
P2X1	Düz kas, plateletler, serebellum, dorsal kök spinal nöronları	Kasyon kanalı (Ca ⁺² ve Na ⁺)
P2X2	Düz kas, MSS, retina, kromafin hücreler, otonom ve duysal ganliyon	İyon kanalı (özellikle Ca ⁺²)
P2X3	Duysal nöronlar, nükleus traktus solitarius, bazı sempatik nöronlar	Kasyon kanalı
P2X4	MSS, testis, kolon	İyon kanalı (özellikle Ca ⁺²)
P2X5	Ciltte çoğalma yeteneğindeki hücreler, barsak, mesane, timus, spinal kort	İyon kanalı
P2X6	MSS, motor nöronlar, spinal kort	İyon
P2X7	Apoptotik hücreler (örneğin, immün hücreler, pankreas ve ciltte ihücreler)	KATyon kanalı ve uzun süreli aktivasyona sahip olan büyük por
P2Y		
P2Y1	Epitelyal ve endotelyal hücreler, plateletler, immün hücreler, osteoklastlar	Gq/G11; PLC-β aktivasyonu
P2Y2	İmmün hücreler, epitelyal ve endotelyal hücreler, böbrek tübülleri	Gq/G11 ve muhtemelen Gi; PLC-β aktivasyonu
P2Y4	Endotelyal hücreler	Gq/G11 ve muhtemelen Gi; PLC-β aktivasyonu
P2Y6	Bazı epitelyal hücreler, plesenta, T-hücreleri, timus	Gq/G11 ve PLC-β aktivasyonu
P2Y11	Dalak, barsak, granülositler	Gq/G11 ve GS; PLC-β aktivasyonu
P2Y12	Plateletler, gliyal hücreler	Gi (Go); adenil siklazin inhibisyonu
P2Y13	Dalak, beyin, lenf nodları, kemik iliği	Gi/Go
P2Y14	Plesenta, adipoz doku, mide, barsak, farklı beyin bölgeleri	Gq/G11

2.2.4. ATP' nin kaynakları, salınması ve parçalanması

İntrasellüler ATP birçok hücrel reaksiyon için bir enerji kaynağı olarak bilinir (40). Hücre ATP sentezlemek için ve hücrenin ihtiyacına göre intrasellüler ATP deposunu devamlı dolu tutmak veya hızlı bir şekilde yenilemek için kompleks mekanizmalar kullanır. Sitoplazma yaklaşık 5 mmol/l (5–10 mM) ATP içerir. Üç genel ATP salınım şekli tanımlanmıştır: (1) hücre stres, osmotik şişme, iskemi, inflamasyon, apoptozis, nekroz gibi nedenlerden dolayı hasara uğradığında, bu durum hasarlı hücreden ATP' nin pasif olarak sızmasına neden olur. (2) veziküler salınım (3) kanal aracılı salınım. Sitoplazmadan daha yüksek ATP konsantrasyonları (100 mmol/l' e kadar) nöronların sekreatuar veziküllerinde, plateletlerin serotonerjik granüllerinde ve ekzokrin bezlerde (adrenal medullanın kromaffin granüllerinde, pankreatik β -hücrelerinin insülin içeren granüllerinde ve mast hücrelerinin sekreatuar granüllerinde) mevcuttur (40). ATP ve diğer nükleotitler sekreatuar ve sinaptik veziküller içine alınır ve depo edilir (69). Sinirlerden ATP' nin ekzositotik veziküler salınımı için açık kanıtlar vardır ve veziküllerdeki nükleotitlerin konsantrasyonunun 1000 mM' a kadar çıkabildiği iddia edilmektedir (114).

Son zamanlarda ortaya konulduğu gibi, ATP' nin sinaptik veziküller içinde birikmesine klor bağımlı veziküler nükleotit transporter (VNUT) tarafından aracılık edilmektedir ve bu taşıyıcı, veziküler glutamat taşıyıcılarının da ait olduğu solüt taşıyıcı (SLC) 17 anyon taşıyıcı ailesi içinde yer almaktadır (69). VNUT tercihen ATP, guanozin trifosfat (GTP) ve ADP' yi tanır ve diATP tarafından inhibe edilir (114). Bu taşıyıcı beyinde yüksek derecede eksprese olur ve immünhistokimya ile kromaffin granüllerde ve astrositlerin alt populasyonlarındaki yerleri belirlenebilir. Farklı konsantrasyonlarda olmasına ve diğer nörotransmitterler ile birlikte depo edilebilmesine ve birlikte salınabilmesine (GABA, NA veya glutamat) rağmen ATP her sinaptik ve sekreatuar vezikülde vardır. Bazı nöral sonlanmalar (medyal habenula ve korteksteki gibi) sadece ATP' nin bulunduğu veziküller içerebilirler. Şu anda, çeşitli fizyolojik nükleotit reseptör agonistlerinin (ATP, ADP, urasil trifosfat (UTP), urasil difosfat (UDP), şekerler ve nikotin amid adenin dinükleotitin (NAD^+) genel mekanizmalar aracılığı ile salınıp salınmadığı açık değildir.

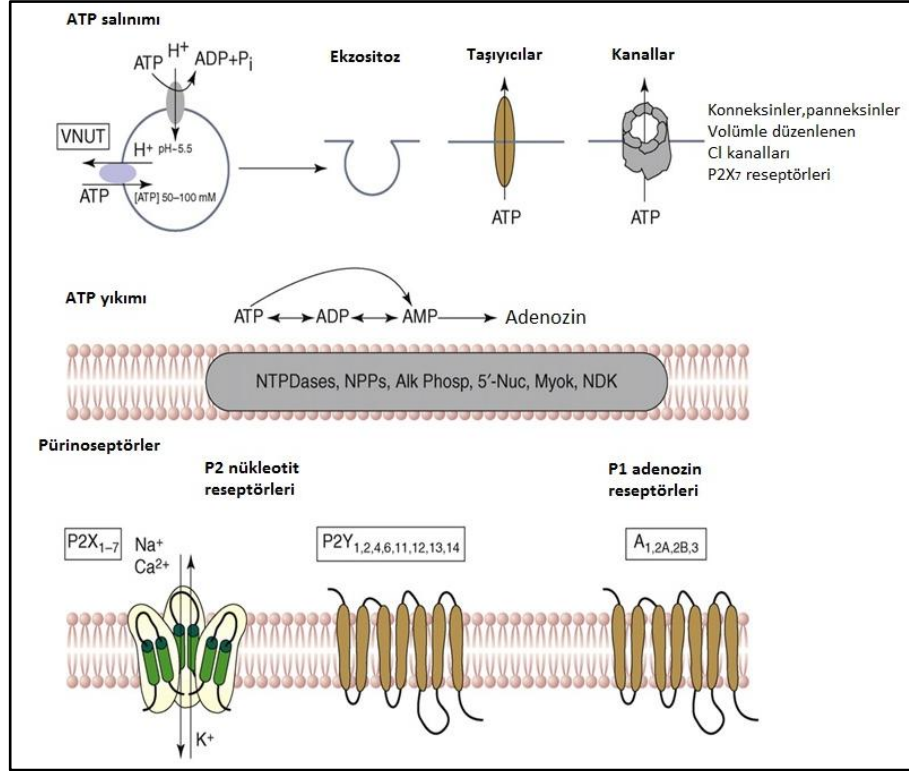
Purinoseptörlere etki eden ATP' nin ana kaynağının ölen yada hasarlanan hücreler olduğu sanılırdı fakat şimdi, bir çok hücreden mekanik strese, hipoksiye,

inflamasyona ve bazı agonistlere fizyolojik yada patofizyolojik cevap olarak salındığı bilinmektedir (114). Endotelyal ve ürotelyal hücrelerden, osteoblastlardan, astrositlerden, mast ve kromaffin hücrelerinden ekzositotik salınımı olduğuna dair zoraki kanıtlar vardır, fakat ATP-bağlı kaset taşıyıcıları, konneksin hemikanallar, plazmalemmal voltaj-bağımlı anyon kanalları yoluyla salındığı da önerilmektedir (şekil 2.6).

ATP' nin ekzositotik nöral veziküler salınımı için zoraki delil vardır ve son çalışmalar da ATP' nin astrositlerden veziküler salınımını desteklemektedir (69). P2X7 reseptörlerine ek olarak ATP-bağlı kaset taşıyıcıları, konneksin veya panneksin yarı kanalları, plazmalemmal voltaj bağımlı anyon kanalları, nükleotit salınımının ek mekanizmaları olarak kanıtlanmıştır. Yarı kanalların iskemi ile tetiklenmiş nöral ATP salınımı ile ilişkili olduğu ve tat tomurcuklarında ATP aracılı intersellüler iletişimin olduğu vurgulanmıştır. UTP' nin ve UDP şekerlerinin salınım mekanizmaları daha az bilinmektedir fakat P2Y14 reseptör agonisti UDP glikozunun salınımının düzenlenmesine dair kanıtlar elde edilmiştir. Salınımdan sonra ATP ve diğer nükleotitler ektonükleotidazlar tarafından hızlı bir enzimatik yıkıma maruz kalmaktadır.

Nöronlardan ve non-nöronal hücrelerden salınan ATP' nin ektonükleotidazlar tarafından yıkıldığı şimdi çok iyi bilinmektedir ve bu önemlidir çünkü ATP metabolitleri çeşitli purinerjik reseptörler için fizyolojik ligandlar olarak işlev görürler (69).

Bu ektonükleotidazlar içinde ekto-nükleozit trifosfat difosfohidrolazlar (E-NTPDaz) içinde yer alan NTPDaz 1,2,3 ve 8 ekstrasellüler; ektonükleotit pirofosfatazın üç alt tipi, alkalın fosfatazlar, ekto 5'-nükleotidaz, ve ektonükleotit difosfokinazları (E-NDPK) içeren bir kaç enzim ailesi yer almaktadır (114). NTPDaz-1 ATP' yi direk adenosin monofosfat (AMP)' a hidroliz ederken UTP' yi UDP' ye hidroliz eder; aksine NTPDaz 2 ise ATP' yi ADP' ye ve 5'-nükeotidaz hidrolazlar AMP' yi adenosine hidroliz ederler (şekil 2.6).



Şekil 2.6. ATP' nin salınım, parçalanma ve resepsiyon mekanizmaları. Abbracchio ve ark. (69)' ndan alınmıştır. Alk Phosp, alkaline fosfataz; Myok, miyokinaz; NDK, nükleozit difosfat kinaz; NPPs, nükleotit pirpofosfataz ve fosfodiesterazlar ; 50-Nuc, 50-nükleotidaz; VNUT, veziküler nükleotit taşıyıcısı.

2.2.5. Nörotransmisyonun fizyolojisi ve patofizyolojisi

Purinerjik nörotransmisyon alanı hızlı bir şekilde genişlemektedir, bu nöro-haberleşme sisteminin fizyolojisi ve patofizyolojisine ilgi gittikçe artmaktadır ve tıbbi müdahaleler araştırılmaktadır (114). Çölyak gangliyondaki ve beyinde bulunan medyal habenuladaki sinaptik potansiyeller anti-tripanozomal ajan olan suramin tarafından geri dönüşümlü olarak antagonize edilmiştir. Daha sonra beyin ve spinal korttaki çeşitli P2 reseptör alt tiplerinin dağılımı tanımlanmış ayrıca beyin kesitlerinde, izole sinir ve gliyal hücrelerde pürinlerin etkileri üzerine elektrofizyolojik çalışmalar yapılmıştır. Myenterik pleksusta ve çeşitli duysal, sempatik, parasempatik ve pelvik gangliyonda sinaptik transmisyon da gösterilmiştir. ATP' nin ektonükleotit enzimler aracılığıyla yıkılmasıyla oluşan adenozin, hem periferik hem de merkezi sinir sisteminde eksitator nörotransmitterlerin salınımını inhibe etmek amacıyla presinaptik P1 reseptörleri yoluyla etkisini göstermektedir.

Purinerjik haberleşme, prefrontal kortekste öğrenme ve hafızayı içine alan daha yüksek bilişsel fonksiyonlarla da ilişkilidir.

2.2.6. Nöron koruma özelliği

Beyinde, purinerjik sinyalleşme travma, inme, iskemi yada nörodejeneratif hastalıkları takiben sinir dokusunun yeniden yapılanması ile ilişkilidir (114). Kronik epileptik sıçanların hipokampusleri, ATP' ye P2X7 reseptörlerinin artmış ekspresyonu ile ilişkili anormal cevaplar göstermiştir. Nöronal yaralanmayla fibroblast büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü ve platelet kaynaklı büyüme faktörleri salınır. Bu büyüme faktörleri ile kombinasyonda ATP, astrosit proliferasyonunu uyarabilir, reaktif astrogliosis ve hipertrofik ve hiperplazik cevaplara katkıda bulunabilir. P2Y reseptör antagonistlerinin, kortekste, hipokampüste ve serebellumda olası nöro-koruyucu ajanlar oldukları önerilmektedir. A2A (P1) reseptörlerinin blokajı, Parkinson hastalığındaki tremorları antagonize etmiştir, aksine ATP-MgCl₂ ise spinal kord yaralanmalarının tedavisi için araştırılmaktadır.

Fonksiyonel etkileşimler, purinerjik ve nitrejik nörotransmitter sistemleri arasında meydana geliyor gibi görülmektedir, bu etkileşimler hipotalamik seviyede hormon sekresyonunun ve beden ısısının düzenlenmesi için ve beyin sapı düzeyinde kardiyovasküler ve solunumun kontrolü için önemli olabilir. Nükleus traktus solitarius (NTS) kardiyovasküler sistemin refleks kontrolü ile ilgili beyin sapının temel integratif merkezidir ve NTS' de P2X reseptörlerinin uyarılması hipotansiyonu tetikler. Trigeminal mezensefalik nükleusun nöronlarında eksprese olan P2X reseptörleri proprioseptif bilginin işlenmesi ile ilgili olabilir.

2.2.7. Nöron-glia etkileşimleri

ATP, nöronlar ve glia hücreleri arasında ekstrasellüler bir sinyal molekülüdür (114). Astrositlerden salınan ATP, travma ve iskemiye cevap olarak reaktif astrogliosisi (astrosit ve mikrogliaların proliferasyon ve morfolojisinde dikkat çeken değişiklikler) başlatmak ve devam ettirmek suretiyle hücresel cevabın

tetiklenmesinde önemli olabilir. Beyin yaralanması sırasında salınan ATP' ye cevapların bazıları nöro-koruyucudur, ancak daha yüksek konsantrasyonlardaki ATP travmadan sonra başlayan patofizyolojiye katkıda bulunur. Çoklu P2X ve P2Y reseptör alt tipleri astrositler, oligodendrositler ve mikroglialar tarafından eksprese edilir. ATP ve temel fibroblast büyüme faktörü sinyalleri mitojenle aktiflenmiş protein kinaz (MAPK, astrositlerdeki ATP ve beta- temel fibroblast büyüme faktörü (β -FGF2)' nün sinerjistik etkileşimlerinin temelinde bulunur) kaskadında birleşir. ATP, nöronların uyarılabilirliğini düzenleyen glutamat, GABA ve ATP' nin salınımı için astrositlerdeki P2X7 reseptörlerini etkinleştirebilir. Merkezi sinir sisteminin immün hücreleri olan mikroglialar da purin ve pürimidinler tarafından interlekin-1 beta (IL-1 β), IL-6 ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinleri salmak üzere aktiflenirler. Böylece, mikrogli hücreleri merkezi sinir sistemindeki enfeksiyona karşı önemli bir role sahip olmasına rağmen bu immün reaksiyonun aşırı uyarılması iskemi, travma veya nörodejeneratif hastalıkların neden olduğu bu nöronal hasarı hızlandırabilir. P2X4 reseptörleri sinir yaralanmasından sonra, spinal mikrogliada kapı dokunma alodiniyi tetiklemektedir, aksine P2X7 reseptörleri primer mikrogliada süperoksit üretimine aracılık etmektedir ve Alzheimer hastalığı transgenik fare modelinde up-regüle (β -amiloid plakların etrafında) olmaktadır.

2.2.8. Pürin transmitter ve reseptör plastisitesi

Otonom sinir sistemi önemli plastisite göstermektedir: Ko-transmitterler ve reseptörlerin ekspresyonu sinirlerde gelişim ve yaşlanma sırasında önemli değişimler göstermektedir (114). Patolojik durumlarda purinerjik ko-transmisyon bileşeninin arttığına dair bir kaç örnek vardır. İnsan mesanesinin kontraksiyonunun parasempatik purinerjik sinir-aracılı bileşeni patolojik durumlarda (intersistiyel sistizis, dışa çıkımın tıkanması, idiyopatik insitabilite ve bazı nörojenik mesane tipleri gibi) % 40 artmıştır. ATP de damarlar üzerinde hipertansif etkiye sahip sempatik sinirlerde önemli derecede bir ko-transmitter rolüne sahiptir. Konjestif kalp yetmeliği olan sıçan kalplerinde P2X1 ve P2Y2 reseptör mesajcı ribonükleik asit (mRNA)' lerinin up-regülasyonu bildirilmiştir ve diyabet ve hipertansiyonda böbrek glomeruluslarında P2X7 reseptör ekspresyonunda önemli bir artış vardır.

2.2.9. Vasküler tonus ve anjiyogenezisin ikili purinerjik nöral ve endotelial kontrolü

ATP ve adenozin anjiyoplastiyi takiben anjiyogenezis, ateroskleroz ve restenoz sırasında hücre göçü, proliferasyonu ve ölümüne ek olarak vasküler tonusun lokal kontrolünü sağlayan mekanizmalarla da ilişkilidir (114). Sempatik sinirlerden bir ko-transmitter olarak salınan ATP, P2X reseptörleri aracılığıyla vasküler düz kasları kasar, aksine akson refleksi aktivitesi sırasında duysal-motor sinirlerden salınan ATP ise P2Y reseptörleri aracılığıyla damarlarda dilatasyon yapar. Ayrıca akım değişiklikleri veya hipoksi esnasında endotelial hücrelerden salınan ATP, NO salınımı için endotelial hücrelerde P2Y reseptörlerine etki eder, sonuçta NO ise gevşemeye neden olur. Ekstrasellüler ATP' nin yıkımını takiben oluşan adenozin ise düz kastaki P1 reseptörleri üzerinden vazodilatasyon oluşturur.

2.2.10. Ağrı ve purinerjik mekanosensör transdüksiyon

Ağrının başlamasında ATP' nin rolü ilk kez 1966' da ve sonra 1977' de insan cilt kabarcıkları kullanılarak fark edilmiştir (114). 1995' de P2X3 iyonotropik reseptörü klonlandığında büyük bir ilerleme sağlanmış ve daha sonra baskın olarak dorsal kök gangliyonunda küçük nosiseptif duysal sinirlerin alt popülasyonunda lokalize olduğu gösterilmiştir (121). Burnstock (122) 1996' da kotalji, refleks sempatik distrofi, anjina, migren, pelvik ve kanser ile ilişkili olarak P2X3 ve P2X2/3 reseptörleri aracılığıyla ATP tarafından ağrının başlatıldığına dair bütünleşik bir purinerjik hipotez önerdi. Bunu akut, inflamatuvar, nöropatik ve viseral ağrı için bu konsept üzerine artan sayıda yayınlar takip etmiştir. Duysal nöronların alt popülasyonunda P2Y1 reseptörlerinin P2X3 reseptörleri ile birlikte bulunduğu da gösterilmiştir. Üreter, mesane ve bağırsağı içine alan viseral tüplerde ve keselerde (bu yapılarda gerilme esnasında epitel hücrelerden salınan ATP subepitelyal duysal sinirler üzerindeki P2X3 homomultimerik ve P2X2/3 heteromultimerik reseptörlere etki eder ve bu merkezi sinir sistemi (MSS)' nde ağrı merkezlerine doğru duysal impulsları başlatır) meydana gelen bir purinerjik mekano-sensör hipotezi önerilmiştir. Mesane, üreter, barsak, dil ve diş palpleri üzerindeki son çalışmalar bu hipotezi destekleyen kanıtlar oluşturdu. Hem nosiseptif hem de mesane boşalma

reflekslerini başlatmak üzere mesanenin gerilmesi esnasında ürotelyal hücrelerden salınan ATP' nin subepitelyal duysal sinirler üzerindeki P2X3 reseptörlerine etki ettiğini göstermek için P2X3 reseptör nakavt fareler kullanıldı. Distal kolonda, orta dereceli bir gerilme esnasında salınan ATP, peristaltizi etkilemek için düşük eşikli sub-epitelyal duysal nöronlar üzerindeki P2X3 reseptörlerine etki etmekte aksine yüksek eşikli ekstrinsik sub-epitelyal duysal lifler ise ağrıyı başlatmak için ağır gerilmeye cevap vermektedirler.

ATP, merkezi ağrı yolağındaki sinapsları etkilemek için primer afferent duysal sinirlerin spinal kord terminallerinden de salınan bir nörotransmitterdir (114). Doğum sonrası sıçanlardan alınan transvers spinal kord kesitleri kullanılarak, eksitatör post sinaptik akımlara sinaptik olarak salınan ATP tarafından aktive edilen P2X reseptörlerinin aracılık ettiği gösterilmiştir. Piridoksalfosfat-6-azofenil-2,4 disülfonik asit (PPADS) seçici olmayan bir P2 reseptör antagonistidir fakat bilinen diğer antagonistlere göre yaklaşık 100-10000 kez daha yavaş bir şekilde çözünme özelliğine sahip bir avantajı vardır. Diğer bir antagonist olan trinitrofenil adenozin-5'-trifosfat (TNP-ATP), P2X3 ve P2X2/3 reseptörlerinin güçlü ve selektif bir antagonistidir. *5-[[[(3-Phenoxyphenyl) methyl] [(1S)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]amino] carbonyl]-1,2,4-benzenetricarboxylic acid* (A317491) ise P2X3 ve P2X2/3 reseptörlerinin nükleotit olmayan güçlü ve selektif bir antagonistidir ve sıçanda kronik inflamatuvar ve nöropatik ağrıyı azaltmaktadır. P2X3 reseptörlerini downregüle etmek için antisens oligonükleotitler kullanılmış ve nöropatik (parsiyel siyatik sinir ligasyonu) ve inflamatuvar (tam Freund adjuvanı) ağrı modellerinde tedavi ile birlikte 2 gün içinde mekanik hiperaljezi gelişiminin inhibisyonu gözlenmiştir. P2X3 reseptör çift-zincir-kısa interfere RNA (siRNA) kronik nöropatik ağrıyı rahatlatmakta ve insanlarda törapatik ağrı stratejileri için yeni kapılar açmaktadır. Geleneksel Çin tıbbında dismenore için bir analjezik olarak kullanılan Tetrametilpirazn' in bir P2X reseptör antagonisti olduğu iddia edilmiştir ve bu ilaç % 5 formalin ile tetiklenen nosiseptif davranışın ilk fazını önemli derecede inhibe etmiştir ve sıçan arka pençe ağrı modelinde ikinci fazı hafif derecede azaltmıştır. Kanser ağrısı ile ilgili P2 reseptör antagonistleri de araştırılmaya başlanmıştır.

2.3. Sinir Sistemindeki Pürinerjik Haberleşme

2.3.1. Pürin ve pürimidin reseptörleri

Adenozin (P1 reseptörleri) ve ATP (P2 reseptörleri) için farklı membran reseptörleri 1978' de tanımlanmıştır, daha sonra P2 reseptörleri onların etki mekanizmaları, farmakolojileri ve moleküler klonlanmaları esas alınarak iyonotropik P2X ve metabotropik P2Y olmak üzere iki gruba bölünmüştür (69). Pürinoseptörler, memeli dokularında en çok bulunan reseptörlerdir, nöral orjinli tüm hücre tiplerinde bulunabilirler.

2.3.2. P1 pürinerjik reseptörler

Dört adenozin reseptörü A1, A2A, A2B ve A3 G-protein kenetli metabotropik reseptörlerdir (69). Tipik olarak A1 and A3 Gi/o (döngüsel adenozin monofosfat (cAMP) oluşumunu inhibe eder) ile kenetli iken aksine A2A ve A2B Gs aracılığı ile cAMP oluşumunu uyarır. Hücre tipine bağlı olarak diğer G-protein kombinasyonları ortaya çıkarılmış ve tüm adenozin reseptörlerinin mitojenle aktiflenmiş protein kinazların en azından bir alt ailesini aktiflediği gösterilmiştir. Bu nedenle merkezi sinir sisteminde, adenozin nöral ve gliyal fonksiyonların modülasyonunu içeren çoklu fonksiyonlara sahiptir. Ayrıca adenozin doğal ve kazanılmış immün sistemlerin kontrolünde önemli bir rol oynar ve adenozin sisteminin disregülasyonu epilepsiden nörodejeneratif hastalığa ve psikiyatrik durumlara kadar varan patolojilerle ilgilidir. Adenozin etkileri sıklıkla antagonistik veya ATP ile sinerjistiktir.

2.3.3. P2X reseptörleri

P2X reseptörleri klasik katyonik ligand kapılı kanallardır ki ATP bağlandığında açılır ve por Na^{+1} , K^{+1} ve Ca^{+2} a geçirgen olur (69; tablo 2.4). P2X reseptörleri yedi farklı gen tarafından kodlanan bireysel alt ünitelerden oluşan trimerdir, P2X reseptör fenotiplerinin farklılığı bireysel alt ünitelerin katlanmasıyla belirlenir, şimdiye kadar altı homomerik (P2X1–P2X5 ve P2X7;) ve altı heteromerik (P2X1/2, P2X1/4, P2X1/5, P2X2/3, P2X2/6 ve P2X4/6) kanallar teşhis edilmiş ve P2X4/7 kanallarının da olduğu iddia edilmiştir. Homomerik P2X7 reseptörleri 100-1000 μM ATP konsantrasyonlarında aktive edilirler ve reseptörlerin toparlanması ise

1-10 μM EC50 değerindedir. Nöronal hücrelerde tüm P2X alt üniteleri eksprese edilir, bu ekspresyon farklı beyin bölgelerinde ve hücre tiplerinde heterojenlik gösterir. Bir çok merkezi nöronlarda ekspresyon mozaiktir, bu mozaik ise ATP ile tetiklenmiş akım cevaplarının istisnai çeşitliliğini belirlemektedir.

Tablo 2.4. P2 reseptörlerinin agonist profili. Abbracchio ve ark. (69)' ndan alınmıştır. NAADP⁺, nikotinik asit adenin dinükleotit fosfat; O-ATP, okside- ATP.

Reseptör Alt Tipi		Endojen Agonist (insanda)	Seçilmiş Antagonist
P2X Reseptörleri	P2X1	ATP	TNP-ATP, NF023, NF449, R01
	P2X2	ATP	NF778
	P2X3	ATP	A317491, TNP-ATP, R03, RN-1838
	P2X4	ATP	Antagonist yok
	P2X5	ATP	PPADS, suramin.
	P2X6	ATP	Antagonist yok
	P2X7	ATP	KN62, O-ATP, Coomassie BBG, RN-6189, A-740003, A-438079
P2Y Reseptörleri	P2Y1	ADP	MRS 2179
	P2Y2	ATP,UTP(eşitgüçte)	AR-C126313
	P2Y4	UTP	Reactive Blue 2
	P2Y6	UDP	MRS 2578
	P2Y11	ATP, NAD ⁺ , NAADP ⁺	Reactive Blue 2, NF 157
	P2Y12	ADP	CT 50547
	P2Y13	ADP	MRS 2211
	P2Y14	UDP glukoz,UDP Galaktoz	Antagonist yok

Periferik nöronlar (hem duysal hem de otonom) dominant olarak P2X3 ve P2X2/3 reseptörlerini eksprese ederler, bu ağrı ve sıcaklığın algılanması ile ilişkilidir (69). Homomerik 2X3 kanalları eşsiz bir sıcaklık duyarlılığına sahiptir, bu reseptörlerin desensitizasyon hızı sıcaklık-duyarsızdır aksine desensitizasyondan kurtulma istisnai bir şekilde sıcaklığa bağımlıdır. ATP-kapılı P2X3 reseptörleri nosiseptif duysal nöronlarda büyük ölçüde eksprese edilir ve ağrı sinyallerinin iletimine katılırlar (123).

In situ veya yeni izole edilmiş glia hücrelerinde fonksiyonel P2X reseptörlerinin varlığına dair çok az kanıt vardır, şu ana kadar kortikal astrositlerde heteromerik P2X1/5 reseptörleri tesbit edilmiştir, P2X1 ve P2X5 alt üniteleri muhtemelen Schwann hücrelerinde ve P2X4 reseptörleri ise spinal kord mikroglialarında eksprese olmaktadır. Tüm P2X reseptörleri Ca^{+2} a geçirgendir, geçirgenlikte Ca^{+2} un

monovalent katyonlara oranı çeşitli P2X alt ünitesi kombinasyonları için 1 ile 5-10 arasında değişir. Medyal habenula ve somatosensör korteks gibi merkezi nöronların bir kaç tipinde doğal ATP ile tetiklenmiş akımlar istisnai olarak büyük ölçüde yüksek Ca^{+2} geçirgenliğine sahiptir. Sonuç olarak NMDA reseptörleri Mg^{+2} blokajı yüzünden müsait olmadığında P2X reseptörleri dinlenim membran potansiyellerinde post sinaptik yoğunlukta Ca^{+2} un hücre içine girişi için en önemli yolağı sağlayabilir. Gerçekten P2X reseptörlerinin uyarılması bir çok merkezi sinir sistemi nöronlarında sitozolik Ca^{+2} sinyallerini tetikleyebilir ve P2X aracılı presinaptik Ca^{+2} sinyalleri nörotransmitter salınımını düzenleyebilir. Sonunda, P2X7 porunun Ca^{+2} un hücrelere sürekli girişi yoluyla apoptozu tetiklemekteki ilişkisi tekrar tekrar önerilmiştir. Post sinaptik P2X reseptörleri (nikotinik asetilkolin) nACh reseptörleri, GABA-A reseptörleri ve NMDA reseptörlerini içine alan bir kaç iyonotropik reseptörle etkileşime girmektedir, tüm bunlar için bir resiprokal inhibisyon gösterilmiştir. Bu etkileşimlerin mekanizmalarına intrasellüler Ca^{+2} tarafından aracılık edilebilir, Ca^{+2} -ile aktiflenen kinazların fosforilleştiği reseptörler tarafından, yada reseptör molekülleri arasındaki direk etkileşimler tarafından aracılık edilebilir (69).

2.3.4. P2Y reseptörleri

Tüm P2Y reseptörleri yedi transmembran domain topolojisine sahip G-protein kenetli reseptörlerdir (69). İki farklı P2Y alt grubu vardır, birincisi P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, ve P2Y11 alt gruplarını içerirken ikincisi ise P2Y12, P2Y13 ve P2Y14 alt gruplarını içermektedir. Birinci alt grup başlıca fosfolipaz-C/IP3 endoplazmik retikulum Ca^{+2} salınımı yolunu aktiflemek için Gq/G11 kullanır, aksine ikinci alt grup reseptörleri hemen hemen istinasız adenil siklazı inhibe etmek ve iyon kanallarını modüle etmek için Gi/o kullanır. Farklı G-proteinlerine aynı P2Y reseptörlerinin bağlanması da mümkündür, bu farklı aktif reseptör konformasyonlarını içeren agoniste spesifik sinyalleşmenin göstergesidir. Örneğin, ATP tarafından P2Y11 reseptörlerinin aktivasyonu cAMP, IP3 ve sitozolik Ca^{+2} u artırırken aksine UTP tarafından aktivasyonu ise IP3 veya cAMP' i artırmaksızın Ca^{+2} mobilizasyonuna neden olur. Böyle agonist-spesifik sinyalleşme farklı tipteki nükleotitlerin birlikte salındığı durumlarda nöronal veya gliyal cevaba farklı şekillerde kılavuzluk edebilirler. Bazı durumlarda, P2Y reseptörleri (P2Y2 gibi) G-

proteini aracılığı olmaksızın diğer proteinlerle (integrinler gibi) direk etkileşime girebilir. P2Y reseptörleri embriyo merkezi sinir sisteminde çok erken olarak eksprese edilir ve nöron ve gliyalarda yaygın dağılım gösterir. Şu ana kadar sekiz P2Y reseptörü teşhis edilmiştir, bu reseptörler adenin, urasil, şeker nükleotitlere veya hem adenin hem de urasil nükleotitlere (P2Y2 gibi) duyarlıdır. Sisteinil-lökotrienler (Sis-LTE) tarafından aktiflenen ek bir P2Y benzeri urasil-nükleotit-cevap reseptörü de bildirilmiştir. P2Y₁₂, ADP ve Sis-LTE₄ tarafından da hafif bir şekilde aktive edilir, bu nükleotitlere ve Sis-LTE' ye ikili yanıtın bir kaç P2Y veya P2Y benzeri reseptör için ortak bir özellik olabileceğini göstermektedir. P2Y reseptörleri diğer P2Y reseptörleri ile veya diğer transmitter reseptörleri (A₁ adenosin reseptörü gibi) ile homodimerler ve heterodimerler oluşturabilirler. Tirozin kinaz reseptörlerinin (epidermal büyüme faktörü reseptörleri, platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-2 gibi) nükleotitle tetiklenmiş trans-aktivasyonu; çözülebilir tirozin kinazların aktivasyonu; integrinler ile etkileşim veya sinir büyüme faktörü reseptörü ve onların sinyal yolları birer integratif moleküler yollardır (69).

2.3.5. Merkezi sinir sisteminde P2X reseptörü aracılığı ile sinaptik akımlar

P2X reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla aracılık edilen sinaptik akımlar, merkezi sinir sisteminin bir çok bölgesinde bulunmuştur; bunlar arasında medyal habenula, hipokampus, korteks ve spinal kord sayılabilir (69). Medyal habenula hariç ATP içeren terminallerin aktivasyonu sadece P2X reseptörleri tarafından aracılık edilen eksitator post sinaptik akımları uyarmaktadır. ATP aracılı sinaptik cevaplar büyük ölçüde glutamat tarafından aracılık edilen toplam EPSC' nin bir bileşenini temsil eder. P2X aracılı sinaptik akımlar toplam EPSC' lerin sadece % 5-15 ' ini oluşturur. Böylece onların modulator etkisi muhtemelen hiperpolarize membran potansiyellerinde onların yüksek Ca⁺² geçirgenliği ile ilişkilidir. P2X reseptörlerinin aktivasyonu bir kaç beyin devresinde sinaptik plastisitenin düzenlenmesiyle ilişkilendirilmiştir. P2X reseptörlerinin hem uzun süreli potansiyalizasyonu (LTP) hem de uzun süreli depresyonu (LTD) kontrol etmekteki rolü ise tartışmalı kalmıştır. Pozitif etkiye sahip olduğunu bildiren, ayrıca negatif etkiye sahip olduğunu söyleyen yada hiç etkisi olmadığını bildiren farklı araştırma grupları vardır (69).

2.3.6. Nöronal-gliyal ağlardaki haberleşme

Beyindeki bilginin işlenmesi, iki hücreli devrenin(nöronal ve gliyal) sürekli etkileşiminden kaynaklanır (69). Elektriksel olarak uyarılabilen işlemlerle ve sinaptik kontaklar aracılığıyla entegre olan nöronal ağlar gliyal bir sınıfta gömülüdür ve uzun mesafeli iletişim şekli olarak iyonların, ikinci habercilerin ve metabolitlerin hücreler arası difüzyonunu kullanır. Bu alternatif sinyal yollarının (gliyal devreler içinde çalışan) fonksiyonel ve bilişsel önemi büyük oranda bilinmemektedir, beyin normal çalışması için asıl önemli şey olan nöronal ve gliyal ağlar arasındaki koordinasyon daha yeni aydınlanmaktadır. Ayrıca, gliyal hücreler özellikle beyin patolojik reaksiyonlarına yön vermesi açısından özellikle önemlidir, bu pek çok nörolojik hastalığın akıbetini belirler. ATP, nöronal-gliyal ağlarda özel bir role sahiptir ki bu tüm nöro-gliyal ve gliyal/gliyal haberleşme çeşitleriyle ilgilidir. Gerçekten tüm gliya tipleri periferik (Schwann hücreleri) ve merkezi (astrositler, oligodendrositler ve mikroglia) fonksiyonel purinerjik reseptörleri eksprese ederler. Hemen hemen değişmez bir şekilde, gliyal hücreler IP3 aracılı Ca^{+2} sinyali kaskadı ile ilişkili olan P2Y reseptörlerini sentezlerler, P2X reseptörlerinin sentezi ise çok daha fazla ayrıntılıdır. Astroglialarda, fonksiyonel P2X1/5 reseptörleri şimdiye kadar kortekste bulunmuş diğer bölgelerinde ise bulunamamıştır. Optik sinirdeki oligodendrositler P2X7 reseptörleri sentezlerler, aktivasyon devam ettiğinde ise hücre ölümüne neden olabilirler ayrıca bunlar multiple sklerozun patogeneziyle de ilişkili olabilirler. Spinal korttaki mikroglial hücrelerin (P2X4 reseptörlerini sentezlerler) kronik nöropatik ağrıya aracılık ettiği gösterilmiştir. Ayrıca ATP yaygın bir glio-transmitter olarak fonksiyon görür ve ya ekzositoz yoluyla ya da membran kanalları (konnesinler, volümle düzenlenen klor (Cl^-) kanalları, veya P2X7 reseptörleri) yoluyla astrositlerden ATP salınımını düzenler. Astroglialardan salınan ATP, bir çok beyin bölgesinde gliyal sınıfta içindeki ilerleyen Ca^{+2} dalgalarının oluşturulmasında ve devam ettirilmesinde özellikle önemlidir (69).

2.3.7. Plastisite, gelişim ve yenilenme

Purinerjik haberleşmenin her yerde mevcut olması, sinir sisteminin gelişiminde, plastik yeniden yapılanmasında ve yenilenmesindeki çoklu fonksiyonel

rolleri gerçekleştirmek için nükleotitleri önceden belirlemektedir (69). Nükleotitler, kültüre alınmış nöral hücreler üzerinde çoklu trofik etkiler göstermişlerdir. Örneğin, sinir büyüme faktör (NGF) ve P2Y reseptör ko-aktivasyonu öncelikli olarak nöronal yaşayabilirlik ve nörit fazlalığı ile sonuçlanmıştır. Heyecan verici son gelişmelerden biri nörogenezin kontrolünde nükleotitlerin rolünün olmasıdır. ATP'yi hidroliz eden NTPDaz-2 yetişkin nörojenik nişlerin bir işaretini temsil eder. Bu enzim seçici olarak yetişkinde lateral ventriküllerin subventriküler bölgesinde ve hipokampusun dentat girusunda ve ayrıca retinal Müller hücrelerindeki kök hücreler tarafından sentez edilmektedir (69).

Kültüre alınmış yetişkin nöral kök hücrelerinde metabotropik P2Y1 ve P2Y2 reseptörlerinin aktivasyonu, mitojenik büyüme faktörlerinin varlığında projenitör hücre çoğalmasında nükleotit-reseptör ve büyüme faktörü-reseptör aracılı sinerjizmden çıkan sonuçla hücre çoğalmasını güçlendirmiştir (69). Kültüre alınan nörosferler endojen P2 reseptörlerini aktiflemek için yapısal olarak ani boşalmalar tarzında ATP salmışlardır. Hipokampal nörodejenerasyonda nükleotitlerin rolü çok az bilinmesine rağmen hipokampal projenitörler üzerinde fonksiyonel P2X reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. Retinayı da içine alan memeli embriyonik nörogenezinde purinerjik haberleşme yollarının fonksiyonel rolüne dair yeterince kanır vardır. *Xenopus laevis* (Afrika pençeli kurbağası)'da ADP, göz-alan transkripsiyonunda ve gözün gelişiminin tetiklenmesinde önemli bir agonisttir. Bu yol ortadan kaldırıldığında, göz oluşumu ya bozulur ya da tamamen ortadan kalkar. İn vitro ve in vivo deneyler beyin yaralanmasına karşı astrositlerin reaktif cevaplarında nükleotitlerin önemli rolü olduğunu desteklemektedir. Bunlar kemotaktik ve kemo-kinetik hücre göçüne ek olarak ayrıca yıldızlaşma, çoğalma ve artmış gliyal fibrillar asidik protein (GFAP) sentezini içine almaktadır. P2Y4 reseptörleri aracılığıyla, ATP ve UTP astrositlerden trombospondin-1' in sentezi ve salınımını ve ayrıca sinaps oluşumunu içine alan hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimine katılan büyük bir multidomain matriks glikoprotein sentez ve salınımını da tetiklemektedirler.

Bunlara ilave olarak, ATP, gliya-gliya ve akson-gliya etkileşimleri ile ilgili bir Ca^{+2} -bağımlı hücre adezyon molekülü olan N-kaderin'lerin sentezini de uyarır (69). Merkezi sinir sisteminin immün efektör hücreleri olan mikrogliyalar, merkezi sinir sisteminin hemen her hastalığının patogeneziyle ilişkilidir, adenoazin

reseptörlerine ilave olarak çoklu hücrese cevapları (mikroglial çoğalma, hücre hareketi ve göçünün ilerletilmesi) etkileyen bir kaç P2X ve P2Y reseptörünü sentezler. Plasminojen, IL-1 β veya TNF' nin salınımını uyardığı için P2X7 reseptörü özel ilgi odağı olmuştur. Nükleotitle aktiflenen mikroglia, hem hasarlı hücrelerin yok edilmesinde hem de nörodejenerasyonun tamirini kolaylaştıran dokusal bir çevre oluşumunun kontrolünde önemli bir role sahiptir. Nükleotitler ve nükleozitler kültüre alınmış oligodendrosit öncülleri üzerine artmış motilite, proliferasyon ve farklılaşmayı içeren çoklu etki göstermektedirler. Schwann hücrelerinin erken gelişimi ve miyelinizasyonunu düzenlemek için ATP' nin primer öneme sahip olmasına rağmen, elektriksel aksonal aktiviteden sonra adenosin pre-miyelinli öncül hücrelerin miyelinli oligodendrositlere farklılaşmasını güçlendiren primer aktivite-bağımlı sinyal gibi görünmektedir. Aksonlar ve astrositler arasında elektriksel impuls aktivitesi ile karşılıklı haberleşme ve lökemi inhibitör faktör (LIF) tarafından aracılık edilen miyelinizasyon gösterilmiştir. Özellikle LIF, aksiyon potansiyelinin ateşlenmesi ile aksonlardan serbestlenen ATP' ye cevap olarak astrositlerden salınır ve LIF olgun oligodendrositler aracılığı ile miyelinizasyonu güçlendirir (69).

2.3.8. Periferik nörotransmisyon ve nöromodülasyonda nükleotit reseptörler

Her iki tip ATP reseptörü, P2X ve P2Y, periferik sinir sisteminin tüm elemanlarında (nöron gövdelerinde ve terminallerinde, satellit gliya ve Schwann hücrelerinde) bolca sentezlenmektedir (69). mRNA transkriptleri ve immünohistokimya hemen tüm P2X alt birimlerinin sentezlendiğini ortaya çıkarmasına rağmen, periferik duysal sinir hücrelerinde P2X2, P2X3 ve heteromerik P2X2/3 reseptörleri daha baskındır. Sempatik ve parasempatik gangliyonlarda, P2X reseptör alt tipleri hem presinaptik hem de postsinaptik alanlarda sentezlenir, onların hızlı transmisyondaki modülatör rolü çoğunlukla nörotransmitter salınımının düzenlenmesi yoluyla olmaktadır. ATP duyarlılığı, terminaller için ille de sınırlandırılmamıştır, rat vagusunda, sural ve dorsal sinirlerde ATP' ye veya miyelinsiz liflerin adenosinine aksonal uyarılabilirlik artmıştır. Nositif duysal lifler üzerinde P2X ve P2Y reseptörleri mevcuttur ve bunlar ağrı geçişinin modülasyonu ile ilişkilidirler. Ağrının başlaması hakkındaki birleşik purinerjik hipoteze göre üreter, mesane ve bağırsakları içine alan viseral tüplerde ve keselerde

pürinerjik mekanosensör taransdüksiyonun meydana geldiğini ileri sürmektedir, gerilme sırasında epitelyal hücrelerden salınan ATP, subepitelyal duysal sinirler üzerindeki P2X3 homomerik ve P2X2/3 heteromerik reseptörlere etki etmekte ve ayrıca duysal yolaklardan merkezi sinir sistemindeki ağrı merkezlerine doğru impulsları başlatmaktadır. Son zamanlarda bu hipotezi destekleyen kanıtlar ortaya çıkmıştır. Bu bulgular P2X antagonistleriyle ağrı duyusunu azaltmanın mümkün olduğunu ortaya çıkarmıştır. Son gelişmeler A-317491 ve 5-[[4,5-Dimethoxy-2-(methylethyl)phenyl]methyl]-2,4-pyrimidinediamine (RO-3) antagonistlerinin (hem P2X3 ve hem de P2X2/3 ' ü antagonize etmiştir) bulunması ile başlamış ve daha sonra 'in vivo' da oral olarak biyo-yararlılığı ve stabilitesinin değerlendirilmesi ile devam etmiş ve şu anda ise klinik denemeler yapılmaktadır (69).

2.3.9. Merkezi sinir sistemi patolojileri

Birkaç çalışma ekstrasellüler nükleotitlerin yüksek konsantrasyonlarının eşlik ettiği merkezi sinir sisteminin patolojik durumlarını bildirmişlerdir (69). Örnek olarak ise hipoksi, iskemi, travmatik durumlar (kesikli yaralanmalar veya spinal kord yaralanması) ve epilepsi ile ilişkili nöbetler sırasında yüksek frekanslı nöronal aktivasyon verilebilir. İki son 'in vivo' görüntüleme çalışması yaralanma bölgesinden salınan nükleotitlerin önemi ve mekanizmaları üzerine aydınlatıcı bilgiler vermiştir. Bir spinal kord yaralanması modelinde yaralı bölgede ATP salınımı çok düşmüş, bunun ise muhtemelen bozulan hücresel sentezin ve ağır hücresel hasarın bir sonucu olarak ortaya çıktığı yorumu yapılmıştır. Sadece parçalayıcı enzimler tarafından etkili metabolizmanın eksikliği yüzünden değil aynı zamanda hayatta kalan hücrelerden aktif salınımdan dolayı da ATP konsantrasyonu peri-travmatik bölgede önemli derecede artmaktadır. İskemik yada travmatik beyin hasarından sonra hemen astrositler, mikrogliaların hızlı aktivasyonu sonucu ATP salar ve mikrogliaların bu hızlı aktivasyonu yaralanmış doku ile sağlıklı doku arasında bir bariyer oluşturur. Bu bulgular göstermektedir ki immün sistemin işleyişine benzer bir şekilde, akut merkezi sinir sistemi yaralanmasının erken sürecinde aktif olarak salınan ATP, hasara karşı cevapları uyarmak için ve tamir olaylarını başlatmak için yayılabilir bir tehlike sinyali olarak davranmaktadır.

Periferde, inflamasyonun başlangıç fazındaki savunma mekanizmaları esastır ve uygunsuz bir şekilde devam ettiğinde zararlı olabildiği gösterilmiştir (69). Benzer şekilde, nükleotitler merkezi sinir sisteminde uzun süreli yada çok miktarda salındığında toksik olurlar ve nörodejenerasyona katkıda bulunurlar. Bu şartlar altında, P2 reseptörleri ATP dalgasını ve inflamasyonu yaymak için bir amplifikasyon cihazı olarak görev yaparlar. Hem P2X ve hem de P2Y reseptörleri bu olaylarla ilgilidir. P2X2, P2X4 ve P2X7 reseptörleri hem invivo ve hem de invitro iskemi modellerindeki nöronlar ve gliya hücrelerinde up-regülasyona uğrarlar. P2X7 reseptörleri makrofajlardan veya mikrogliyalardan IL-1' in salınımı ve parçalanmasını düzenleyebilir, böylece nöroinflamasyona katkıda bulunur. Ayrıca hücre ölümünde P2X7' nin açıkca rolü olduğu kanıtlanmıştır. Sıçanlardaki lokal iskemiden sonra peri-infark alandaki P2Y1 reseptörlerinin artmış ekspresyonu da bildirilmiştir. Ayrıca yeni olası P2Y G-protein kenetli reseptör (GPR17)' nin farmakolojik ajanlarla veya anti-sens oligonükleotitler ile invivo olarak çıkarılması iskemik hasarı önemli ölçüde azaltmıştır. Sinir sisteminde ATP' nin fizyolojik görevlerinin bir özeti tablo 2.5' te gösterilmiştir.

Tablo 2.5. Sinir sisteminde ATP' nin bazı önemli görevleri. Abbracchio ve ark. (69)' ndan alınmıştır.

ATP' nin Sinir Sistemindeki Önemli Fizyolojik Görevleri
Periferik sinir sisteminde, ATP düz kaslar için eksitator yada inhibitör bir nörotransmitter olarak fonksiyon görür.
Merkezi sinir sisteminde ATP genellikle eksitator post sinaptik akımın bir fraksiyonuna katkıda bulunarak eksitator sinaptik akımlara aracılık eder.
ATP çeşitli nörotransmitterler ile bir ko-transmitter olarak ve sıklıkla adenozeine yıkıldıktan sonra önemli bir kavşak öncesi ve kavşak sonrası modulator olarak işlev görür.
ATP zararlı olabilecek etkiler için sinir dokusunu uyaran bir tehlike sinyali olarak görev yapar.
Mikroglial çoğalmanın ve göçün kontrolü ve mikroliozisin tetiklenmesinde ve inflamatuvar mediyatörlerin salgılanmasında, ayrıca immünmodulasyonda ve immünsupresyonda önemli bir role sahiptir.
ATP, astrositlerin yıldızlaşma, göç ve proliferasyonu ile astroliozisi ve doku yeniden yapılanmasını uyarır.
ATP ve adenozein nöron korunmasına katkıda bulunurlar.
ATP, duysal ağrının algılanmasında ve mikroglial aktivasyonu içeren nöropatik ağrı durumlarında önemli bir göreve sahiptir.
Purinerjik mekano-sensör transdüksiyon visral ağrının altında yatan bir mekanizmadır.
ATP ve muhtemelen diğer nükleotidler nöral kök hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını içeren nörojenerasyonda önemli bir görev yapar.
ATP dildeki duysal algılamada bir transmitterdir ve diğer duysal organlar olan göz, iç kulak ve koku duyusunun fonksiyonunda önemli bir görev yapar.
Astrositler arasında ATP önemli bir gliotransmitter ve Ca^{+2} dalgalarının modulatorüdür ayrıca, karşılıklı nöron-gliya haberleşmesi ile ilgilidir.

P2 reseptörlerinin disregülasyonu da kronik nöro-inflamatuvar hastalıklara katkıda bulunabilir (69). ATP, β -amiloid peptid ile tetiklenmiş toksisiteye nöronal yatkınlığı (savunmasızlığı) artırmaktadır ve Alzheimer hastalığının fare modelinde P2X7 reseptörleri sepesifik olarak β -amiloid plakları etrafında up-regüle olmaktadır. Alzheimer hastalarının beyin dokusunda nörofibriler düğümlerde ve beyin dokusundaki nöritik plaklarda P2Y1 reseptörlerinde değişiklikler olduğu tanımlanmıştır.

P2X7 reseptörlerinin artmış ekspresyonu multiple skleroz lezyonlarındaki reaktif astrositlerde de gözlenmiştir ve P2X7 reseptörlerinin aktivasyonu ve oligodendrositlerin ölümü arasında nedensel bir bağlantı kurulmuştur.

Tüm bu bulgular ışığında P2 reseptör antagonistleri faydalı gibi gözükmemektedir ve bir kaç akut ve kronik nörodejenerasyon modellerinde nöronal hasarı azaltmak için kullanılmışlardır (69). Nörodejeneratif etkilerden sonra P2 reseptörlerinin aktivasyonu, nörotrofik moleküllerin ve faydalı sitokinlerin salınımını, nöritogenezis ve diğer tamir edici olayların aktivasyonunu içeren nöroprotektif etkiler de göstermektedir. Son zamanlardaki bir hipoteze göre, nükleotitle tetiklenmiş etkiler nöronları korumak ve yaralanma sonrası tamiri kolaylaştırmak için zaman ve bölgeye spesifik savunma mekanizması olarak meydana gelmektedir. Kronik inflamasyon durumunda bu mekanizmaların disregülasyonu bu reaksiyonu, beyin hasarı ve fonksiyonel kayıpla sonuçlanan yıkıcı ve kontrol edilemeyen olaylar zincirine dönüştürebilir. Sonuç olarak reseptör polimorfizmlerinin analizinin ortaya çıkardığı gibi psikiyatrik hastalıkla da ilişkisi olup P2X7 reseptör geninin (P2RX7) major depresyon hastalığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (69).

2.3.10. Periferik patolojiler

Purinerjik yollar periferik sinir sisteminin fonksiyon bozukluğu ile ilişkili sayısız patolojiye katılmaktadır (69). Örnek olarak ATP aracılı etkiler sempatik sinir aktivitesini güçlendirici görev yapar, bunun sonucunda ise kardiyak fonksiyon bozukluğuna, aritmi, hipertansiyon, kalp yetmezliği, miyokardiyal iskemide ani kardiyak ölüme neden olur. Ancak ATP hızlı etki eden hipotansif bir ajandır ve uygun bir şekilde Sodyum-nitroprusid (hipotansif bir ilaç) ile karşılaştırıldığında ATP-MgCl₂ pulmoner hipertansiyonlu çocuklarda güvenli, etkili ve tercih edilen bir pulmoner vazodilatördür. Periferik ko-transmisyonun purinerjik bileşeni intersistiyel sistizis, idiyopatik detrusör instabilitesi ve bazı nörojenik mesane tipleri gibi ürogenital patolojilerde önemli ölçüde (% 40 ' a kadar) artar.

Purinerjik iletim erkek infertilitesinde önemli bir göreve sahip olabilir, P2X1 reseptörleri eksik nakavt fare normal gibi gözükmemekte ancak üremede başarısızdır ve bu vas deferanstaki sempatik ko-transmisyonun purinerjik bileşeninin kaybı ile

ilişkilidir (69). Vagal afferent purinerjik haberleşme astım ve kronik obstruktif akciğer hastalıkları ile ilişkili olabilir.

Sinir sisteminin romatoid artrit patofizyolojisine katılabileceği daha önceleri fark edilmiştir ve romatik hastalıklarda purinerjik haberleşmenin bir görevi olduğu düşünülmektedir (69). ATP' ye güçlü bir şekilde bağlanabilen bir ilaç olan Quinacrine, romatoid artritli hastaların tedavisi için yıllarca kullanılmıştır. Artrit hastalığında merkezi sinir sistemini hedefleyen tıbbi stratejilerin faydalı olabileceği görüşünü destekleyen bir çalışmada adjuvanla tetiklenmiş sıçan artrit modelinde spinal P1 reseptör aktivasyonunun, inflamasyonu ve eklem yıkımını inhibe ettiği iddia edilmiştir.

2.4. ATP P2X3 reseptörleri ve nöronal duyarlılaşma

Nöronal fonksiyonun modülasyonunda ekstrasellüler ATP' nin önemi gittikçe artan sayıda kanıtlarla desteklenmektedir (124). Özellikle ATP salınımının hassas kontrolü, seçiciliği ve farklı ATP reseptör işlevi, periferik ve merkezi sinir sisteminde nöron ve non-nöronal hücreler arasındaki karşılıklı haberleşmenin çok önemli elemanlarıdır. Periferik nöronlarda ATP sinyalleşmesi nöronal duyarlılaşmaya önemli katkıda bulunur (özellikle nöropatik ağrıda). Diğer alt tipleri arasında ATP' nin duysal nöronlar üzerinde ekspresse edilen P2X3 reseptörleri, ekstrasellüler ATP' nin nanomolar konsantrasyonlarına dahi duyarlıdır ve böylece ağrı stimulusunun önemli dönüştürücüleridir. P2X3 reseptör fonksiyonu nöropeptitler ve nörotrofinler gibi çözülebilir faktörlere yüksek derecede duyarlıdır ve transdüksiyon mekanizmaları, protein-protein etkileşimleri ve farklı membran bölümlenmeleri tarafından kontrol edilir. Son zamanlardaki çalışmalara göre, P2X3 reseptörleri sinaptik yapı proteini kalsiyum/kalmodulin bağımlı serin protein kinaz (CASK) ile duruma bağlı bir şekilde etkileşime girmektedir. P2X3 reseptörlerinin stabilitesinde ve etkinliğinde CASK çok önemli bir rol oynamaktadır. CASK/P2X3 kompleksi içindeki P2X3 reseptörlerinin aktivasyonu, nöronal plastisite ve olası nörotransmitter ve nöromodulatorlerin salınımı için önemli sonuçlara sahiptir. P2X3 reseptörlerinin interaktom (bir hücredeki moleküler etkileşimlerin tümü) mekanizmasının ve nöronal yüzey membranları üzerindeki diğer reseptörler ve kanallarla integrasyonunun daha iyi anlaşılması ve nöronal duyarlılaşma prosesinin

ve ilgili anormal ağrı sinyalinin açıklığa kavuşturulabilmesi için önemli olduğu önerilmektedir.

2.4.1. ATP (duyarlılaşmanın kimyasal bir tetikleyicisi)

Duyarlılaşma primer duysal nöron afferentleri ve ekstrasellüler nosiseptif uyarıya aşırı cevap verir hale gelen merkezi sinapslar vasıtasıyla gerçekleşen bir olaydır, bunlar allodoni, hiperaljezi ve spontan ağrıyı içine alan nöropatik ve kronik ağrının temelini oluştururlar (124). Periferik ve merkezi duyarlılaşmanın primer afferentlerden spinal sinapslara nörotransmitterler ve peptitlerin güçlü salınımı (ATP ile birlikte ko-salınım) aracılığı ile desteklendiği düşünülmektedir. Postsinaptik dorsal kök nöronlarında ilgili reseptörlerin aktivasyonu merkezi duyarlılaşmayı tetiklemektedir. Hızlı iletim yapan miyelinli Aδ lifleri ve yavaş ileten miyelinsiz C lifleri farklı uyarılara duyarlıdır (özellikle mekaniksel/kimyasal ve dokunma uyarıları). Nöropatik ağrıda spontan ateşlemenin oluşturulması için A veya C liflerinin daha önemli olup olmadığı cevapsız bir soru olarak kalmıştır. Gangliyon seviyesindeki karşılıklı haberleşme sürekli allodoni' yi kuvvetlendirmek için non-nosiseptif nöronlarda fonksiyonel plastisiteyi tetikleyebilir. Ağrılı nöropatilerden etkilenen insan denekler üzerinde infrared diot lazer stimülasyon ile gerçekleştirilen deneyler, ağrı durumlarının Aδ liflerinin bozulmuş fonksiyonları ile ilişkili olduğunu ve miyelinsiz C liflerinin ise çok daha az ilişkili olduğunu göstermiştir (125), kemirgenlerde ise durum bunun tam tersidir. Bununla birlikte ağrının nöral substratlarında türe-bağımlı farklılık (P2X3 reseptör dizisi son zamanlarda bulundu) analog mediyatör ve modülatörler üzerine temellenen benzer kemo-transdüksiyon mekanizmalarını dışlamamaktadır. Akut duyarlılaşmadan uzun süreli hipersensitiviteye geçişlerin moleküler temeli, kompleks temporal ve spasyal moleküler mekanizmalara dayanmaktadır. Gen ekspresyonu ve protein trafiği, ağrı reseptörü ekspresyonunun değişmesi için büyük oranda katkıda bulunmaktadır ve presinaptik terminalde anormal nörotransmitter salınımını ateşleyerek disfonksiyonel etkiye destek olmaktadır, böylece spinal ve beyin sapı ağrılarının merkezi duyarlılaşmasını tetiklemektedir.

Ağrı ile ilişkili çeşitli hastalıklarda, lif duyarlılaşması ve spontan anormal ateşlemenin erken moleküler sinyalinin sorumlu çözülebilir ve hücrel faktörler arasında güçlü bir aday molekül ekstrasellüler ATP' dir, ATP diğer nörotransmitter ve peptitler ile beraber yada mekanik stresten sonra bir çok farklı mekanizmayla salınır (124). ATP' nin akut enjeksiyonu sağlıklı insan cildinde mekano-sensitif yada mekano-duyarsız C-liflerinin ilişkisi olmaksızın C-nosiseptörlerini aktive etmiştir. ATP ligand kapılı P2X kanallarına yada metabotropik P2Y reseptörlerinin farklı alt tiplerine bağlanır ve ekstrasellüler boşluktaki reaktif moleküllerin spektrumunu yükseltir. Farklı dokularda farklı hücre tiplerindeki ATP için farklı affiniteye sahip ATP reseptörlerinin kombinasyonel ekspresyonu purinerjik haberleşmenin modülasyonuna izin verir. Primer duysal nöronlar nanomolar ATP konsantrasyonlarına duyarlı olan P2X3 reseptörlerini büyük ölçüde eksprese ederler ve P2X3 nakavt fareler kullanılarak gösterildiği gibi ağrı duyarlılığının modülasyonu ile ilişkilidirler. Son farmakolojik araştırmalar, P2X3 reseptörlerini bloke etme yeteneğinde yeni ilaçlar keşfetmeye yönelmiştir çünkü bu reseptörlerin farmakolojik blokajı inflamatuvar ve nöropatik ağrıyı azaltmada önemli bir katkı sağlayabilir. Buna rağmen P2X3' e spesifik sadece bir kaç antagonist üretilenmiştir ve şu anda klinik denemeleri yapılmaktadır. Duysal nöronlar tarafından eksprese edilen voltaj kapılı iyon kanallarının aktivitesindeki değişikliklerin, kronik ağrının duyarlılaşmasına katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir. Farklı plastisite prosesleri (henüz bilinmiyor) yoluyla çalışan ATP, eni sonunda tüm dokuda nöronal ve nöronal olmayan hücrelere yeni uyumsuz aktivite kazandırabilir (124).

2.4.2. Nörojenik inflamasyon ve nöronal duyarlılaşmada P2X3 reseptörlerinin rolü

İnflamatuvar mediyatörler, nörisseptörler ve ATP-reseptörlerini içeren iyon kanallarının nöronal ekspresyonunu etkilerler (124). Böylece duysal liflerin spontan aktivitesine katkıda bulunur ve kötü bir patolojik aşırı yanıtla sonuçlanır. Nöronal/nöronal olmayan hücre iletişimi, nöronal ATP ve onun etkisi ile sadece ATP reseptörleri üzerinde değil aynı zamanda inflamatuvar cevaba güçlü bir katkı sağlayan düşük affiniteli ATP reseptörleri (P2X4 veya P2X7) üzerinde de önemli ölçüde modüle edilir. Nöropatik ağrının inflamatuvar bileşenleri nöronal ve nöronal

olmayan hücreler üzerindeki toll-like reseptörlerin (TLR) aktivasyonunu sahiptir. Bakteri duvarı bileşeni olan lipopolisakkarit (LPS) ile TLR' nin deneysel olarak uyarılması, desensitizasyondan hızlı bir şekilde kurtulan P2X3 reseptör fonksiyonunun up-regülasyonunu önemli derecede güçlendirir. Bu uygulama ATP ve TNF- α ' nin salınımını kolaylaştırır. Bu bilgiler, duysal gangliyon kültüründe nöro-inflamatuvar profilin gelişiminin, endojen mediyatörlerin (ATP ve sitokinleri içeren) salınımını kolaylaştırdığını önermektedir. Benzer purinerjik sinyalleşme muhtemelen merkezi sinapta meydana gelmektedir, burada ATP' nin blokajı kronik ağrı duyarlılaşmasıyla ilgili mikrogliya aracılı inflamatuvar cevapları sınırlandırmak için olası törapatik hedefi temsil edebilir. Gangliyon içinde de ATP aracılı haberleşmenin olma ihtimali son zamanlarda önerilmiştir ki bu kronik ağrı esnasında adaptasyon mekanizmalarında stellat gliyal hücrelerinin esas rolü olduğunu desteklemektedir (124).

2.4.3. Hücre içi sinyalleşme P2X3 reseptör up-regülasyonu yoluyla duyarlılaşmayı tetiklemektedir

P2X3 reseptörlerinin büyük bir özelliği, ekstrasellüler ortamdaki değişikliklere reseptör yeniden dağılımı, trafiği ve fosforilasyonu yoluyla hızlı bir şekilde adapte olma yeteneğinde olmalarıdır (124). Trigeminal duysal nöronların P2X3 reseptörleri kinazlar ve fosfatazlar arasındaki ince bir dengeyle sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Sinir büyüme faktörü (NGF) farede spontan ağrıya neden olan nosiseptif sonlanmaları ve P2X3 eksprese eden nosiseptörleri direk olarak duyarlılaştırmaya yeterlidir. Manipüle edilen NGF seviyeleri intranöronal sinyal yollarını değiştirerek ATP-aracılı cevaplar üzerine major bir etki oluşturur. Protein kinaz-C veya kalsiyum/kalmodülin bağlı protein kinaz (CAMK) II aktivasyonunun farmakolojik blokajı NGF ile indüklenmiş duyarlılaşmayı önler. Dorsal kök nöronlarında cAMP cevap elementi bağlanma proteini-aracılı gen ekspresyonu, ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz blokerleri ve PKA, protein kinaz-C (PKC) ve CAMK inhibitörleri tarafından baskılanan periferik ve merkezi duyarlılaşmayı oluşturur. Merkezi seviyede, presinaptik Ca/kalmodulin bağımlı serin protein kinaz/ P2X3 fonksiyonel etkileşimi spinal dorsal kökte sinaptik dayanıklılığı düzenlediği

düşünülmektedir, bu da kronik ağrıda lif duyarlılığının kilit modülatörleri olarak P2X3 reseptörlerine olan ilgiyi güçlendirmektedir.

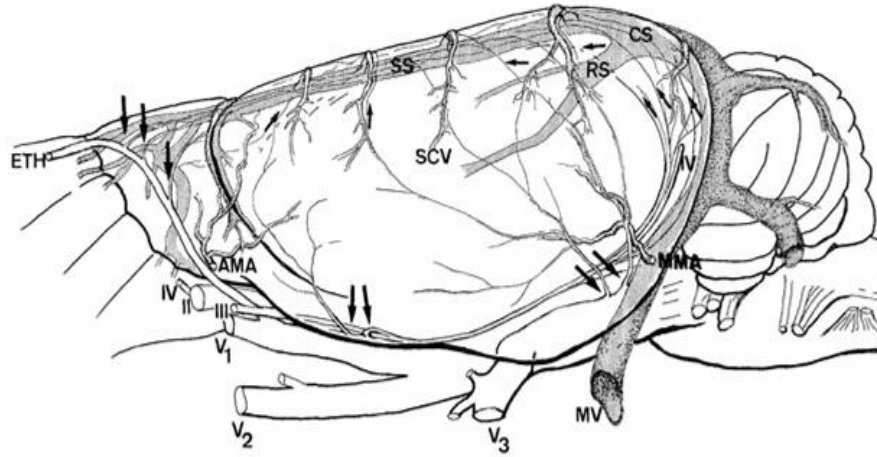
2.5. Dura Mater ve Migren

Migren patogenezinde önemli bir yapı olarak dura matere olan güncel ilgi, dura mater' in mekanik olarak uyarılmasının baş ağrısına neden olduğu gözlemleri ile yaklaşık 60 yıl önce ortaya çıkmıştır (126). Nörojenik inflamasyon ve migren arasındaki ilişki ilk defa Dalessio (18) tarafından önerilmiştir (1974) ve migrende dura materin rol oynayabileceği Moskowitz ve ark. (34)' nın çalışmalarıyla büyük oranda desteklenmiştir, bu çalışmada migren ağrısının dura mater' deki Nİ ve vazodilatasyon ile ilişkili olduğu önerilmiştir. Vasküler bileşen olarak meningeal arterleri içeren tanımlamayla trigeminovasküler sistem açıklaması bu görüşe daha fazla destek vermiş ve migren kaskadının periferik bileşeni araştırmıştır ve sonra hemen hemen sadece ekstraserebral intrakraniyal yapıların duyarlılaşması üzerine yoğunlaşmıştır, özellikle de dura mater ve dura materin arteriyel damar ağı üzerinde yoğunlaşma olmuştur. İnsanlarda dural arterlerin direk olarak uyarılması ağrılı ve migren ağrısına benzer şekilde sefalik lokasyonları kapsayan baş ağrısı benzeri hislere neden olmaktadır. Dura mater ve kan damarlarından kaynaklanan migren baş ağrısı görüşü öncelikle bu bulgulara dayanmaktadır. İnsanlarda dura mater' in mekanik ve kimyasal olarak uyarılması meningeal trigeminal duysal lifleri aktive etmekte ve baş ağrısına neden olmaktadır. Laboratuvar hayvanlarında trigeminal gangliyonundaki nöronlar dura mater' in noktasal dokunulmasına, masaj yapılmasına, çekiştirilmesine, ısıtılmasına ve soğutulmasına veya hipertonic tuzlu çözelti uygulanmasına cevap vermektedirler. Dural afferent nöronların bu cevap özellikleri, onların gerçekten noziseptör olduklarını ve bu nedenle de artmış intrakraniyal basınç veya menenjit gibi patolojik şartlar altında aktive olma yeteneğinde olduklarını göstermektedir (126).

2.5.1. Dura mater' in nöroanatomi

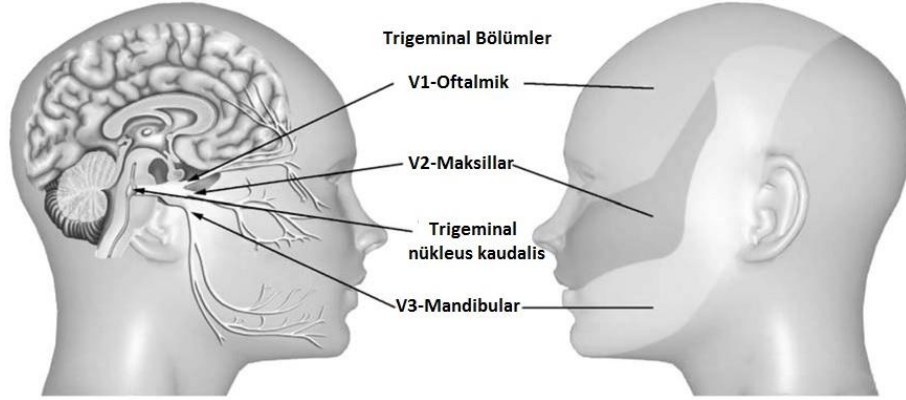
Dura mater' den trigeminal subnukleus kaudalise duysal innervasyonun yolağı, trigeminal sinir ve trigeminal gangliyon aracılığı ile olmaktadır (126,127). Laboratuvar hayvanlarında yapılan anatomik çalışmalar, dura mater ve meningeal

arterlerin trigeminal nosiseptif nöronlar tarafından innerve edildiğini göstermiştir (şekil 2.7) bu trigeminal nosiseptif nöronların çoğu diğer dokuları innerve eden nosiseptif nöronlarda bulunanlara benzer nöropeptitler içerir (126). Fakat, dura mater ve dural kan damarları nosiseptif innervasyonlarını trigeminal nöronlardan almalarına rağmen trigeminal sinirin sadece küçük bir bölümü meninkslere duysal innervasyon sağlamaktadır.



Şekil 2.7. Rat dura mater encephali' nin innervasyonu ve kan damarları. Andres ve ark. (128)' ndan alınmıştır. Oftalmik sinir (V1), maksillar sinir (V2), mandibular sinir (V3), etmoidal sinir (ETH), optik sinir (II), okulomotor sinir (III), troklear sinir (IV), anterior meningeal arter (AMA), middle meningeal arter (MMA), sagittal sinüs (SS), rektus sinüs (RS), sinüslerin kesişim noktası (CS), süperior serebral ven (SCV), iç maksillar ven (MV).

Trigeminal sinirin ana dalları ekstrakranyal dokuların somato-duysal innervasyonunu sağlar. Meninkslerden gelen trigeminal nosiseptif afferentler başlıca spinal trigeminal nükleus' un medullar dorsal kökü içindeki nöronların üstüne doğru uzanırlar. Bununla birlikte medullar dorsal kökü içindeki nöronların önemli bir özelliği ise orada kranyal kasları içine alan farklı afferent girdilerin geniş konvergensi olmasıdır. Geniş dinamik kapsamın önemli bir bölümü ve trigeminal subnükleus kaudalis içindeki nosiseptif-spesifik nöronlar çene kaslarından, temporo-mandibular eklemlerden ve boyun kaslarından gelen afferent girişlere sahiptir. Bu nöronlar genellikle kutanöz afferentleri içine alan mekanoreseptif alanlarda da yerleşiktirler (126). Baş ve yüzün duysal innervasyonunu sağlayan trigeminal sinir bölümleri ve dermatomlar şekil 2.8' de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Trigeminal sinir bölümleri ve dermatomlar. Schreiber (129)' den alınmıştır.

Trigeminal sinir tarafından innerve edilen dura mater basitçe şunu göstermektedir; trigeminal sinir, nosiseptif impulsları dura mater' den trigeminal subnükleus kaudalis' e iletme yeteneğindedir (126). Migrende sitokin seviyelerinde artış olduğuna dair kanıtlar vardır ve bunun migren esnasında muhtemel bir meningeal inflamatuvar olayın meydana gelmesine katkıda bulunduğu iddia edilmiştir. Migren ağrısının, dural Nİ ve dural kan damarlarının dilatasyonu sonucu oluştuğunu iddia eden teori, ilk kez Moskowitz ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. Teori, Nİ' ye neden olan nöropeptitlerin dural kan damarlarını innerve eden duysal afferentlerden salındığını önermişti. Önerilen mekanizmaya göre meningeal kan damarlarını innerve eden trigeminal duysal C-liflerinin depolarizasyonu nöropeptitlerin salınımı ile sonuçlanmaktadır, bu nöropeptitler kan damarlarının duvarları ile etkileşime girmekte ve dilatasyona, plazma protein sızmasına ayrıca mast hücrelerinin aktivasyonu ve degranülasyonuna neden olmaktadır. Çalışmalar gerçekten de, meningeal duysal liflerin meninkslerdeki periferik sonlarından nöropeptitlerin salınımı için uyarılabildiğini gösterdi ve bu dural plazma protein ekstrasvazasyonu ve dural vazodilatasyon ile sonuçlanmaktaydı.

2.6. Mast Hücre Biyolojisinde P2 Reseptör-Aracılı Haberleşme

ATP ve diğer nükleotitler hücrelerin sitoplazmalarında yüksek konsantrasyonda bulunur ve uyarıldıklarında aktif olarak salınırlar yada yaralanmış veya ölü hücrelerden pasif olarak sızarlar (40). Nükleotitlerin ekstrasellüler seviyesi farklı hücrelerin yüzeyleri üzerinde eksprese edilen ekto-nükleotidazlar tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Sağlıklı dokularda düşük olan ekstrasellüler nükleotitlerin konsantrasyonu hasarlı organlarda artabilir ve P2 purinoseptör eksprese eden çevredeki hücreler tarafından algılanabilir. Yaklaşık otuz yıl önce mast hücre degranülasyonunu tetikleyen faktörler arasında ATP' nin de olduğu tespit edilmişti. Böylece mast hücreleri üzerinde ATP için spesifik bir reseptörün var olduğu önerilmişti. Yıllar sonra P2Y ve P2X purinergic reseptörleri klonlandı ve karakterize edildi. Mast hücreleri ATP' nin hem müthiş bir kaynağıdır hem de onların sekreatuar granüllerinde depolanmaktadır ve mast hücreleri uyarıldığında salınmaktadır. Diğer taraftan mast hücreleri, mast hücre degranülasyonunu, sitokin sekresyonunu, kemotaksisi ve apoptotik hücre ölümünü tetikleyen çeşitli purinoseptörleri de sentezlerler. Mast hücreleri ilk defa Paul Ehrlich tarafından onun tez konusu olan mast hücrelerinin kendilerine özgü boyanma özellikleri ve büyük granülleri hakkındaki doktora tezinde tanımlanmıştı (37). Mast hücreleri CD34⁺ hemopoietik progenitör hücrelerden köken almaktadır. Mast hücreleri, dokulara yerleşmeden önce ve lokal doku mikroçevresel faktörler altında son efektör özelliklerini kazanmadan önce kan dolaşımına geçerler. Yetişkin mast hücreleri yüksek oranda c-Kit (kök hücre faktörü için reseptör) ve FcεRI (yüksek affiniteli immün globülin-E (IgE) reseptörü) ekspre eden büyük granüler hücreler olarak dokularda kolaylıkla teşhis edilebilirler. Mast hücre progenitörlerinin büyümesi, ilgili dokuya yerleşmesi ve olgunlaşması bir çok sitokin tarafından etkilenir ki bunların en önemlileri koloni stimüle edici aktör (CSF) ve IL-3 tür. Mukozal mast hücreleri solunum ve gastrointestinal yol mukozasında yerleşiktir. Bağ doku mast hücreleri, ciltte, akciğerde bağ dokuda, gastrointestinal yolun submukozasında bulunur. Bu iki alt grubun granül içeriğinde farklılık vardır ve fonksiyonel açıdan da farklılıklara sahiptirler. Mast hücreleri stratejik olarak epitelya, düz kas hücreleri, kan damarları ve sinirlerin yakınında yerleşmişlerdir, buralarda mast hücreleri allerjen ve patojenlere karşı savunmanın ilk yolu olarak fonksiyonlarını gerçekleştirirler.

Aktivasyonu takiben, mast hücreleri sekreatuar granüllerinden sayısız mediyatör salarlar, bunlardan bazıları; tümör nekroz faktör- α (TNF α), IL-4, granülosit/makrofaj-koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), histamin, heparin, serotonin, kininler ve proteazlardır (triptaz ve kimaz ailelerinin üyeleri). Mast hücreleri uyarıldığında bir dizi sitokinleri (IL-1' den IL-8' e ve IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, ve IL-21) ve kemokinleri (makrofaj inflamatuvar protein MIP-1 α ; monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) yeniden sentezler ve salgırlar ve normal T-hücrelerinin aktivasyonu üzerine düzenleyici etki gösterirler. Mast hücre aktivasyonunda Fc ϵ RI 'nin fonksiyonu iyi tanımlanmış olmasına rağmen çeşitli diğer agonistler de mast hücrelerini aktive edebilirler. Bu agonistler arasında, kompleman faktörleri (C5a gibi), lipid mediyatörler (prostaglandinler, lökotrienler), nöropeptitler (SP, nörotensin gibi) hormonlar (somotastatin gibi), sitokinler, kemokinler, mikrobiyal ürünler (LPS veya peptidoglikan gibi) ve ayrıca ekstrasellüler nükleotidler. Mast hücreleri allerjik inflamatuvar reaksiyonların anahtar bileşenleri olarak bilinirler, fakat onlar bir çok kronik inflamatuvar hastalıkların patogenezi, yara iyileşmesi, fibrozis, trombozis/fibrinolizis ve doğal bağışıklık ile de ilişkilidirler. Mast hücreleri, fizyolojik şartlar altında dokulardaki sayılarını kısmen sabit tutarlar ve bu yüzden uzun yaşayan hücreler olarak tanımlanırlar. Bu hem kemik iliğinden mast hücre öncüllerinin üretim hızına hem de dokulardaki olgun mast hücrelerinin hayatta kalma uzunluğuna bağlıdır. Akut allerjik reaksiyonlardaki esas rolü düşünüldüğünde mast hücrelerinin sayısının hücre çoğalması, gelişimi ve ölümü arasındaki bir denge tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerekmektedir.

2.6.1. Mast hücreleri üzerindeki P2 reseptörlerinin ekspresyonu

Farklı P2 reseptör agonist ve antagonistlerinin kullanıldığı deneyler açık bir şekilde mast hücrelerinde çeşitli purinoseptör alt tiplerinin olduğunu önermesine rağmen sadece bir kaç çalışma P2 reseptör ekspresyonunu mRNA ve protein seviyesinde araştırmıştır (40). Bulanova ve Bulfone-Paus C57BL/6 fareden elde edilen BM mast hücreleri P2X1-4, P2X6-7 ve P2Y2 hariç tüm P2Y reseptörleri mRNA' larını sentezlerken P815 mastositoma hücreleri tüm P2X ve P2Y reseptörleri mRNA' larını sentezlediklerini göstermiştir. B6XA/JF1 faresinin fetal karaciğerinden

elde edilen MC/9 hücreleri P2X1–2, P2X4, P2X6–7, P2Y6, P2Y13, ve P2Y14 reseptörlerini ekspresse etmektedirler. P815 ve MC/9 hücreleri üzerinde P2X7 reseptör proteini ekspresyonu immün blot analizi ve floresanla aktive hücre ayırıcı (FACS) ile gösterilmiştir. P2X3 reseptör ekspresyonu immün blot tarafından doğrulanırken P2X1 reseptör ekspresyonu FACS tarafından doğrulanmıştır. İlginç bir şekilde, kemik iliği mononükleer hücreleri (BMMCs) yüzeylerinde mRNA transkripti olmasına rağmen P2X4 reseptörü ekspresse etmezler ki bu FACS analizi ve immün blot analizi ile gösterilmiştir. Bu durum şu son bulgular ile açıklanabilir: P2X4 reseptörü non-kanonikal tirozin temelli ayırım motifi içerir bu motif endositoz oluşturulmasına ve P2X4 reseptörünün yeniden döngüye girmesine yol açar. P2 reseptörlerin ekspresyonu farklı kaynaklardan ve CD34⁺ progenitör hücrelerden elde edilen insan mast hücrelerinde de mRNA seviyesinde analiz edilmiştir. Son çalışmalar insan CD34⁺ progenitör hücrelerin bir kaç P2 reseptörü eksprese ettiklerini göstermiştir (P2X1, P2X4, P2Y1, P2Y2, and P2Y11–13). Özellikle P2X1 ve P2X4 reseptörlerinin ekspresyonu P2X7 ekspresyonundan önemli derecede daha yüksektir. İnsan akciğer mast hücreleri (HLMCs) P2X1, P2X4, P2Y1, P2Y2 mRNA transkriptlerini ekspresse ederler fakat P2X7 mRNA transkriptlerini ekspresse etmezler. Aksine, insan mast hücre hattı HMC-1 P2X7' i yüksek derecede ekspresse eder. İnsan spinal kord kan mast hücreleri (CBMCs) P2X1, P2X4 ve ayrıca P2Y1, P2Y2, P2Y11, P2Y12 ve P2Y13 reseptörlerinin mRNA' sını ekspresse ederler. CBMCs üzerinde P2X7 reseptörü sadece çapraz-bağlı IgE ile yada deksametazon stimülasyonu ile uyarıldığında ekspresse edilir. İnsan cildinden izole edilen mast hücreleri P2X1 ekspresse ederler ve sadece marjinal P2X4 reseptör ekspresyonu gösterirler. Ayrıca mast hücreleri bir anatomik bölgeden diğer bir anatomik bölgeye transferlerini takiben (ex vivo izolasyon ve in vitro kültürde) fenotiplerini değiştirirler. Mast hücre farklılaşması için mikro çevrenin önemi ve bu hücreler tarafından P2 reseptör ekspresyonundaki farklılıklar ile açıklanabilir. İn vitro'da kültüre alınan hücreler (HMC-1 ve aktif CBMC) P2X7 reseptörünü büyük oranda ekspresse ederken akciğer ve deriden izole edilen insan primer mast hücreleri P2X7 ekspresse etmezler. Rat bazofilik lökemi hücre hattı (RBL-2H3)' nın P2X ve P2Y reseptör ekspresyon profili yada primer rat mast hücreleri detaylı olarak analiz edilmemiştir. RBL-2H3 ve rat peritoneal mast hücreleri gerçekten fonksiyonel P2Y,

P2X1, ve P2X7 reseptörleri eksprese ederler. Böylece, farklı tür ve kaynaklardan elde edilen mast hücreleri ekstrasellüler ATP ve diğer nükleotitlerle uyarıldığında cevap olarak heterojen etkiler oluşturan farklı P2X ve P2Y reseptörlerini eksprese ederler. Tablo 2.6' da mast hücrelerinin sentezlediği P2 reseptör alttipleri sunulmuştur.

Tablo 2.6. Mast hücrelerinin sentezlediği P2 reseptör alttipleri. Bulanova ve Bulfone-Paus (40)' dan alınmıştır.

Mast Hücresi Tipi	Reseptörler	Reseptörleri Belirlemek İçin Kullanılan Metot
İnsan		
CBMC	P2X1, P2X4, P2X7, P2Y1, P2Y2, P2Y11, P2Y12, P2Y13	Gene Chip array, RT-PCR
HLMC	P2X1, P2X4, P2Y1, P2Y2	Gene Chip array, RT-PCR
HMC-1 cell line	P2X7	RT-PCR
Cilt mast hücreleri	P2X1, P2X4	Gene Chip array
CD34+ projenitörler	P2X1, P2X4, P2Y1, P2Y2, P2Y11, P2Y12, P2Y13	RT-qPCR
Fare		
BMMC	P2X1-4, P2X6, P2X7, P2Y1, P2Y6, P2Y12-14	RT-PCR, IB, FACS
MC/9	P2X1-2, P2X4, P2X6-7, P2Y6, P2Y13, P2Y14	RT-PCR, IB
P815	P2X1-7, P2Y1-14	RT-PCR, IB
Sıçan		
RBL-2H3, peritoneal mast hücreleri	P2Y, P2X1, P2X7	Farmakolojik assay

2.6.2. Mast hücrelerinin P2 reseptör aracılı cevapları

Ekstrasellüler ATP' nin mast hücrelerini etkilemesiyle ilgili ilk çalışmalar intrasellüler Ca^{+2} da bir artış olduğunu bildirilmiştir. İntrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonundaki böyle bir artış, ya hücre membranından hücre içine (P2X reseptörlerinin özelliği) Ca^{+2} girişinin yada intrasellüler depolardan Ca^{+2} salınımının (P2Y reseptörlerine bağlı) bir sonucudur (40).

P2X reseptörlerinin aktivasyonu, non-selektif katyon kanalı oluşumuna (aktivasyonun milisaniyeleri içinde Ca^{+2} a olan geçirgenlik artar), intrasellüler depolarizasyona ve Na^{+} - K^{+} gradyentlerinin eşitlenmesine yol açar. Milimolar düzeydeki ATP, fare mast hücrelerinde, P2X7 bağımlı Ca^{+2} girişini tetikleme yeteneğindedir ve bu etki seçici P2X7 reseptör antagonistleri olan 4-[(2S)-2-[(5-isoquinolinylsulfonyl)methylamino]-3-oxo-3-(4-phenyl-1-piperazinyl)propyl] phenyl

isoquinolinesulfonic acid ester (KN-62) yada okside-ATP (oATP) ile inhibe edilmiştir. P2X7 çıkarılmış (P2X7 $-/-$) BMMCs' de ATP P2X1 ve P2X3 reseptör aktivasyonunu tetiklemektedir. Spesifik P2X1 ve P2X3 reseptör agonisti α,β -meATP bu hücrelerde transit Ca^{+2} girişini tetiklemektedir ve bu etki spesifik antagonist olan 2,3-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP tarafından bloke edilmektedir. P2Y reseptörlerinin aktivasyonu genellikle PLC enziminin aktivasyonuna yol açar, PLC ise fosfatidil inositol bi fosfatın (PIP2), IP3 ve diaçil gliserole (DAG) dönüşümünü katalizler ki bu da intrasellüler depolardan Ca^{+2} serbestlenmesine neden olur. Bununla uyumlu olarak ADP CBMCs' de P2Y1 reseptör stimülasyonu aracılığı ile Ca^{+2} girişini indüklemektedir. Önemli bir şekilde, P2X7 reseptör aktivasyonu büyük organik moleküllere (kolin 100 Da, ethidium bromide 314 Da, YO-PRO-1 376 Da, propidium iodide 414 Da, Lucifer sarısı 457 Da, ve ATP' nin kendisi 605 Da) geçirgen olan non-selektif porun açılmasına neden olmaktadır. Bu porun açılma yeteneği P2X7 reseptörünün kendisine has bir özelliğidir. Lucifer sarısına ATP-ile indüklenmiş membran geçirgenliği fare BMMCs' de KN-62 tarafından inhibe edilmektedir. Ayrıca P2X7 reseptörü olmayan farelerden elde edilen BMMCs ATP-aracılı geçirgenliğe direnç göstermektedir. Bu porun büyüklüğü ATP konsantrasyonu ile giderek artmıştır. Moleküler ağırlığı 600–1,000 Da arasındaki en büyük moleküller ATP kullanılarak mast hücrelerine yüklenmiştir. Bazı çalışmalar P2X7 reseptörü aracılı büyük por oluşumunda panneksin-1 proteininin önemini göstermiştir. Panneksin-1 P2X7 ile ortak ilişkidir ve bu kompleks sadece Ca^{+2} girişini değiştirmeksizin P2X7 ile indüklenmiş boyanın alınımı için değil aynı zamanda kaspaz-1 prosesi ve olgun IL-1 β salınımı için de esastır (40). Tablo 2.7' de mast hücrelerindeki P2 reseptör aktivasyonunun etkileri özetlenmiştir.

Tablo 2.7. Mast hücrelerindeki P2 reseptör aktivasyonunun etkileri. Bulanova ve Bulfone-Paus (40)' dan alınmıştır.

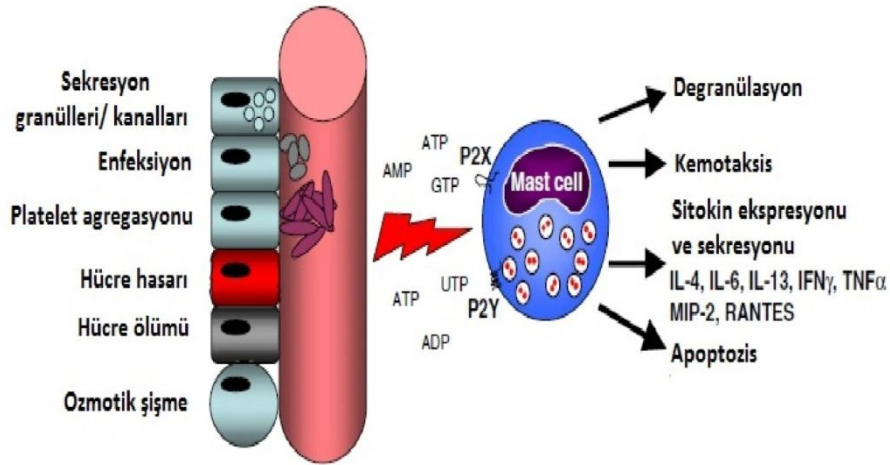
Etki	Mast Hücre Tipi	Sorumlu Reseptörler
Ca ⁺² girişi	Fare BMMCs	P2X1, P2X3, P2X7
	CBMCs	P2Y1
	Rat peritoneal mast hücreleri	ND
Membran geçirgenliği ve non-selektif por oluşumu	Mouse BMMCs	P2X7
	MC/9	P2X7
	Rat peritoneal mast hücreleri	ND
Degranülasyon	Rat peritoneal mast hücreleri	ND
	MC/9	P2X7
	Fare BMMCs	P2X7, ND
	İnsan CBMCs	ND
	HLMCs	P2Y1, P2Y2
İntrasellüler proteinlerin fosforilasyonu	Fare BMMCs, MC/9, P815	P2X1, P2X3, P2X7
Sitokin/kemokin ekspresyon/sekresyonu	Fare BMMCs, MC/9	P2X7, P2X1, P2X3
	İnsan CBMCs	P2Y1, P2Y11, P2Y12
Kemotaksis	Rat BMMCs	P2Y2
	CD34+ progenitors	P2Y2
Apoptozis	Fare BMMCs, P815, MC/9	P2X7

2.6.3. Degranülasyon

ATP' nin mast hücrelerinden histamin salınımını uyardığı uzun zamandır bilinmektedir. 1979' da Cockcroft ve Gomperts (130) sıçan mast hücrelerinde ATP' nin, Ca⁺² bağımlı histamin salınımına ve göze çarpan morfolojik değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir (40). ATP⁻⁴ 3 µM konsantrasyonda histamin salınımını tetiklemektedir, daha yüksek konsantrasyonlarda (>5 mM) ise degranülasyon artmış membran geçirgenliği ve nükleotitleri içeren daha büyük moleküllerin sızması nedeni ile inhibe edilmektedir. Bir kaç araştırma grubu farklı mast hücre modellerinde ATP-bağımlı degranülasyon bildirmişlerdir (şekil 2.9) ATP ile uyarımdan sonra sıçan peritoneal mast hücreleri histamin salar ve prostaglandin D-2 üretirler. Bu mast hücrelerinin degranülasyonuna PKC tarafından aracılık edilir. ATP' nin tetiklediği degranülasyon ve fosfolipaz-A2 (PLA2) aracılı araşidonik asit (AA) metabolizması arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir.

AA kaskadı inhibitörleri de bu hücrelerde ATP ile indüklenmiş histamin salınımını bloke etmektedirler. Böylece ek P2 reseptörleri mast hücre degranülasyonunun düzenlenmesi ile ilgili olabilir. ATP sadece degranülasyonu

kendiliğinden tetiklemekle kalmayıp aynı zamanda diğer uyarılar tarafından aracılık edilen ekzositozu etkili bir şekilde modüle etmektedir. ATP intrasellüler Ca^{+2} ve MC/9 (mast hücresi hattı) hücreleri tarafından salınan β -heksozaminidaz konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır. Bu etkiler P2X7 reseptörüne bağlıdır fakat PKC aktivitesine gerek duymazlar. ATP aracılı degranülasyon için P2X7 reseptörünün gerektiği gösterilmiştir. Diğer taraftan Saito ve arkadaşları sadece ATP' nin değil aynı zamanda ADP ve AMP' nin de fare BMMCs' den Ca^{+2} bağımlı histamin ve lökotrien C4 salınımını tetikleme yeteneğinde olduğunu göstermişlerdir (40). Ne ADP ne de ATP direk ekzositozu tetiklememiştir, aksine 50 μ M konsantrasyonlarda (P2X7 reseptör aktivasyonu için gerekenden çok daha düşük) eşzamanlı uyarım insan CBMCs'den salınan β -heksozaminidazı tetiklemiştir. ATP stimülasyonu sıçan mast hücrelerinin Fc ϵ R çapraz bağlanması ile tetiklenen Ca^{+2} iyonofor (A23187) veya compound 48/80 tarafından tetiklenen degranülasyonu güçlendirmektedir. ATP' nin yüksek konsantrasyonları (20–80 μ mol) inhibitör etki sergilerken bu toplam etki düşük ATP konsantrasyonlarını gerektirmektedir (10–20 μ mol). Dikkate değer bir şekilde HLMCs' de ne ATP ne de diğer nükleotitler veya adenosin direk olarak histamin salınımını tetiklemez. Diğer taraftan bu hücrelerde ATP, UTP ve diğer adenin nükleotitler IgE' yi güçlendirmekte fakat iyonofor A23187 aracılı histamin salınımını güçlendirmemektedir. Diğer nükleotitler veya ATP analogları da IgE çapraz bağlanması ile tetiklenen histamin salınımını artırmaktadır. HLMCs üzerindeki P2X ve P2Y reseptör ekspresyonunun analizi ile birlikte ele alındığında bu bilgi P2Y1 ve P2Y2 reseptörlerinin ilişkisini ortaya çıkarmıştır ancak bu P2X7 reseptörü için geçerli değildir. Böylece ekstrasellüler nükleotitler çoklu P2X ve P2Y reseptörleri aracılığı ile mast hücrelerinin degranülasyonunu tetiklemekte ve modüle etmektedir (40).



Şekil 2.9. Ekstrasellüler nükleotitlerin kaynakları ve mast hücrelerinin P2 reseptör aracılı cevapları. Bulanova ve Bulfone-Paus (40)' dan alınmıştır.

2.6.4. Hücre içi haberleşme

P2Y reseptör haberleşmesi PLC veya adenil siklaz aktivitesine bağlıdır (40,131). Sırasıyla, PLC aktivasyonu IP₃ ve DAG üretimini tetikler. Maalesef mast hücrelerindeki bu sinyal yolları detaylı olarak analiz edilememiştir. Sudo ve arkadaşları ATP' nin MC/9 hücrelerinde fosfolipaz-C gama (PLC γ) nin fosforilasyonunu tetiklemediğini ve PKC *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) tarafından aktive edildiğinde hala Ca⁺² girişini artırma yeteneğinde olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca MC/9 hücrelerinin ATP ile tetiklenen degranülasyonuna PKC tarafından aracılık edilmemiştir. P2Y₁₁ reseptörü sadece P2Y reseptörü gibi gözükmektedir, P2Y reseptörü insan sisteminde adenil siklaz/cAMP sinyalleşmesine bağlıdır. P2X reseptörleri aktivasyonunun erken etkilerinden biri Ca⁺² girişidir. Böyle iyonik hareketlilikler MAP kinazları içeren çok sayıda intrasellüler molekülün aktivasyonunu tetiklemek için yeterlidir. PC12 hücrelerinde ve fetal astrositlerde ATP' nin ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK)' ın Ca⁺² bağımlı fosforilasyonunu tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca, ekstrasellüler ATP ile uyarımın Jurkat T hücrelerinde p56lck, ERK1/2, ve *c-Jun N-terminal kinaz* (JNK)' ın aktivasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir. Fare BMMCs ve MC/9 hücrelerinde ATP' nin yüksek konsantrasyonları (≥ 3 mM) bir kaç proteinin transit tirozin fosforilasyonunu tetiklemiştir. Bu fosforillenmiş proteinler arasında STAT6,

ERK1/2 ve janus kinaz (Jak)-2 teşhis edilmiştir, fakat diğer Jak' lar (Jak1, Jak3 ve Tyk2) ve *signal transducer and activator of transcription* (STAT)' lar (STAT1, STAT3 ve STAT5) ve de p38 kinaz, JNK1 ve JNK2 bundan etkilenmemiştir. Sudo ve arkadaşları ATP uygulandığında MC/9 hücrelerindeki bir kaç intrasellüler proteinin (44 ve 110 kDa) tirozin fosforilasyonunu da bildirmişlerdir. MC/9 hücrelerinde IgE aracılı fosforilasyondan başkalaşan ATP ile indüklenen protein fosforilasyonu ortaya çıkarılmıştır. İlginç bir şekilde BMMCs ve MC/9 hücrelerinde KN-62 ve oATP, ATP ile tetiklenmiş tirozin fosforilasyonunu inhibe etmektedir, ancak bu etkiyi tamamen ortadan kaldırmamaktadır, diğer pürinoseptörlerin bu prosesle ilgili olabileceği önerilmektedir. Gerçekten de ATP, P2X7 $-/-$ BMMCs' de ERK1/2 fosforilasyonunu uyarma yeteneğini korumaktadır. Bu etkiye farmakolojik profil ve desensitizasyon özelliklerine göre muhtemelen P2X1 ve P2X3 reseptörleri tarafından aracılık edilmektedir. Diğer P2 reseptörlerinin ilişkisinin lehine, düşük konsantrasyonlardaki ADP (5 μ M) insan CBMCs' de ERKs ve p38 MAPK' ın fosforilasyonunu tetiklemekte ve bu P2Y1 ve P2Y12 selektif antagonistlerinin eş zamanlı etkisiyle etkili bir şekilde bloke edilmektedir.

2.6.5. Sitokin/kemokin ekspresyonu ve sekresyonu

İntrasellüler sinyal kaskadının tetiklenmesi (örneğin MAP kinazlar veya Jaks/STATs gibi) sitokin ekspresyonu ve salınımına bağlıdır (40). Gerçekten de ekstrasellüler nükleotitler, pro-inflamatuvar sitokin sekresyonu için güçlü tetikleyicilerdir. ATP makrofaj, dendritik hücre ve gliyal hücrelerini içine alan farklı tipteki hücrelerde P2X7 reseptörü aracılığıyla TNF α , IL-1 β , IL-18 ve IL-33 sekresyonuna aracılık etmektedir. ADP ve ATP P2Y11 reseptörü aracılığı ile dendritik hücrelerden IL-12/IL-23 sekresyonunu modüle etmektedir. UTP, monositlerden P2Y6 reseptörü aracılığı ile IL-8 üretimini tetiklemektedir. Sitokinler/Kemokinlerin sentezi ve hücre içinde depolanması ve bunu takiben salınması temel mast hücre fonksiyonlarından biridir. ATP, uyarılmış fare mast hücrelerinin (BMMCs ve MC/9) süpernatantında IL-4, IL-6, IL-13, TNF- α , interferon gama (IFN γ) ve makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2' i içine alan bir kaç proinflamatuvar sitokin ve kemokinin ekspresyonunu güçlendirmekte ve ayrıca IL-6 ve IL-13' ün sekresyonunu tetiklemektedir. Başlangıçta bu etkiye yalnızca P2X7

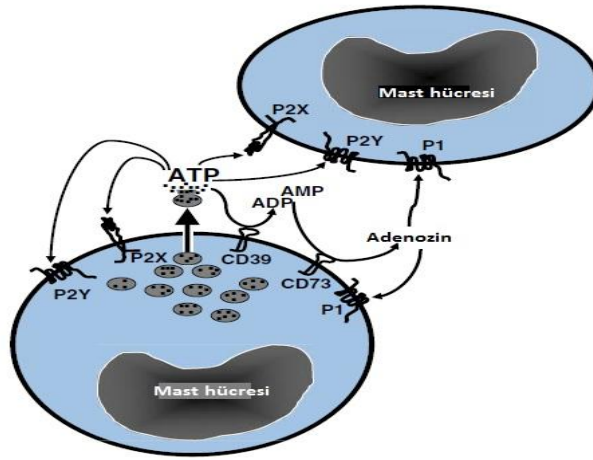
reseptörünün aktivasyonu tarafından aracılık edildiği önerilmişti, çünkü KN-62 bu etkiyi önlemişti. CBMCs' de protein fosforilasyonunun tetiklenmesine rağmen, 100 μM ' ın altındaki konsantrasyonlarda ADP ve ATP bu hücrelerden sitokin üretimini tetiklemekte başarısız olmaktadır. Diğer taraftan bunlar TLR2 ligandı ve peptidoglikana cevap olarak $\text{TNF}\alpha$ ve IL-5 sekresyonunu doza bağımlı olarak azaltmaktadır ve lökotrien-D4' e cevap olarak P2Y1, P2Y11 ve P2Y12 reseptörleri aracılığı ile $\text{TNF}\alpha$, IL-5, IL-8 ve MIP-1 β salınımını önlemektedir, fakat IgE aracılı sitokin salınımını etkilememektedir. Diğer uyarılar (TLRs ligantları veya lökotrienler gibi) degranülasyon olmaksızın sitokin ekspresyonu ve devamında salınımını tetiklerken, IgE çapraz bağlanması degranülasyon yoluyla ön-oluşum ve ön-depolanması gerçekleşen sitokinlerin salınımını tetikler. Feng ve arkadaşları P2Y reseptörlerinin sitokinlerin transkripsiyonunu baskılayan inhibitör yolları aktive ettiğini önermişlerdir. Bu hipotezle uyumlu olarak bir kaç çalışma, immün hücrelerin (prostoglandin (PGE)-2 için reseptörler ve $\beta 2$ adrenerjik reseptörler) aktivasyonuna engel olan Gs protein kenetli reseptörlerin adenil siklazı aktive ettiğini ve cAMP-bağımlı inhibitör sinyal yollarını başlattığını göstermiştir. Gerçekten de ATP ve ADP cAMP birikimini, cAMP cevap elementi-bağlanma proteini (CREB)' nin fosforilasyonunu ve CREB-bağımlı tetiklenebilir cAMP erken baskılayıcısının *up-regülasyon'* unu muhtemelen P2Y11 reseptörü aracılığı ile tetiklemektedir (40).

2.6.6. Hücreler arası iletişimde ATP: mast hücrelerinin rolü

ATP sekresyonu ve hedef hücreler üzerinde purinoseptörlerin aktivasyonu yoluyla belirli hücre tipleri arasında iletişim olduğuna dair kanıtlar artmaktadır. Fare fibroblastlarının, hepatosit veya gliyal hücrelerinin mekanik olarak uyarılması hem uyarılmış hem de uzaktaki hücrelerde Ca^{+2} artışını tetiklemektedir. Bu uzaktan haberleşmeye ATP yada diğer nükleotitler aracılık eder. Başlangıçta böyle hücre-hücre iletişimi yolunun sadece *gap-junction'* larla (ekstrasellüler boşlukta ATP salınımını kontrol ederler) meydana gelebileceği varsayılmıştır. Fakat Osipchuk ve Cahalan (132) bir mast hücresinden salınan ATP' nin uzak mesafedeki hücrede Ca^{+2} artışını ortaya çıkarmak için onlarca milimetre diffüze olduğunu gösterdiler. Bu ATP salınımı ya ekstrasellüler nükleotit uygulanması halinde (ATP yada GTP) Fc ϵ R çapraz bağlanması sayesinde ya da mekanik uyarımla tetiklenmektedir ancak *gap-*

junction eşleşmesinden bağımsızdır. Lokal bir ekstrasellüler ATP konsantrasyonu (1–10 μM) komşu hücrelerde yüksek affiniteli P2 reseptörleri tarafından aracılık edilen Ca^{+2} cevaplarını aktive etmek için yeterlidir. Dahası ekstrasellüler ATP uyarımı Fc ϵ R sinyalleşmesi ile birlikte meydana gelmekte ve ATP salınımının başlangıçtaki sektratuvar cevapta bir pozitif feed-back elamanı olduğunu varsayılmaktadır (şekil 2.10) Ekstrasellüler ATP sağlam komşu hücrelerde ATP içeren granüllerin salınımını yada degranülasyonun henüz başladığı hücrelerde ATP içeren granüllerin salınımını hızlandırabilir.

ATP derivatifleri olan ADP, AMP ve adenozin aynı yada komşu mast hücrelerinin yüzeyindeki P2X, P2Y veya P1 reseptörlerine bağlanabilir. Böylece ATP mast hücreleri için önemli bir otokrin ve parakrin mediyatör olarak işlev görür. ATP hücreler arası iletişime aracılık ederek otokrin ve parakrin bir faktör olarak hareket eder. Örneğin, ATP, nöron-glia yada nöron-keratinosit karşılıklı iletişimine aracılık eder.

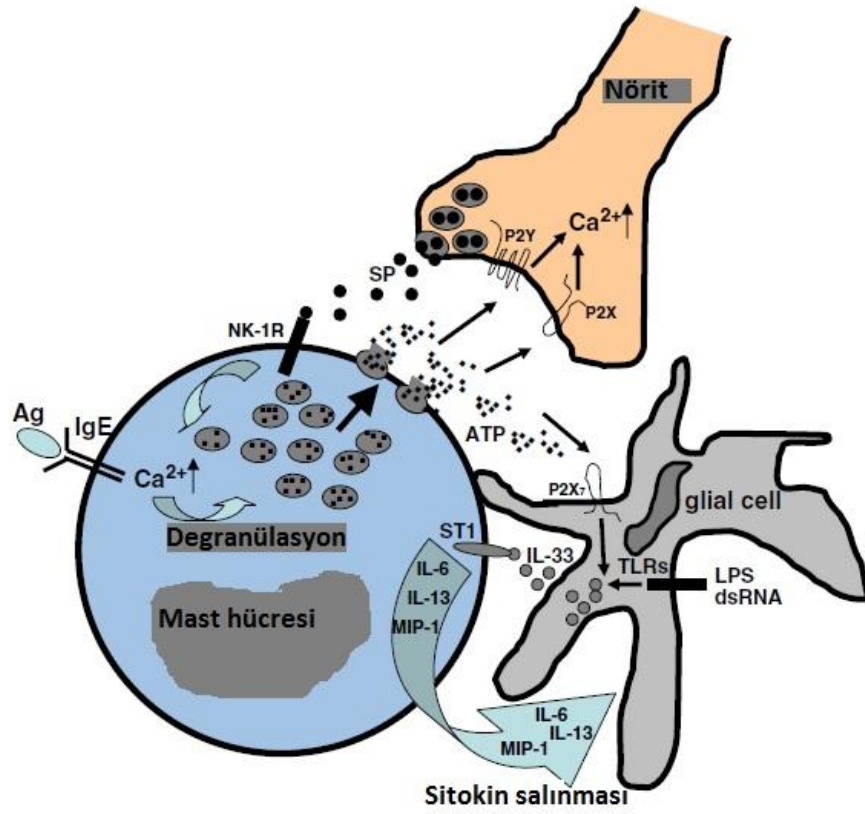


Şekil 2.10. ATP mast hücreleri için bir otokrin/parakrin faktördür. Bulanova ve Bulfone-Paus (40)' dan alınmıştır. ATP mast hücre granüllerinden salınır ve P2X ve P2Y reseptörleri aracılığıyla aynı veya komşu mast hücrenin aktivasyonunu tetikleyebilir. Aynı anda ektonükleotidazlar tarafından (CD39 ve CD73) ekstrasellüler ATP ADP' ye ve AMP' ye ve sonunda adenozine parçalanır.

Mast hücre-sinir ilişkisi nöroimmün etkileşimin prototipik bir göstergesidir ve sinirler ve immün hücreler arasındaki çift yönlü iletişim için önemli delil teşkil eder. Mast hücre ürünleri (nöropeptitler, sitokinler, büyüme faktörleri) ve araşidonik asit metabolitleri sinirleri direk uyarırlar (40). Örneğin, triptaz, nöronlar üzerindeki

proteinaz ile aktive olan reseptörleri direk tetikler. Elektriksel sinir uyarımı dura materde mast hücre degranülasyonuna neden olur. Çalışmalar sinir-mast hücre etkileşiminin direk olduğunu ve ara hücelere gerek duyulmadığını ve de bu etkileşimde mast hücrelerinden salınan ATP' nin esas rolü oynadığını göstermiştir.

Son zamanlarda Suzuki ve ark. (133) aktive olan sıçan mast hücreleri, bitişik süperior servikal gangliyon nöritlerinde ATP-bağımlı Ca^{+2} mobilizasyonuna neden olduğunu göstermiştir ve mast hücreleri ve nöronlar arasında ATP yoluyla çift yönlü bir iletişimin olduğunu önermişlerdir. IgE aracılı degranülasyon olduğunda mast hücre granüllerinden ATP salınır ve bitişikindeki nöritleri P2X ve P2Y reseptörleri aracılığıyla uyarır (şekil 2.11). Bir nöropeptit olan SP' nin (bradikinin veya akrep zehiri ile uyarıldığında sinir uçlarından salınır), sinir-mast hücre iletişiminin diğer önemli ara elamanları arasında olduğu bulunmuştur. SP nörokinin-1(NK-1) reseptörü aracılığıyla etki eder ve yüksek konsatrasyonlarda mast hücre degranülasyonunu tetikleyebilir, düşük dozda Ca^{+2} mobilizasyonunu uyararak ve mast hücrelerini aktifleyerek mast hücre degranülasyonunu tetikler. Son gözlemler sinir ve mast hücreleri arasında yakın, sinaps benzeri bir temas olduğunu ve bu temasta esas rolü N-kaderin ve hücre adezyon molekülü-1' in oynadığını göstermiştir.



Şekil 2.11. MSS' de hücreler arası iletişimde mast hücreleri ve ATP' nin rolü. Bulanova ve Bulfone-Paus (40)' dan alınmıştır.

Bu moleküller muhtemelen sinir-mast hücre etkileşimi için sadece moleküler bir platform sağlamakla kalmayıp aynı zamanda her iki hücre tipinin de çift yönlü aktivasyona yatkınlığını güçlendirdiği nöroimmünolojik sinapsların gelişimini de güçlendirmektedir (40). Nöroimmün karşılıklı iletişimde diğer bir aktif katılımcı da gliyal hücredir (şekil 2.11). ATP' nin gliyal hücrelerden IL-1 β ve TNF- α salınımını tetiklediği uzun zamandır bilinmektedir. Patojen ile ilişkili moleküler patern (PAMPs)' li hücrelere ATP uygulamasını takiben gliyal hücrelerden IL-1 β ve IL-33 salınımını önemli derecede tetiklemiştir. IL-33 mast hücreleri üzerinde çokça eksprese edilen ST1 reseptörü aracılığıyla etki eder ve BMMCs' de TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-13, GM-CSF, monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1), MIP1 α , ve MIP1 β salınımını tetikler. ATP ve PAMP ile muamele edilmiş gliyal hücrelerden elde edilen süpernatantlar, MC/9 hücrelerinde IL-6, IL-13, ve MCP-1 sekresyonunu tetikler. Bu proinflatuar sitokinler tekrar gliyal hücreleri uyarabilir. İn vivo' da ATP mast

hücrelerinden gelebilir ve gliyal hücrelerden IL-1 β ve IL-33 sekresyonunu tetikleyebilir. Bunların hepsi birlikte ele alındığında mast hücrelerinden salınan ATP farklı hücreler arasındaki (mast hücresi, nöronlar ve gliyal hücreler) karşılıklı iletişimde önemli bir otokrin, parakrin, ekzokrin faktördür. Merkezi sinir sisteminde hücreler arası karşılıklı iletişimde ATP ve mast hücrelerinin kilit rolü birlikte ele alındığında, MSS patofizyolojisindeki olası rolünün altını çizmek son derece önemlidir. Mast hücreleri konsantrasyonun serebral kortekste, talamusta, hipotalamusta ve hipokampüste nisbeten yüksek olduğu gösterilmiştir (40). Bu hücreler temel olarak beyinde mevcuttur. Dahası farmakolojik olarak tetiklenmiş mast hücre degranülasyonu talamusun nöronal aktivitesini düzenlemektedir (40). Daha da önemlisi mast hücreye özel olan triptaz, multiple sklerozlu hastaların serebrospinal sıvısında yüksek bulunmuştur. Deneysel otoimmün ensefalomyelit modelinde bu hayvanların beyinde degranüle mast hücre sayısının arttığı bulunmuştur. Deneysel otoimmün ensefalomyelit hastalığının başlangıcında mast hücre aktivasyonunun önemli olduğu önerilmektedir. Beyinde yerleşik mast hücreleri farklı yollarda deneysel otoimmün ensefalomyelit ile ilişkili inflamatuvar cevabı etkilemektedir. P2 reseptör aracılı degranülasyon ve mast hücrelerinden sitokinlerin (IL-4, IL-13, IFN γ ve TNF α) salınımı vasküler endotelyumun geçirgenliğini artırmaktadır. Mast hücre proteazları miyelini parçalar ve miyelin de dönüp mast hücre degranülasyonunu uyarır. IL-33 yardımcı T-hücresi-2 (Th2) immün cevabı yönetirken o da mast hücrelerinden IL-13 sekresyonuna aracılık eder, bu da Th2 aracılı cevabı daha fazla yükseltir. Böylece mast hücre, sinir ve gliyal hücreleri arasındaki purin/sitokin aracılı karşılıklı iletişim merkezi sinir sisteminde ve otoimmün hastalıklarda anahtar bir nöral-immün etkileşimi temsil eder.

Nükleotitlerin, kemotaksis, proliferasyon, sitokin sekresyonu, hücre ölümü gibi mast hücre cevaplarına aracılık etme ve hücreler arası iletişime katılma yeteneği anti-inflamatuvar ilaçların geliştirilmesi için tamamen yeni perspektifler açmaktadır (40). Mast hücrelerinde ve diğer hücre tiplerinde nükleotit aracılı haberleşmenin farmakolojik olarak modüle edilmesi, akut ve kronik inflamatuvar hastalıklar için arzu edilen yeni tıbbi yaklaşımı temsil etmektedir. Son bir kaç yıl sürecinde bir kaç P2X reseptör agonisti inflamatuvar hastalıkların terapisi ile yakından ilgili olmuştur. Artritik ağrı ve deneysel otoimmün ensefalomyelit fare modelinde

kullanımı umut vaat ettikten sonra oATP (nonselektif P2X reseptörlerinin antagonisti) faydalı olduğu, romatoid artrit ve multipl sklerozu tedavi etmek için önerilmiştir. oATP, tip-1 diyabet ve inflamatuvar barsak hastalığı fare modellerinde T-hücre aracılı inflamasyonu sınırlandırmak için başarılı bir şekilde uygulanmıştır. oATP, suramin ve piridoksalfosfat-6-azofenil-2,4-disülfonik asit OVA-aracılı astım modelinde alerjik hava yolu inflamatuvar cevabı önemli derecede azaltmıştır. Böylece, pürinerjik reseptör blokajı, alerji gibi mast hücrelerinin efektör rolü olduğu bilinen bir çok inflamatuvar hastalığın tedavisi için umut vaat eden terapötik stratejiyi temsil edebilir.

2.6.7. Mast hücre degranülatörü compound 48/80

Compound 48/80, formaldehit ile çapraz bağlı p-metoksi-N-metil fenil etilamin' in karışık polimeridir ve mast hücrelerinin *non-IgE* bağımlı uyarımı için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (134). Bu bileşik 1951 yılında bir histamin serbestletici olarak tanımlanmıştır. Compound 48/80' in spesifik olarak mast hücrelerini aktive ve degranüle ettiği genel olarak kabul edilmektedir. Compound 48/80' in enjeksiyonu çeşitli hayvan modellerinde inflamatuvar cevapları uyandırmıştır. Compound 48/80 uygulaması ile tetiklenen ve mast hücre aktivasyonunun bir sonucu olarak sinirlerin aktivasyonunu da içine alan bir çok fonksiyonel değişiklik bildirilmiştir.

Bağırsak lamina propriası sayısız mast hücresi içerir ve bu mast hücrelerinin bir çoğu enterik sinir sisteminin sinirleri ve viseral afferentlerle yakın olarak ilişki içindedir (134). Sistemik mast hücre degranülasyonuna yol açan compound 48/80' nin intraperitoneal uygulanması viseral ağrıya neden olabilir. Nosisepsiyona yol açan kaskadın mast hücre aktivasyonu ile başladığına inanılmaktadır ve bunu takiben mediyatör salınımını ve sonuçta nosiseptörlerin aktivasyonu gerçekleşmektedir. Aynı varsayım, izole kolon segmentlerine compound 48/80' in direk uygulanması ile yapılmıştır. Compound 48/80' in sağlam özofagus preparasyonlarına uygulanması nöral TRPV1 antagonizması tarafından önlenen longitudinal kas kasılmasını tetiklemiştir. Mast hücre mediyatörlerinin serbestlenmesi için nöral aktivasyon sekonderdir. Dorsal kök gangliyon hücreleri yada sempatik nöronlar ile mast hücrelerinin birlikte kültüre alınması üzerine yapılan çalışmalar şu sonucu

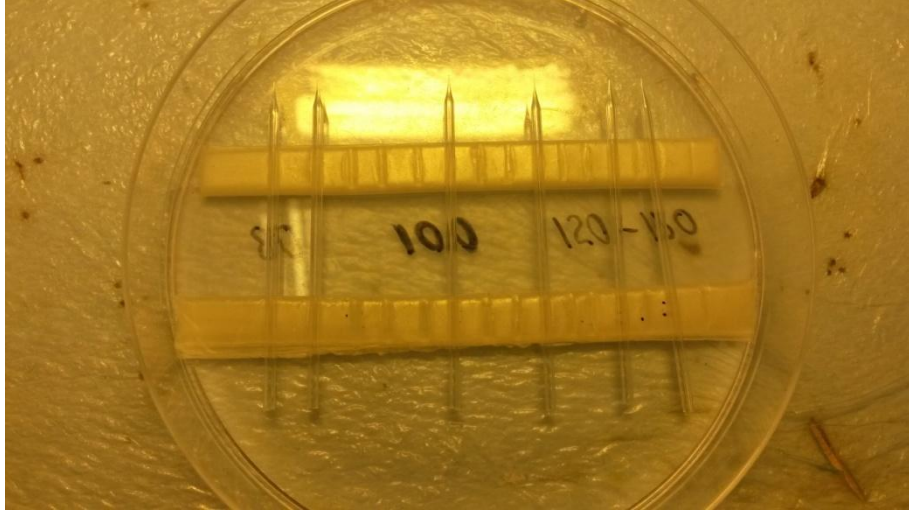
vermektedir; compound 48/80 ile tetiklenen mast hücre stimölasyonu nöronların aktivasyonu ile sonuçlanmıştır. Dikkat çekici olan bir diğér şey ise her ne zaman test edilirse edilsin compound 48/80' in değıştirdiğı fonksiyonlar sinir aktivasyonunun blokajından sonra inhibe edilmekte hatta ortadan kalkmaktadır. Eğer hücre yada dokunun fonksiyonu başlangıçta mast hücre mediyatörünün salınımı tarafından tetiklenen sinir aktivasyonu tarafından modüle edilirse bu elbette beklenen bir sonuçtur (134).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma için Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu'ndan etik onay alınmıştır (2013/42). Çalışmalar Doğu Finlandiya Üniversitesi, A.I. Virtanen Enstitüsü tarafından desteklenmiş ve A.I. Virtanen Enstitüsü Nörobiyoloji Bölümü laboratuvarında (Finlandiya) gerçekleştirilmiştir.

3.1. Elektrofizyolojik Kayıtlar

Dural trigeminal sinirden *suction electrode* yöntemi ile elektrofizyolojik kayıtlar alınmıştır. Bunun için öncelikle mikroelektrotlar yapılmıştır. Elektrot yapmak için kılcal cam tüpler alındı ideal uzunluk için uçları kesildi kesilen uçlar alevde küntleştirildi, sonra kılcal tüpler mikro pipet yapıcı Fireboy (Model P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter Instrument Co. made in U.S.A.) cihazına yerleştirildi, time=8'e ve sıcaklık= 630 °C'e ayarlandı, her bir kılcal cam tüpten iki elektrot elde edildi. Elde edilen elektrot uçlarının çapı mikroskop altında ve ısıtıcı yardımı ile uygun büyüklüklere (4-12 µm) getirildi (resim 3.1).



Resim 3.1. Elektrofizyolojik kayıta kullanılan cam elektrotlar.

3.1.1. Dura mater için yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) hazırlanması

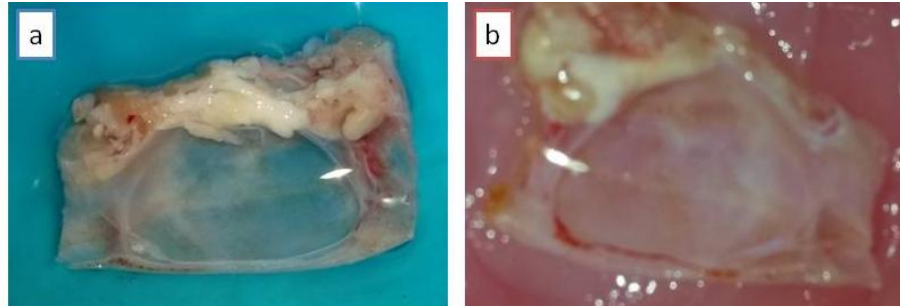
KCl (2,5 mM), NaHCO₃(30 mM), Glikoz (11 mM), MgCl₂ (2 mM), Na₂HPO₄ (1mM), CaCl₂ (2 mM), NaCl (119 mM) maddeleri *millique* (MQ) su içinde çözülerek yBOS hazırlandı, pH: 7,3' e ayarlandı ve solüsyon sürekli oksijenlendirildi. Ayrıca deney sonunda maksimum *spike* cevabı ortaya çıkarmak amacıyla 50 mM KCl hazırlandı.

3.1.2. Sıçanlardan hemi kranyum (hemi skull) preparatlarının hazırlanması ve elektrofizyolojik kayıtların alınması

Elektrofizyolojik kayıtlar için Doğu Finlandiya Üniversitesi, A.I. Virtanen Enstitüsü Deney Hayvanları Merkezi' nden alınan 30 adet beş haftalık erkek Wistar albino sıçan (130-170 gr) kullanıldı. CO₂ inhalasyonu ile sakrifiye edilen sıçanların kafaları kesildi ve elde edilen kafa hemen buz içine kondu ve trigeminal meningeal duysal sinirlerden elektriksel kayıt alınacak olan laboratuvar bölümüne getirildi. Burada kafa derisi yüzüldü ve sürekli oksijenlendirilen yBOS içinde kafatası üzerindeki kaslar uzaklaştırılarak temizlenmesi sağlandı. Daha sonra kafa sagittal düzlem boyunca ortadan ikiye kesildi (resim 3.2) böylece kafatasına yapışık sol ve sağ yarım dura mater' ler (hemi skull) elde edilmiş oldu (resim 3.3a ve 3.3b).



Resim 3.2. Kranyumun sagittal düzlem boyunca ikiye bölünmesi.



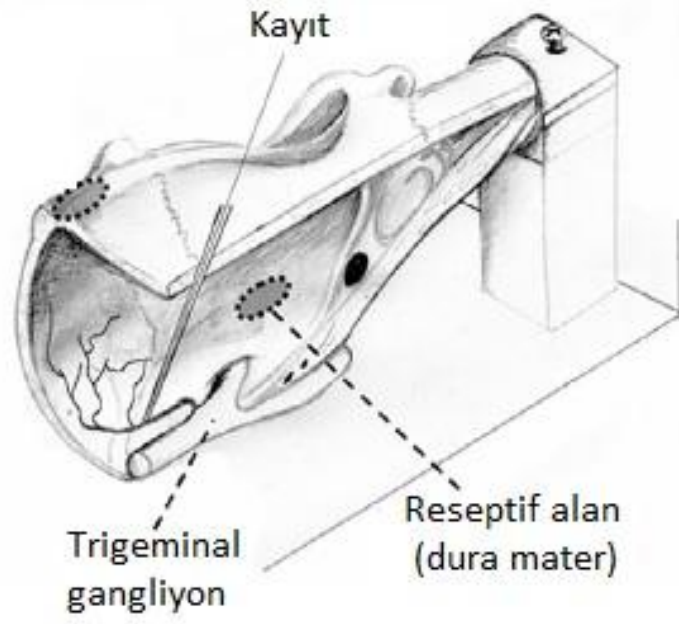
Resim 3.3. Dura mater yapışık a) sol b) sağ hemi skull (kranyum)

Bir hemi skull alındı ve yapay beyin-omurilik-sıvısı ile sürekli perfüze olan plastik cam küvete fıkse edildi (resim 3.4), nosisepsiyonu çalışmak için binoküler mikroskop altında dura materi innerve eden duysal sinir bulundu meningeiyal trigeminal sinirin mandibular bölümünün nervus spinosus dalının (ince uçlu makasla sağ ve sol yanı duramater ve doku parçalarından temizlendi) proksimal ucu (şekil 3.1) kesildi serbest kalan ve solüsyon içinde yüzen sinir ucuna önceden hazırlanmış elektrot dikkatli bir şekilde yaklaştırıldı ve elektrodun diğer ucuna takılı olan enjektörle emilerek sinir ucunun cam elektrot içine girmesi sağlandı (resim 3.5 ve 3.6). Sistemin banyosuna toprak elektrot fıkse edildi, sistemin bağlı olduğu

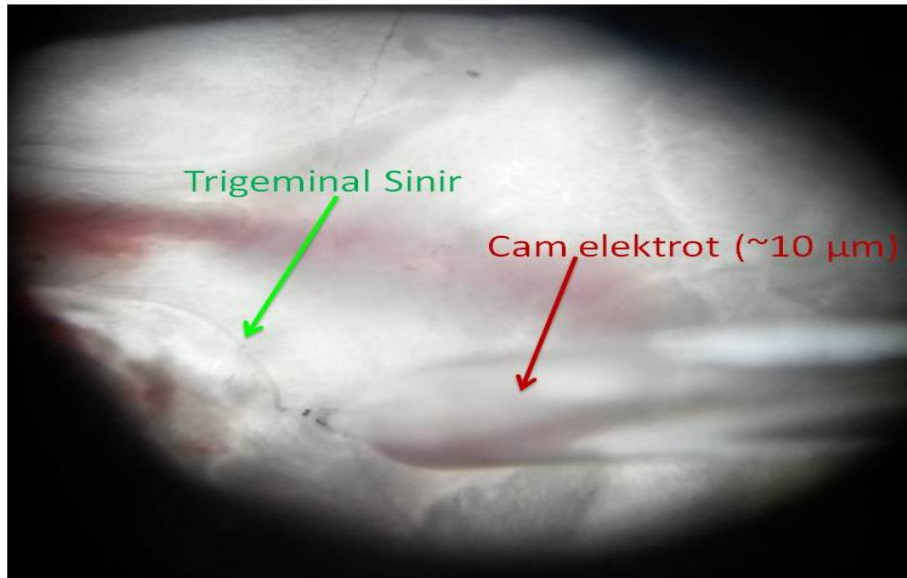
bilgisayardan WinEDR_V3.3.9 programı açılarak sinirden elektriksel kayıtlar alındı. Uygulanan kayıt yöntemi Hodgkin ve Huxley' nin klasik kayıt tekniğine benzer modifiye intrasellüler kayıttır (şekil 3.2), bu yöntemle trigeminal sinir membranının potansiyelinde meydana gelen değişiklikler kaydedildi. Perfüzyon solüsyonuna çalışılacak olan farmakolojik ajanlar tek başına veya birlikte uygulandı (şekil 3.3). Aksiyon potansiyelleri kaydedildi, sonra aksiyon potansiyeli frekansları WinEDR_V3.3.9 kullanılarak hesaplandı, her bir kayıttaki *spike*' ler (aksiyon potansiyelleri) sayılırken kayıt işlemi sırasında noise (gürültü) olarak kaydedilen *spike*' ler silinerek elendi. Veriler SPSS 17.0' da t-testi ile karşılaştırıldı.



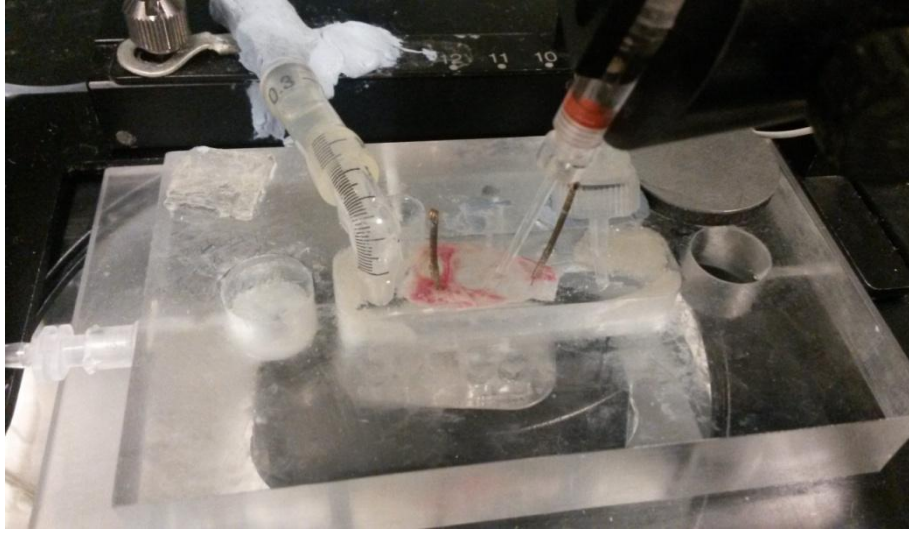
Resim 3.4. Hemi skull' un plastik cam küvete fiksasyonu.



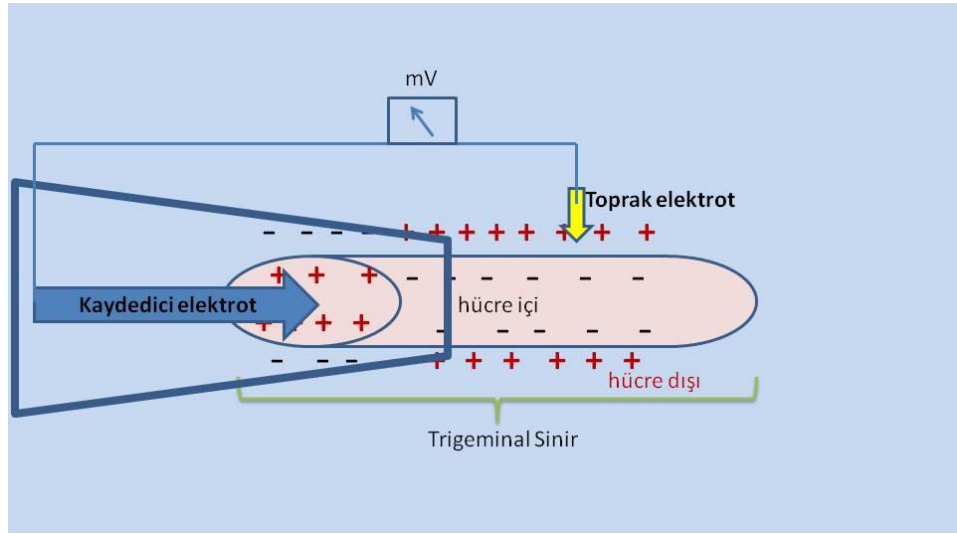
Şekil 3.1. Rat dural trigeminal sinirin proksimal ucu ve dural reseptif alan. Schueler ve ark. (135)' ndan alınmıştır.



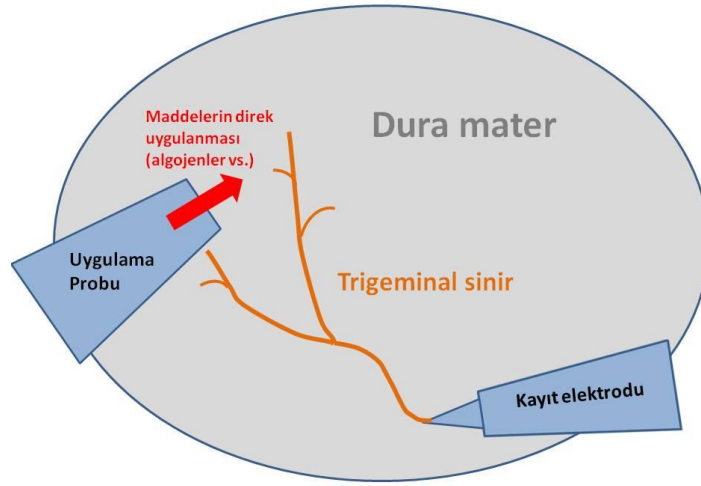
Resim 3.5. Trigeminal sinirin proksimal ucunun cam elektrot içine çekilmesi.



Resim 3.6. Trigeminal sinirin proksimal ucu elektrot içinde ve düzenek hazır.



Şekil 3.2. Düşük çözünürlük intrasellüler kayıt tekniği ile trigeminal sinir membran potansiyelindeki değişikliklerinin kaydedilmesi şematize edilmiştir.



Şekil 3.3. Dura mater'e uygulama probu aracılığıyla farmakolojik ajanların uygulanması ve kaydedici elektrot ile spike kayıtlarının alınması şematize edilmiştir.

3.1.3 ATP ve diğer farmakolojik ajanların uygulanması

Çalışma kapsamında ATP (tüm P2X ve P2Y reseptörlerinin agonisti, 100 μ M), ADP (P2X ve özellikle P2Y2 ve P2Y13 reseptörlerinin agonisti, 100 μ M), AMP (P2X reseptörlerinin agonisti, 100 μ M), adenosin (P1 reseptörleri A1, A2 ve A3 agonisti, 100 μ M), α - β MeATP (P2X2 ve P2X3 reseptörlerinin agonisti, 100 μ M), (2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) adenosine-5'-triphosphate (BzATP, P2X7 reseptörlerinin agonisti, 100 μ M), suramin (P2 reseptörleri blokörü, 100 μ M) ve A-317491 hydrate sodium salt (P2X3 reseptör antagonisti, 10 μ M) banyo solüsyonuna (yBOS) 10 dakika boyunca uygulandı.

Böylece agonist ve antagonistler şu protokollere göre uygulandı: ATP için, kontrol (10 dak.), ATP (10 dak.), yıkama (10 dak.), KCl (3 dak.); ATP + Suramin için, kontrol (10 dak.), ATP (10 dak.), ATP+Suramin (5 dak.), Yıkama (10 dak.), KCl (3 dak.); ADP için kontrol (10 dak.), ADP (10 dak.), yıkama (10 dak.), KCl (3 dak.); ADP +Suramin için, kontrol (10 dak.), ADP (10 dak.), ADP+Suramin (5 dak.), yıkama (10 dak.), KCl (3 dak.); AMP için, kontrol (10 dak.), AMP (10 dak.), yıkama (10 dak.), KCl (3 dak.); AMP +Suramin için, kontrol (10 dak.), AMP (10 dak.), AMP+Suramin (5 dak.), yıkama (10 dak.), KCl (3 dak.); Adenosin için, kontrol (10 dak.), Adenosin (10 dak.), yıkama (10 dak.), KCl (3 dak.); α - β MeATP için, kontrol (10 dak.), α - β MeATP (10 dak.), yıkama (10 dak.), KCl (3 dak.);

α - β MeATP +Suramin için, kontrol (10 dak.), α - β MeATP (10 dak.), α - β MeATP +Suramin(10 dak.), yıkama(10 dak.), KCl (3 dak.); α - β MeATP + A-317491 için, kontrol (10 dak.), α - β MeATP (10 dak.), α - β MeATP + A-317491 (10 dak.), yıkama (10 dak.), KCl (3 dak.); BzATP için, kontrol (10 dak.), BzATP(10 dak.), yıkama (10 dak.), KCl (3 dak.); 2-Methylthio-ADP trisodium (2MeSADP) için, kontrol (10 dak.), 2MeSADP (10 dak.), yıkama (10 dak.), KCl (3 dak.); 2MeSADP+Suramin için, kontrol (10 dak.), Suramin (10 dak.), 2MeSADP+Suramin (10 dak.), yıkama (10 dak.), KCl (3 dak.). Her bir protokol için 3 rat (6 hemi skull= 6 deney) kullanıldı.

3.2. Rat Trigeminal Gangliyon Nöron Kültürü

3.2.1. Gerekli ekipman

- Laminar flow kabin
- İnkübatör
- Küçük makas
- Forseps
- 35 mm petri kapları
- 50 ml falkon tüpler
- 1.5 ml ependorf tüpler

3.2.2. Reaktiflerin hazırlanması

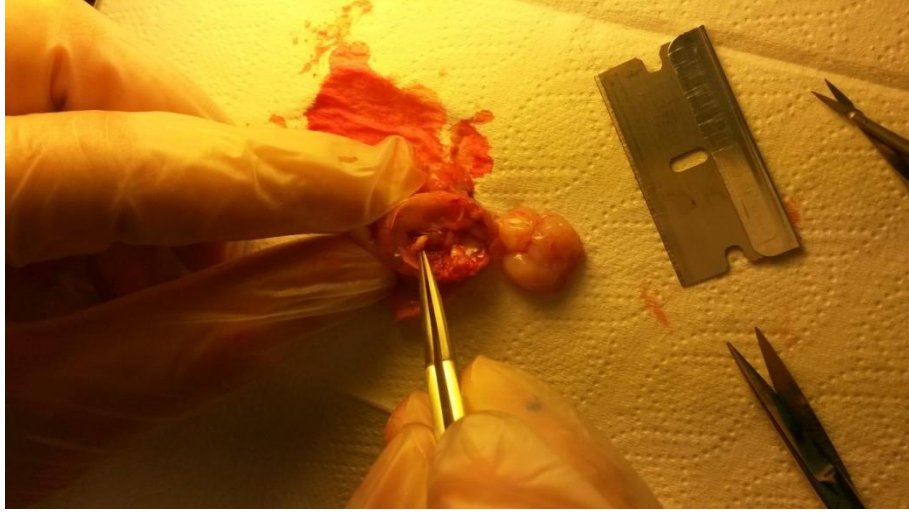
- Polilizin: 20 μ g/ml
- Kültür medyum: 1 ml FBS (fetal bovine serum)+ 9 ml F12
- Disosiyasyon enzimi: 500 μ l kültür medyumuna içine 0,25 mg/ml tripsin, 1 mg/ml kollejenaz ve 0,2 mg/ml DNaz eklendi
- Tripsin inhibitör

3.2.3. Minik petrilerin (cover slip) polilizin ile kaplanması

Her bir 35 mm petriye 10 μ l polilizin kondu ve 25 dakika bekletildi. Daha sonra sıvı çıkarıldı ve petriler 2 kez 1 ml MQ su ile yıkandı.

3.2.4 Trigeminal gangliyon izolasyonu ve nöron kültürünün hazırlanması

İki adet P10 (10 günlük erkek) Wistar sıçan CO₂ inhalasyonu ile sakrifiye edildi ve hemen giyotinle kafası kesildi. Kafanın her iki yanından kulakların hemen üstünden kafatası kesilerek uzaklaştırıldı. beyin çıkarıldı. Beyin tabanında bilateral olarak bulunan trigeminal gangliyonların (resim 3.7) üstündeki dura mater binoküler mikroskop altında uzaklaştırıldı, trigeminal gangliyonun üç dalı kesildi ve gangliyonlar kültür medyumuna kondu. Gangliyonlar ince pens ucu ile merkezden periferiye doğru ayrıştırıldı. Her iki gangliyon da 500µl kültür medyumuna içinde enzim kokteyli bulunan (F12 içinde 0,25 mg/ml tripsin, 1 mg/ml kollejenaz ve 0,2 mg/ml DNaz) bulunan 1,5 ml lik bir ependorf tüpe kondu. Bu tüp sıcaklığı 37 °C' ye ayarlanmış termo-mikserde 900 rpm' de 6 dakika karıştırıldı. Termo-mikserden alınan tüp pipet yardımı ile karıştırıldı ve tekrar termomikserde bekletilerek tüm hücreler disosiye olana kadar bu işlemler 6 kez tekrarlandı. Daha sonra süpernatant atıldı ve dipteki hücre çökeltisi 4,5 ml F12+0,5 ml FBS(% 10) ile karıştırıldı, 5 ml'lik tüpe alındı ve 1000 rpm' de 5 dakika iki kez santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant atıldı ve üzerine 240 µl kültür medyumuna eklendi. 35 mm'lik petrilere önce 10 µl kültür medyumuna eklendi sonra bunun üzerine nöronları içeren solüsyondan 38 µl eklendi. Bu petrilere 37 C' ye ayarlı inkübatörde 40 dakika inkübe edildi, 40 dakika sonra her bir 35 mm'lik petriden 1 µl alınarak atıldı ve bunun yerine 1 µl NGF eklendi. Sonra tekrar inkübe edildi.



Resim 3.7. Kranyum tabanında trigeminal gangliyonun çıkarılması.

3.3. Peritoneal Primer Mast Hücre Kültürünün Hazırlanması

Beş haftalık wistar erkek sıçanlara (n=2) 0,5 ml heparin içeren 10 ml serum fizyolojik (5 U/ml) intraperitoneal olarak karın boşluğuna enjekte edilerek peritoneal lavaj gerçekleştirildi. Dört dakika abdominal masajı takiben sıçanlar dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Mast hücre açısından zengin olan 7 ml sıvı bir pipet ile çekildi ve 10 ml'lik falkon tüpe alındı. Oda sıcaklığında 32 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernantant atıldı ve tüpün dibindeki hücrelere 1 ml *neurobasal-A* (NBA, büyüme medyumu) eklendi ve her bir 35 mm'lik petriye mililitrede 1.5×10^5 hücre olacak şekilde eklenerek 37 °C, %95 O₂ ve % 5 CO₂ ortamı sağlayan inkübatörde 48 saat inkübe edildi.

3.4. Mast Hücre-Nöron Ko-Kültürünün Hazırlanması

Nöron ve mast hücreleri kültüründen iki gün sonra mast hücre kültürüne ait petriler alındı ve bunların NBA solüsyonları değiştirildi, 700 µl NBA alındı ve yerine aynı miktar yenisi eklendi. Sonra yukarıda nöron ve konsantrasyonunu koruyacak miktarda nöron kültüründen alınarak mast hücre kültürüne eklendi. Ko-kültür ortamına 50 ng/2 ml NGF eklendi, nöronların tabana çöküp bağlanması için yaklaşık 4 saat inkübe edildikten sonra 1300 µl daha NBA eklenerek iki gün inkübe edildi.

3.5. Ca⁺²-Görüntüleme

Öncelikle 2 litre temel solüsyon (TS) ve 50 mM KCl solüsyonu hazırlandı.

3.5.1. Temel solüsyonun hazırlanışı

NaCl, 152 mM (17,76 gr), KCl: 2,5 mM(0,373 gr), glikoz, 10 mM (3,61 gr), hepes 10 mM (4,76 gr), CaCl₂: 1 mM (stok), MgCl₂: 1mM (stok) olarak hazırlandı. CaCl₂ ve MgCl₂ 1mM stok solüsyon olarak hazırlandı ve sonra bunlardan sırasıyla 4 ml ve 2 ml eklendi. Temel solüsyonun pH' sı NaOH ile 7,4' e ayarlandı. Ayrıca 50mM KCl çözeltisi hazırlamak için bu temel solüsyondan 50 ml alınarak üzerine KCl (0,177 gr) eklendi ve çözünmesi sağlandı.

3.5.2. ATP ve diğer maddelerin hazırlanması

Adenozin 5' trifosfat (Sigma Aldrich) m= 5,51 mg tartıldı ve MQ su içinde çözülerek 10 mM' lık stok solüsyon elde edildi. Compound 48/80 (sigma aldrich) m=1 mg tartıldı ve 1 ml mq su içinde çözülerek stok solüsyon hazırlandı uygulama konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde seyreltildi. Suramin (ATP reseptör antagonisti, Abcam) m=014 mg tartıldı ve 1 ml MQ su içinde çözülerek 10 mM' lık stok solüsyonu hazırlandı. ATP ve suraminin uygulama konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde TS içinde seyreltildi.

Karanlıkta 2 µl stok Fluo3AM'e pH=7.4 olan TS' den 400 µl eklendi daha sonra çalışma sırasına göre her bir cover slip' e 150 µl TS ve 100 µl Fluo3AM eklendi, bu karışım içinde 50 dakika inkübatörde üstü kapalı karanlık bir şekilde bekletildi, daha sonra yine karanlıkta bu karışımdan çıkarılarak 2 ml TS içine kondu ve 15 dakika bekletildi, daha sonra TS' den çıkarılan lamel Ca-görüntüleme cihazına bağlı mikroskop üzerine yerleştirildi, ve mikroskop altında hücreler gözlemlendi. Fluo3 stok çözeltisi -70 C' de seyreltilmiş alikotları ise kullanımdan önce + 4 C' de buzdolabında aliminyum folyoya sarılı (karanlık ortam) olarak muhafaza edildi.

3.5.3. ATP ve diğer maddelerin uygulanması ve Ca^{+2} -görüntüleme

Saf trigeminal nöron kültürüne ATP (100 μM), saf mast hücre kültürüne ATP (100 μM), ve nöron-mast hücre ko-kültürüne compound 48/80 (10 $\mu\text{g/ml}$) ve compound 48/80 (10 $\mu\text{g/ml}$)+suramin (100 μM) birlikte uygulandı. Saf nöron kültüründen bir petri alındı ve yukarıda anlatıldığı gibi Fluo3AM ve TS'a maruz bırakıldı. Daha sonra RSC software v1.04 programına ATP' nin ve diğer solüsyonların kaç dakika ve hangi hızla hücreler üzerine gönderileceği komut olarak girildi. Aşağıdaki protokolde belirtilen sıra ve sürelerle göre sadece nöronlara ATP, sadece mast hücrelerine ATP, ko-kültüre compound 48/80 ve yine ko-kültüre suramin+compound 48/80 ve diğer solüsyonlar uygulandı: sadece nöronlar üzerine temel solüsyon (2 dak.), ATP (5 dak.), temel solüsyon (2 dak.), KCl (2 sn.), temel solüsyon (1 dak.); sadece mast hücreleri üzerine temel solüsyon (2 dak.), ATP (5 dak.), temel solüsyon (2 dak.), KCl (2 sn.), temel solüsyon (1 dak.); ko-kültür üzerine temel solüsyon (2 dak.), Compound 48/80 (5 dak.), temel solüsyon (2 dak.), KCl (2 sn.), temel solüsyon (1 dak.); ayrı bir protokol için ko-kültüre üzerine temel solüsyon (2 dak.), Suramin (5 dak.), Suramin+Compound 48/80 (5 dak.), temel solüsyon (2 dak.), KCl (2 sn.), temel solüsyon (1 dak.).

Ca^{+2} -görüntüleme kayıtları için TILLvisION real-time görüntüleme software kullanıldı. Bu programda hücrelerin ultraviyole ışınlarına maruz kalma süresi 100 ms, döngüsü (live cycle time) 500 ms ve floresans dalga boyu 488 nm' ye ayarlandı. Programdan video kamera çalıştırıldı, hücreler ve Ca^{+2} ışımaları gözlemlendi, yeterli sayıda (yaklaşık 100) hücre gözlemlendiği anda kamera durduruldu ve 30 farklı hücre ayrı ayrı seçilerek programa Ca^{+2} ışımaları tanıtıldı. Daha sonra yine programdan Ca^{+2} -görüntüleme çalıştırıldı ve farmakolojik ajanların uygulanması için beklenildi. Cihaz çalışmasını tamamladıktan sonra aynı programdan veriler alındı ve analiz edildi. Bu prosedür uygulanan her biri farmakolojik ajan için yeniden yapıldı.

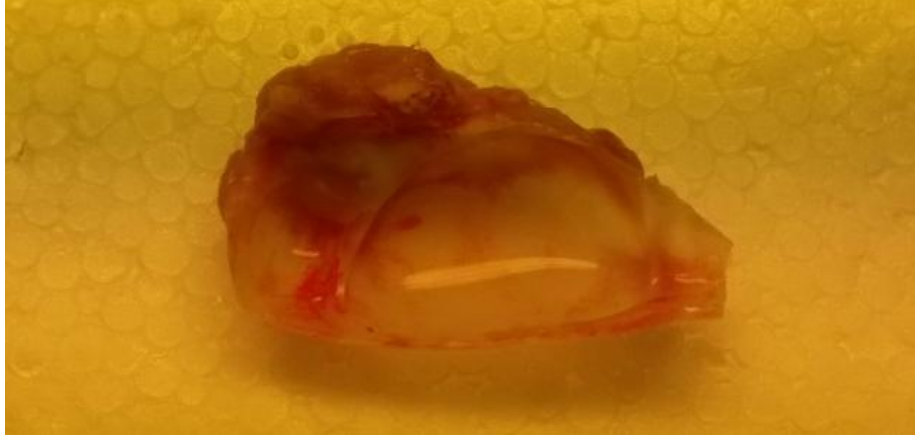
3.6. Dural Damar Cevaplarının Belirlenmesi

Doğu Finlandiya Üniversitesi, A.I. Virtanen Enstitüsü Deney Hayvanları Merkezi'nden alınan beş haftalık erkek Wistar albino sıçanlar (n=12, 130-170 gr) anestezi odasında CO₂ inhalasyonu yöntemi ile sakrifiye edildi, sonra kafaları kesildi ve kafanın da ön kısmı göz hizasından kesildi. Elde edilen kafa hemen buz içine konuldu. Daha sonra kafa derisi yüzüldü ve sürekli oksijenlendirilen yapay beyin omurilik sıvısı içinde kafatası üzerindeki kaslar uzaklaştırılarak temizlenmesi sağlandı. Daha sonra kafa sagittal düzlem boyunca ortadan ikiye kesildi, beyin hemisferleri dura matere zarar vermeden çıkarıldı, böylece kafatasına yapışık sol ve sağ yarım dura mater'ler (hemi skull) elde edilmiş oldu. Daha sonra

- hemi skull'lar, içinde vazelin bulunan petri kaplarına fikse edildi (resim 3.8)
- yapay beyin omurilik sıvısı ile 15 dakika perfüzyon
- örnekler 37 °C ısı ve uygun nem sağlayan özel odaya taşındı
- kranyum boşluğuna (resim 3.9) 350 µl yBOS ile 5 kez yıkama yapıldı
- karanyum boşluğuna 350 µl compound 48/80 (10 µg/ml) ve ATP (100 µl) ayrı ayrı eklendi ve kontrol amacıyla zıt yarı kranyumlara ise sadece 350 µl yBOS eklendi sonra 15 dakika beklendi
- hemi skull'lar alındı ve % 4' lük paraformaldehit (PAF) içine konuldu



Resim 3.8. Hemi skull'ların içinde vazelin bulunan petri kaplarına fikse edilmesi.



Resim 3.9. Beynin uzaklaştırılması ile kranyumda oluşan boşluk.

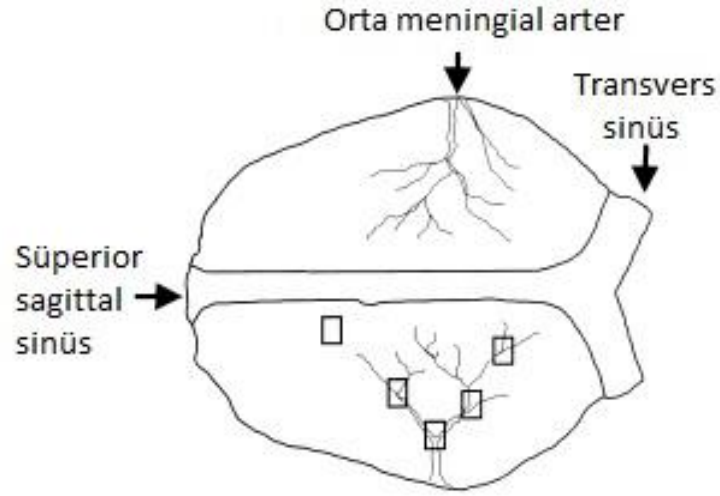
Bir gece PAF içinde fiksasyondan sonra hemi skull' lardan dura mater' ler çıkarıldı ve polilizinli lam üzerine yayma preparat yapıldı, bir gece havada kurutuldu. Toluidine blue boyaması yapıldı. Compound 48/80 ve ATP uygulamalarının her biri için 6 rat kullanıldı. Dura materler aşağıdaki prosedüre göre boyandı:

- Stok Toluidin mavisi solüsyonundan 5 ml. ve % 1' lik NaCl çözeltisinden 45 ml. karıştırıldı ve glisayel asetik asit ile pH: 2,5' e ayarlanarak 50 ml. boyama solüsyonu hazırlandı
- PAF' tan çıkarılan dura materleri yıkamak üzere 1litre *phosphate-buffered saline* (PBS) hazırlandı
- Dura materler PAF' tan çıkarıldı ve PBS ile yıkama yapıldı
- Boyama kabının üzerine yerleştirilen lamalar üzerine, dura materleri kaplayacak kadar Toluidin mavisi solüsyonu damlatıldı ve 10 dak. inkübe edildi.
- Üç kez distile su ile yıkandı
- % 95' lik alkolde 1 dak. bekletildi
- % 100' lük alkolde 1 dak. bekletildi
- Ksilen' de 1 dak. bekletildi
- Üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı

Mikroskop (Olympus CX21) altında dura mater orta meningial arter, orta meningial arterin sol ve sağ dallarının çapları ölüldü, 10X, 20X ve 40X objektiflerde (büyütmeler) resimleri çekildi. Elde edilen veriler SPSS Inc. (17.0) istatistik programında t-testi kullanılarak karşılaştırıldı.

3.7. Dural Mast Hücrelerinin Sayılması

Dura materdeki mast hücreleri, 10x objektif ile Olympus CX21 ışık mikroskobunda her preparat için 5 sol taraf ve 5 sağ taraf olmak üzere toplam 10 alanda sayıldı, granüle, degranüle durumları 40X objektif ile değerlendirildi, meningial arter damar çapları ve mast-damar yakınlığı ölüldü ve fotoğrafları çekildi. Meningeal damarlar referans alınarak seçilen sayım alanları şekil 3.4' te gösterilmiştir. Elde edilen veriler SPSS Inc. (17.0) istatistik programında one-way ANOVA testi kullanılarak analiz edildi.

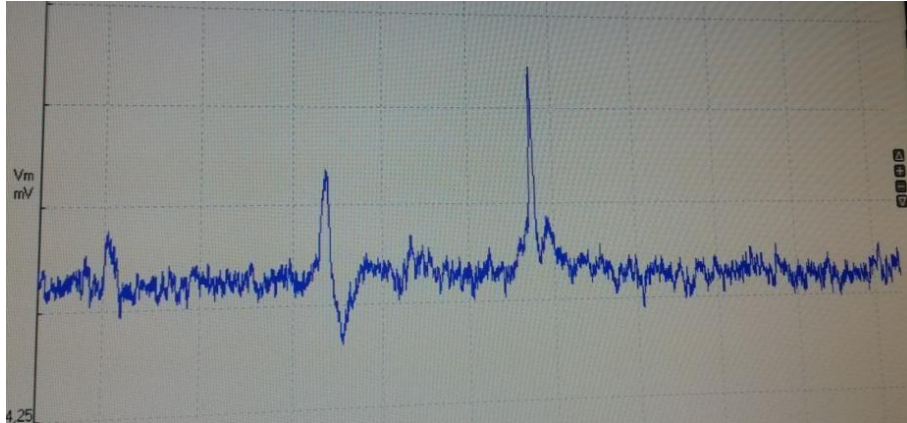


Şekil 3.4. Dura mater sayım alanları. Bergerot ve ark. (46)' ndan modifiye edilerek alınmıştır).

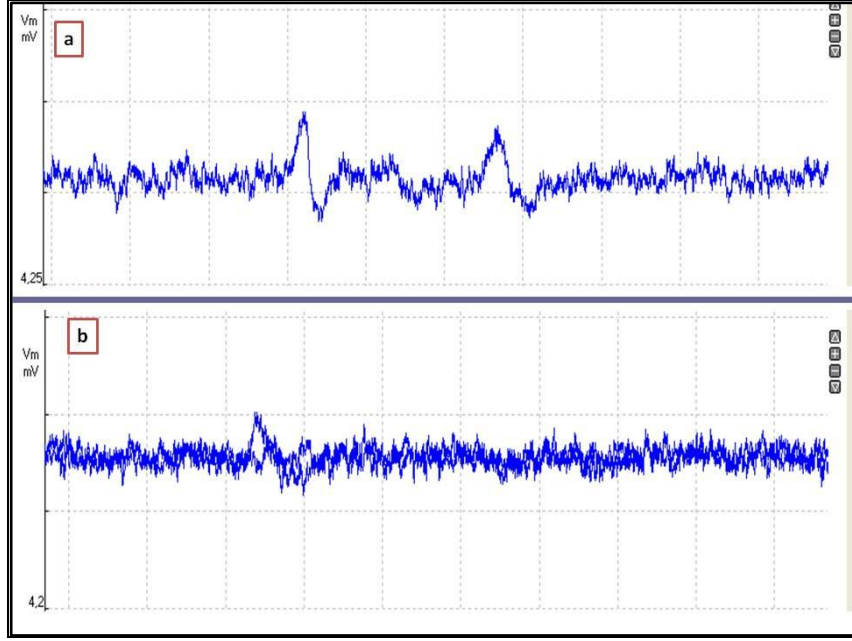
4. BULGULAR

4.1. Elektrofizyolojik Kayıtlar

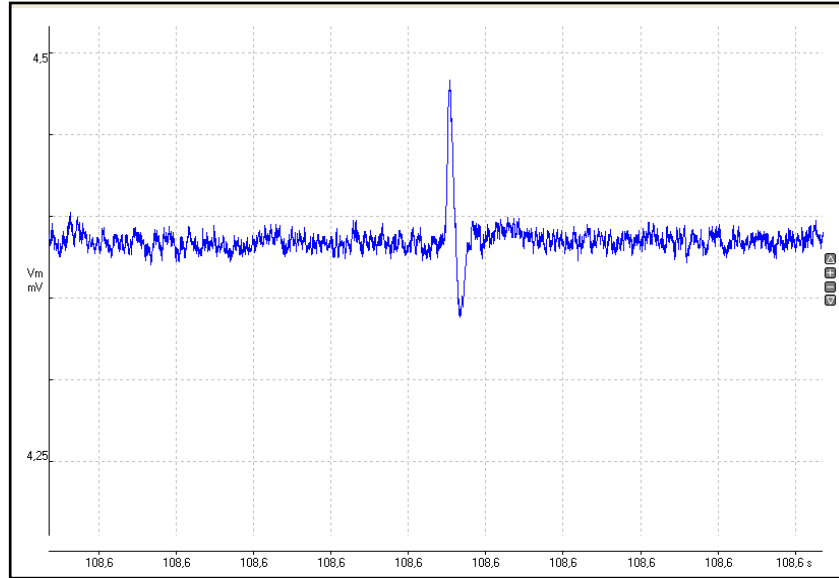
Suction electrode tekniği ile trigeminal sinirin mandibular bölümünün nervus spinosus dalından elektrofizyolojik kayıtlarla elde edilen *spike*' ların bileşik aksiyon potansiyeli olmayıp aksine her birinin ayrı bir aksondan kaynaklanan tek bir aksiyon potansiyeli olduğuna karar verildi çünkü: elde edilen *spike*' ların *time course*' ı çok hızlıydı (~ 1 ms) aksine bileşik aksiyon potansiyelinin *time course*' ı çok daha uzundur; bu *spike*' lar kendi kendine (spontan) oluşmaktaydı bileşik aksiyon potansiyeli gibi tetiklenmiş değildi (resim 4.1); *spike*' lar aynı sivrilikle ve bazen 200 Hz' den büyük frekansla birbirini takip etmekteydi ki bu bileşik aksiyon potansiyellerinin maksimal potansiyeli ile tutarlı değildir; büyük ve hızlı *spike*' lar (C-liflerinden kaynaklanan yavaş *spike*' ların aksine) tetrodotoksin (TTX, $1 \mu\text{M}$) tarafından tamamen bloke edildi (resim 4.2); bazı *spike*' lar tek bir hücrenin aksiyon potansiyeline özgü olan açık afterhiperpolarizasyona sahipti (resim 4.3).



Resim 4.1. *Suction electrode* düzeneğinde spontan *spike*' lar.

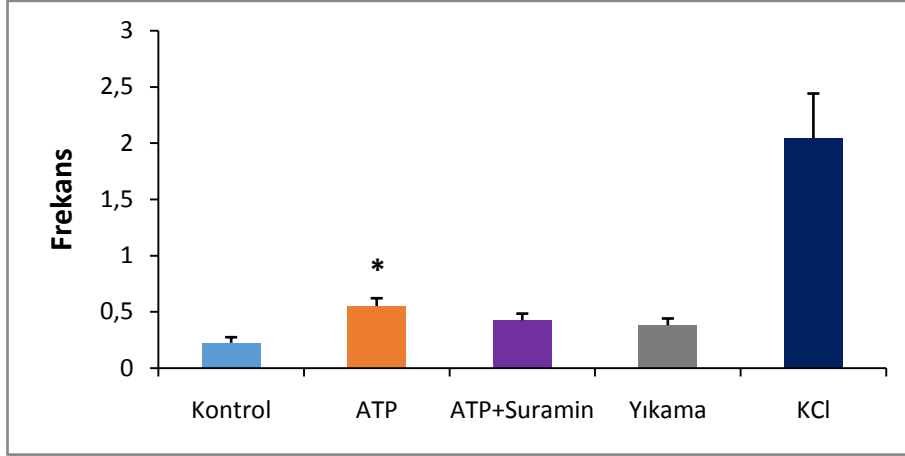


Resim 4.2. Büyük ve hızlı spike' ların TTX (1 μ M) tarafından bloke edilmesi a) TTX uygulamasının 5. dakikası b) TTX uygulamasının 10. dakikası.



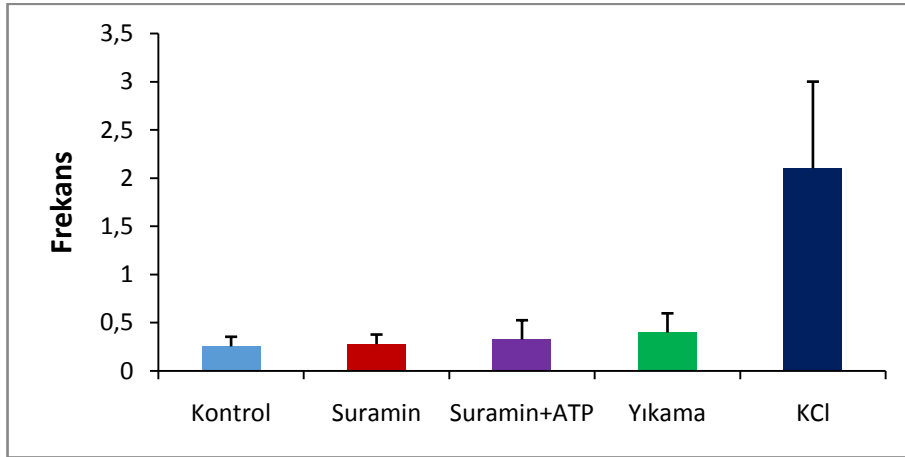
Resim 4.3. Tek bir nörondan kaynaklanan ve açık afterhiperpolarizasyona sahip aksiyon potansiyeli.

Hemi skull preparasyonlarına uygulanan 100 μ M ATP, dura mater trigeminal duysal lif terminallerinde ağrı spike' larını kontrole göre anlamlı derecede artırdı ($p < 0,05$, grafik 4.1) ve bu artışlar ATP reseptörlerinin geniş spektrumlu antagonisti olan Suramin (100 μ) tarafından bloke edildi.



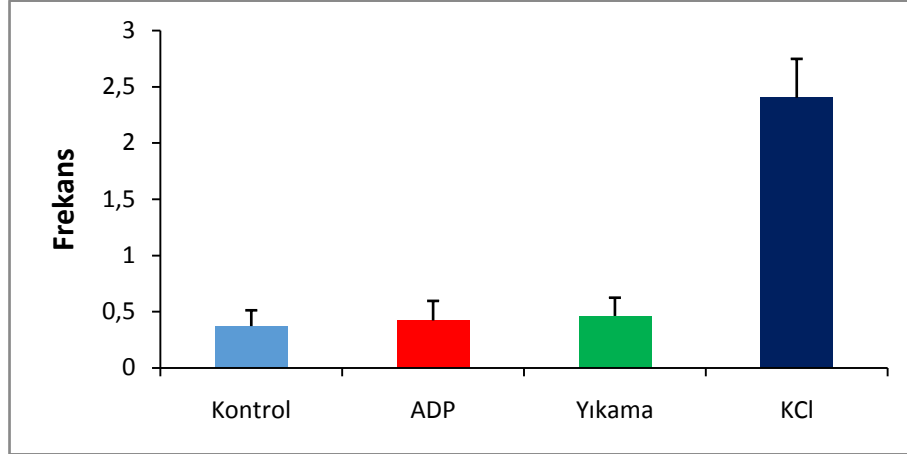
Grafik 4.1. ATP' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' larını tetikleyici etkisi ve bunun suramin tarafından bloke edilmesi. *($p<0,05$), istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı ($n=6$).

Nosiseptörlerden kaynaklanan aksiyon potansiyeli frekansındaki bu artışların engellenmesinin reseptör desensitizasyonu değil de Suramin' in antagonistik etkisi sonucu olduğunu ortaya çıkarmak amacıyla, başka bir gruba önce Suramin ve devamında Suramin ile ATP birlikte uygulandı, sonuçta spike frekansında bir değişme olmadı (grafik 4.2).

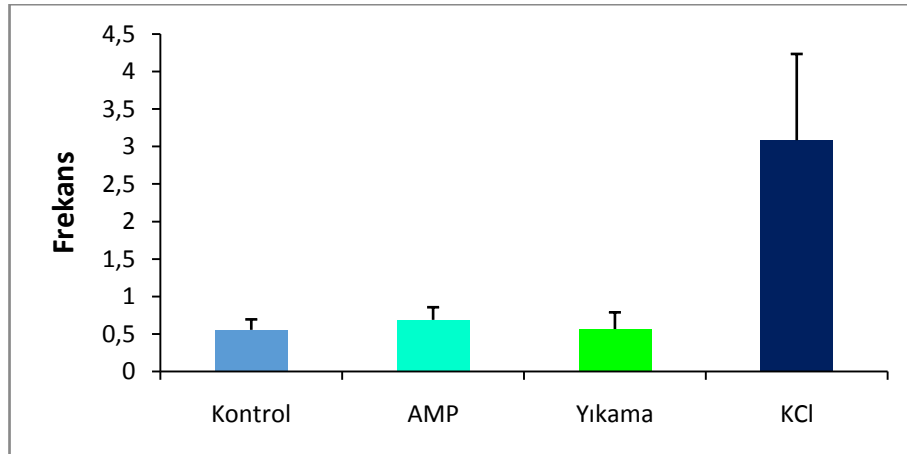


Grafik 4.2. ATP' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' larını tetikleyici etkisinin reseptör desensitizasyonu değil Suramin' in etkisi sonucu bloke edilmesi ($n=6$).

ATP, hücre dışında ektonükleotidazlar tarafından kısa sürede parçalanmaktadır ve ATP yıkım ürünleri olan ADP ve AMP de purinerjik ATP reseptörlerine bağlanabilme yeteneğine sahiptir. ADP (100 μ) ve AMP (100 μ) ayrı gruplara uygulandı ve anlamlı bir etki oluşturmadı (grafik 4.3 ve 4.4).

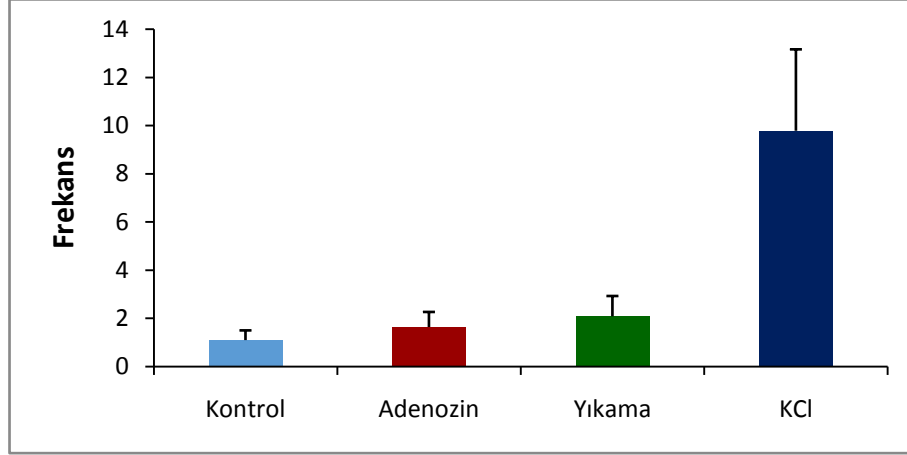


Grafik 4.3. ADP' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' ları üzerine etkisi (n=6).



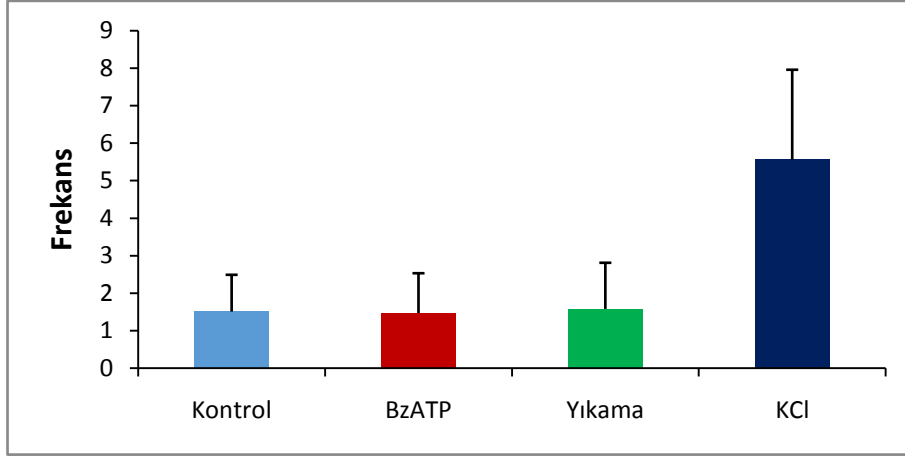
Grafik 4.4. AMP' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' ları üzerine etkisi (n=6).

ATP son yıkım ürünü olan Adenozin' in dura mater duysal sinir terminalleri üzerine etkisini araştırmak için ayrı bir deney grubuna Adenozin (100 μ) uygulandı ve anlamlı bir etki bulunmadı (grafik 4.5).



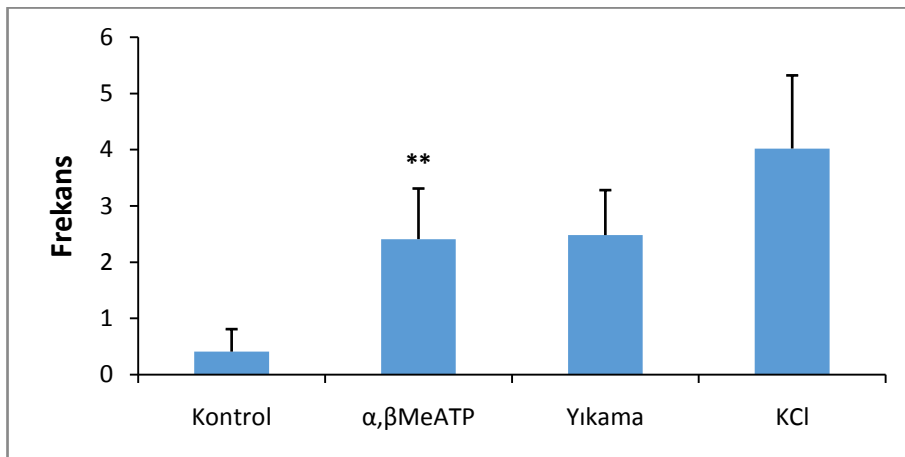
Grafik 4.5. Adenozin' in dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' ları üzerine etkisi (n=6).

ATP' nin dural duysal sinirler üzerine uyarıcı etkisinin mekanizmasını araştırmak amacıyla P2X7 reseptör agonisti olan ve ATP' den 5-10 kat daha güçlü bir şekilde P2X7 reseptörlerine bağlanan BzATP 100 μ M konsantrasyonda uygulandı ancak anlamlı bir etki oluşturmadı (grafik 4.6).

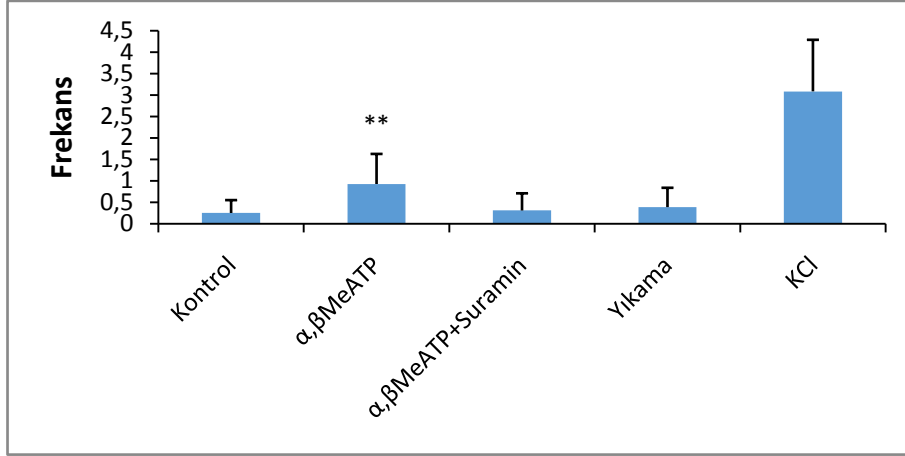


Grafik 4.6. BzATP' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' ları üzerine etkisi (n=6).

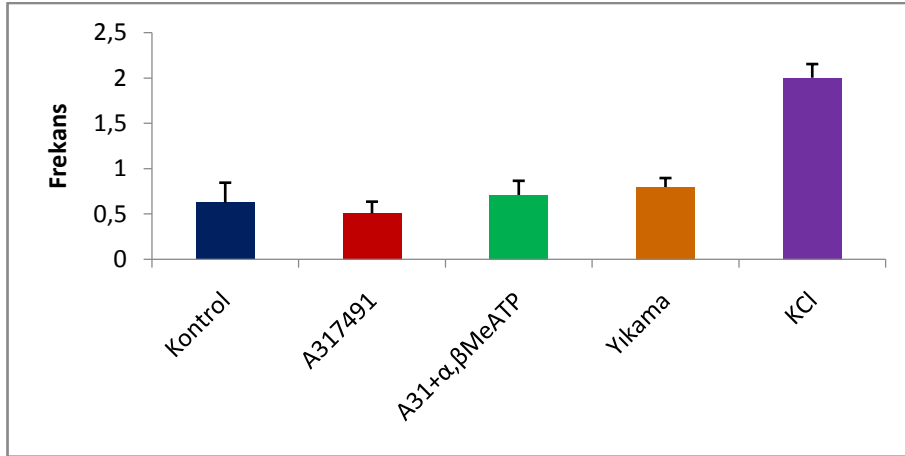
ATP' nin dural duysal sinirler üzerine uyarıcı etkisinin mekanizmasını araştırmak amacıyla ayrı deney gruplarına P2X2, P2X3 ve P2X2/3 reseptör agonisti olan ve bu reseptörlere ATP' den 1000 kat daha güçlü bir şekilde bağlanabilen α,β -MeATP (100 μ M) uygulandı. α,β -MeATP (100 μ M) spike frekansını 3 kat artırdı (grafik 4.7) ve bu artışlar geniş spektrumlu P2 reseptör antagonisti Suramin (100 μ M) ve P2X3 ve P2X2/3 reseptörleri spesifik antagonisti olan A317491 (10 μ M) tarafından ayrı ayrı önlendi (grafik 4.8 ve 4.9).



Grafik 4.7. α,β -MeATP ' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' larını tetikleyici etkisi **($p<0,01$), istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı (n=6).

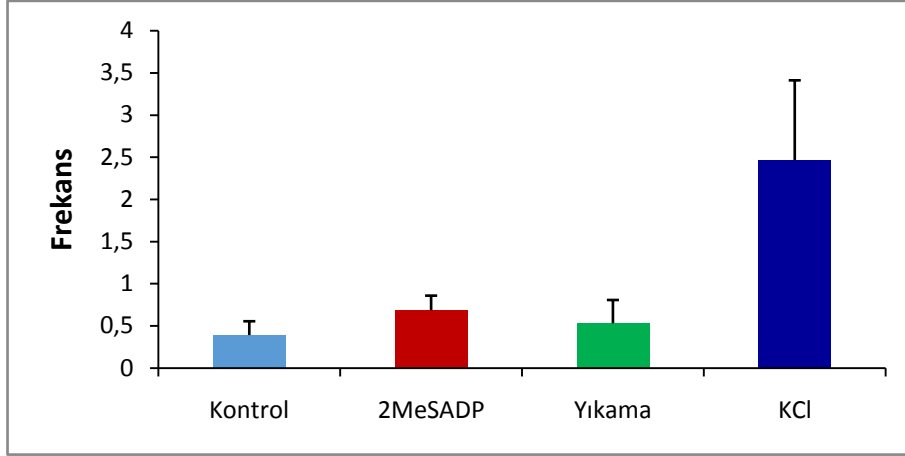


Grafik 4.8. α,β -MeATP ' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' larını tetikleyici etkisi ve bunun suramin tarafından bloke edilmesi. **($p<0,01$, $n=6$).



Grafik 4.9. α,β -MeATP ' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' larını tetikleyici etkisi ve bunun A317491 tarafından bloke edilmesi ($n=6$).

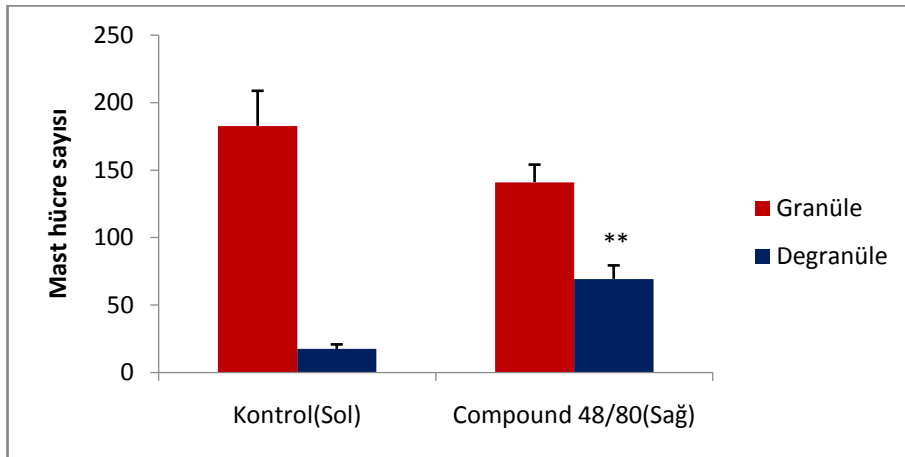
ATP' nin dural duysal sinirler üzerine uyarıcı etkisinin mekanizmasını araştırmak amacıyla ayrı deney gruplarına P2Y1 reseptör agonisti olan ve P2Y reseptörlerine ATP' den daha güçlü bir şekilde bağlanabilen 2-MeSADP (20 μ M) uygulandı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmadı (grafik 4.10).



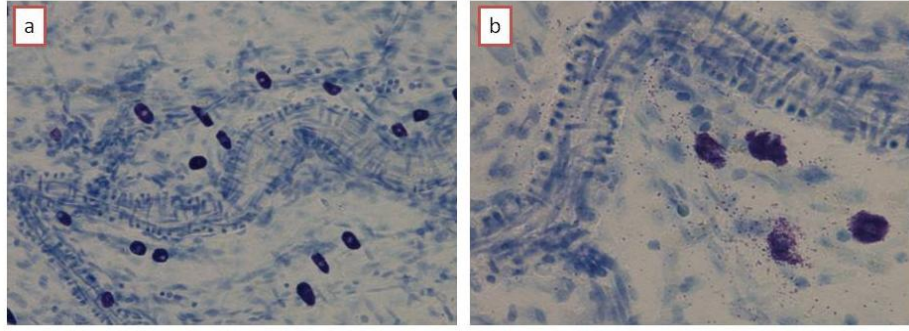
Grafik 4.10. 2-MeSADP' nin dura mater duysal sinirlerinde ağrı spike' ları üzerine etkisi (n=6).

4.2. Dura Mater Mast Hücreleri ve Meningial Arterler

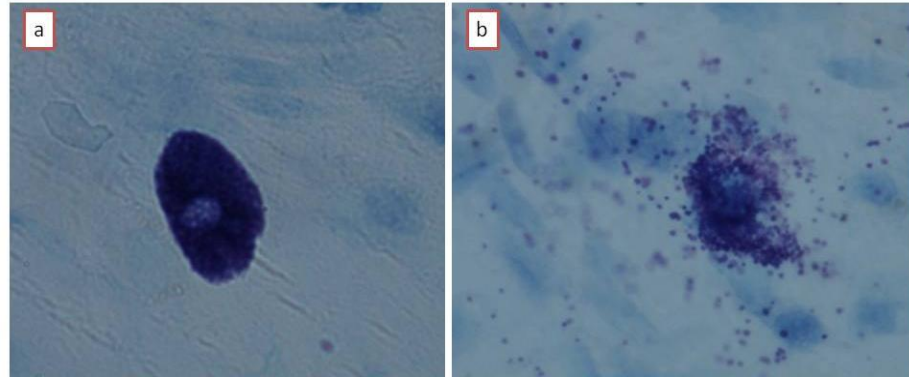
Bir mast hücre degranülatörü olan compound 48/80 (10 µg/ml) toplam mast hücre sayısını değiştirmezken, mast hücre degranülasyonunu kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artırdı ($p < 0,01$, grafik 4.11).



Grafik 4.11. Compound 48/80' in dura mater mast hücreleri üzerine degranüle edici etkisi. **($p < 0,01$, n=6).



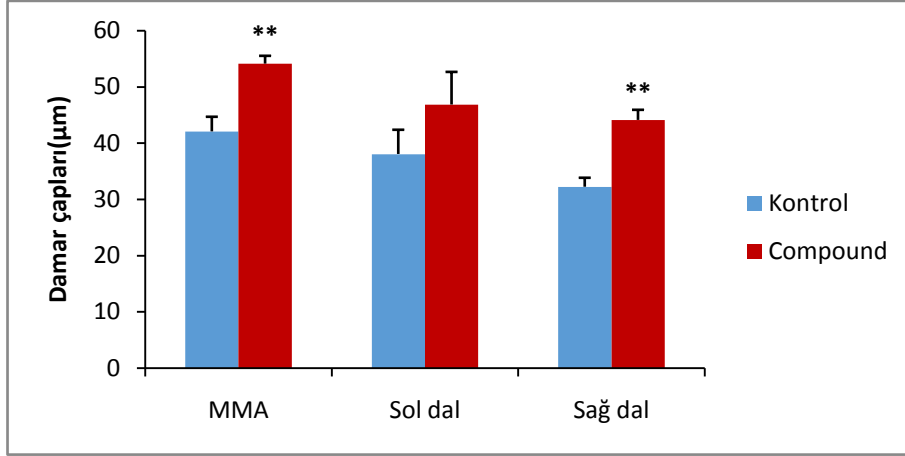
Resim 4.4. Kontrol ve compound 48/80 uygulaması sonrası dural mast hücrelerinin görünümü 20X. a) kontrol grubu granüle mast hücreleri b) compound grubu degranüle mast hücreleri.



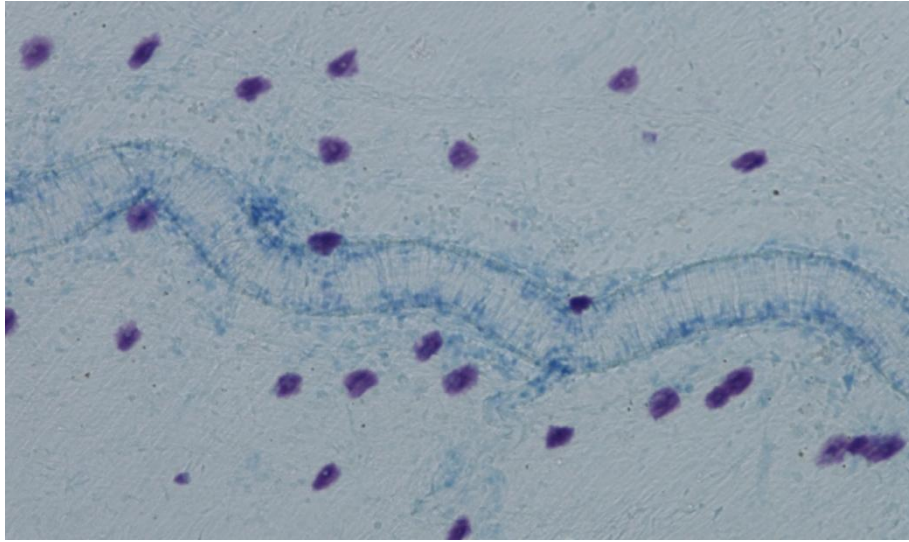
Resim 4.5. Granüle ve degranüle mast hücrelerinin görünümü 100X. a) granüle mast hücresi b) degranüle mast hücresi.

Resim 4.4 ve 4.5' te kontrol grubu ve compound 48/80' e maruz kalan mast hücrelerinin granülasyon ve degranülasyon durumları görülmektedir.

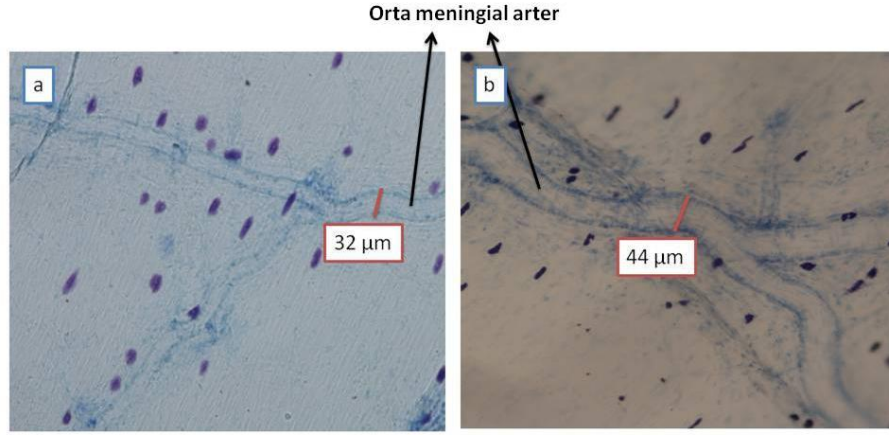
Compound 48/80 orta meningeal arter ve bu arterin sağ dalı çapında kontrole göre anlamlı düzeyde vazodilatasyona neden olurken ($p < 0,01$, grafik 4.12, resim 4.6 ve 4.7) sol dal arter çapındaki artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı.



Grafik 4.12. Compound 48/80' in meningiyal arterler üzerine vazodilatör etkisi (MMA: middle meningial arter). **($p < 0,01$, $n=6$).

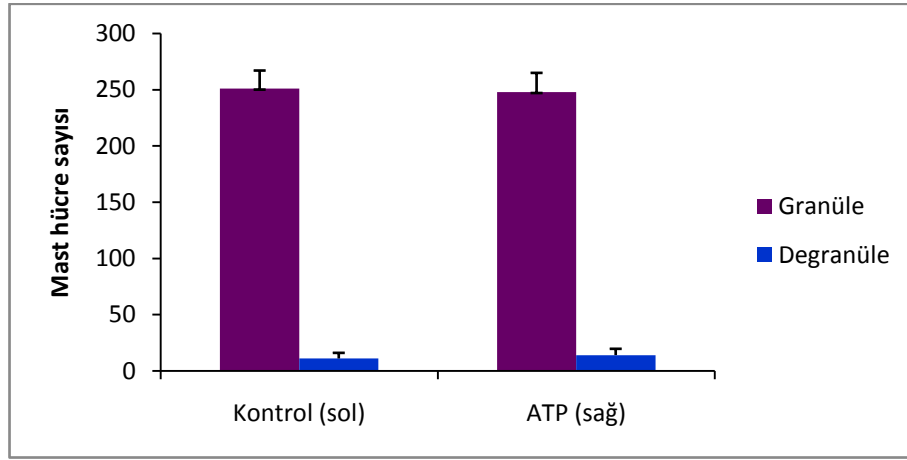


Resim 4.6. Dura mater' de middle meningiyal arter ve etrafında mast hücrelerinin görünümü 20X.

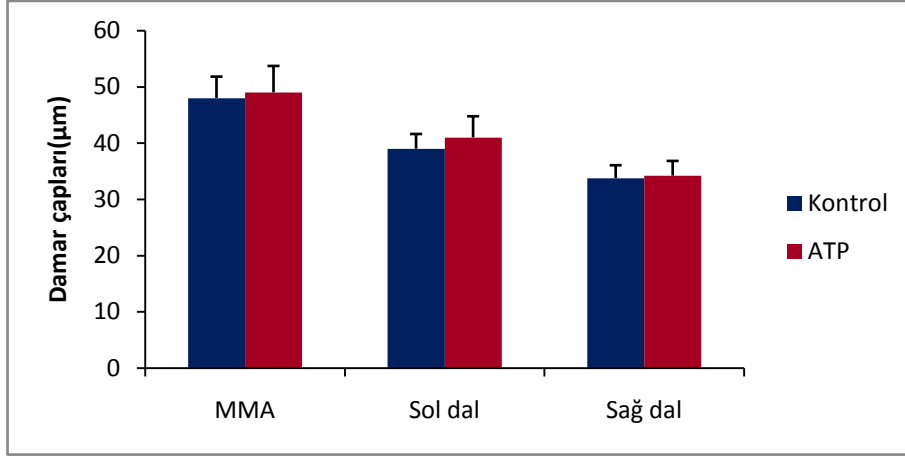


Resim 4.7. Dura materde compound 48/80' in kontrol grubuna göre arterleri dilate ettiği görülmektedir 10X. a: kontrol b: compound 48/80.

ATP (100 µM) dural mast hücre sayısına, dural mast hücre degranülasyonuna ve meningial arter çapları üzerine bir etki oluşturmadi (grafik 4.13 ve 4.14).



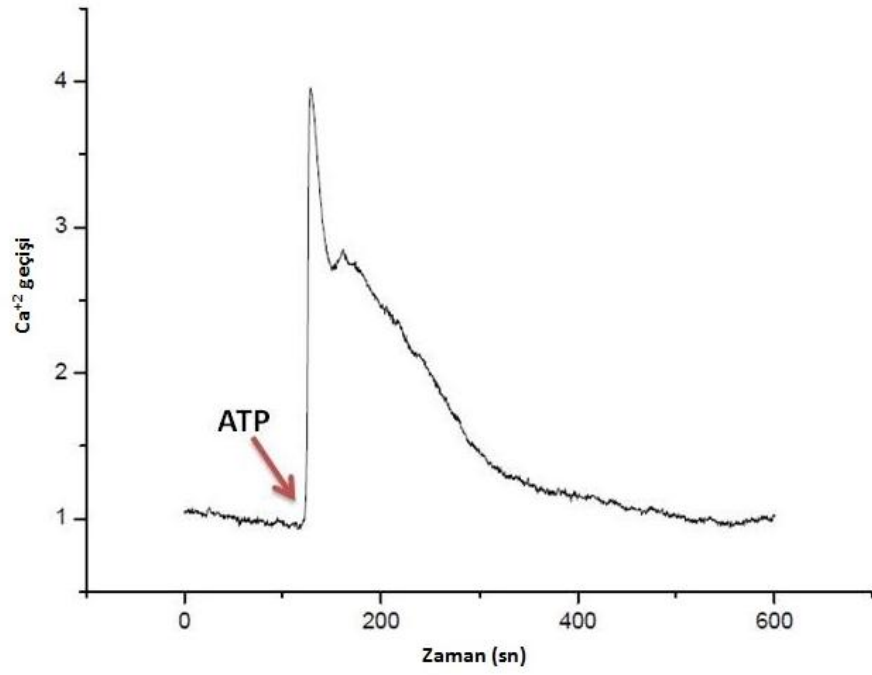
Grafik 4.13. ATP' nin dural mast hücre sayısı ve degranülasyonu üzerine etkisi (n=6).



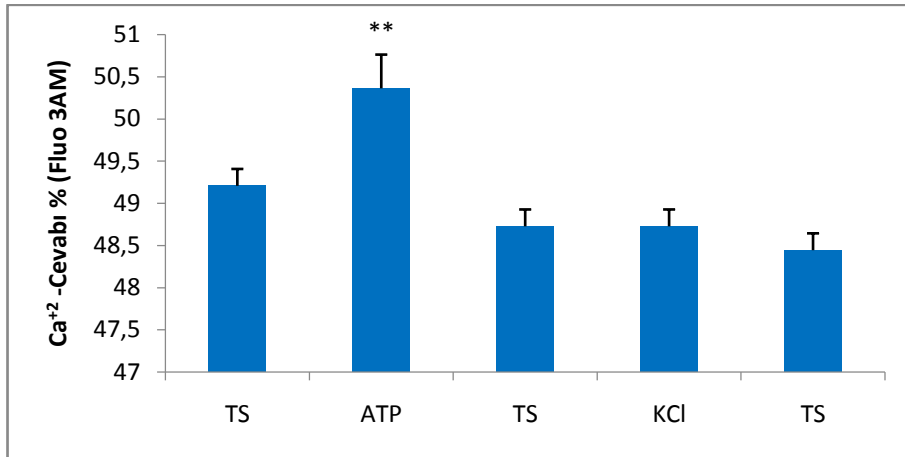
Grafik 4.14. ATP' nin meningeial arterler üzerine etkisi (MMA: middle meningial arter, n=6).

4.3. Ca^{+2} -Görüntüleme

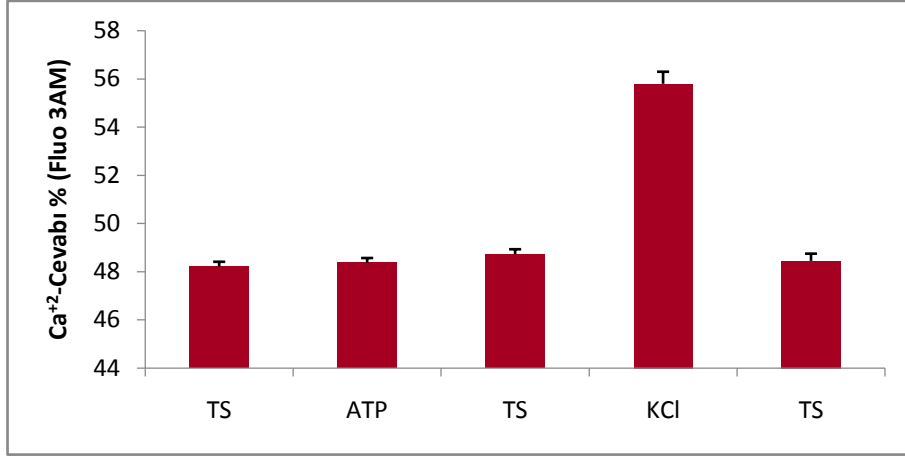
Yapılan Ca^{+2} -görüntüleme çalışmaları sonucu ATP (100 μ M) trigeminal gangliyondan elde edilen primer saf nöronlarda Ca^{+2} geçişlerini anlamlı düzeyde artırdı ($p<0,01$, grafik 4.13 ve 4.14) ancak peritoneal mast hücreleri üzerinde bir etki oluşturmadi (grafik 4.15).



Grafik 4.15 ATP eklenmesi ile trigeminal gangliyon nöronlarında Ca^{+2} geğişlerinin artması. ******($p<0,01$).

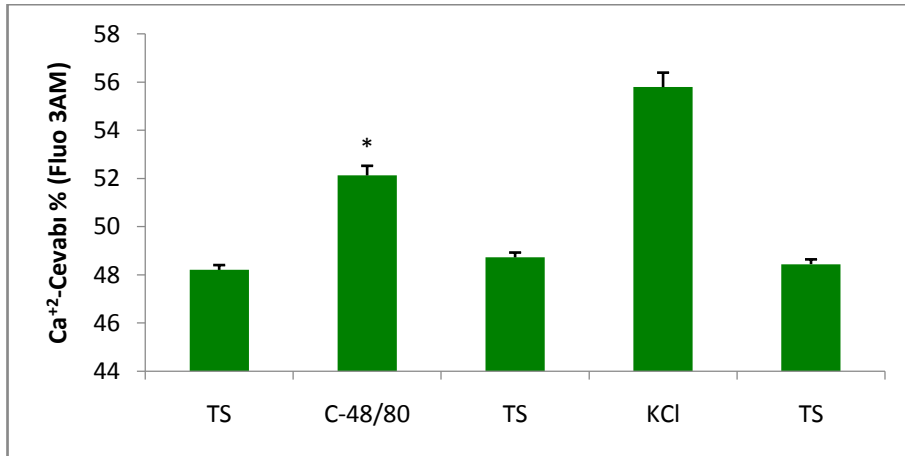


Grafik 4.16. ATP' nin trigeminal gangliyon nöronlarında Ca^{+2} geğişlerini anlamlı arttırması (TS: temel solüsyon). ******($p<0,01$).

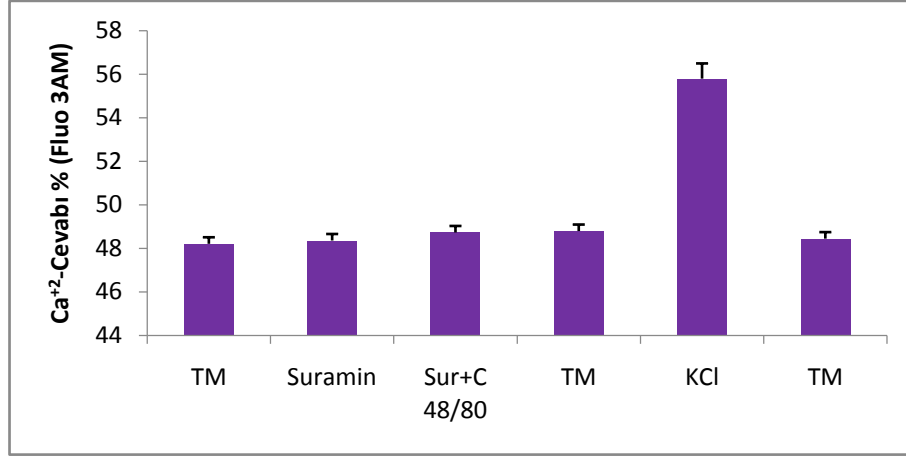


Grafik 4.17. ATP' nin peritoneal mast hücreleri üzerine etkisi (TS: temel solüsyon).

Diğer taraftan nöron-mast hücre ko-kültürüne uygulanan compound 48/80 (10 µg/ml) Ca²⁺ geçişlerini anlamlı artırırken (p<0,05, grafik 4.16) bu artış Suramin (100 µM) tarafından önlendi (grafik 4.17).



Grafik 4.18. Compound 48/80 'in nöron-mast hücre ko-kültüründe Ca²⁺ geçişlerini artırması (TS: temel solüsyon). *(p<0,05).



Grafik 4.19. Nöron-mast hücre ko-kültüründe Compound 48/80 'in neden olduğu Ca^{+2} geçişlerindeki artışın Suramin tarafından önlenmesi (TS: temel solüsyon).

5. TARTIŞMA

Sunulan çalışma ATP' nin migren patofizyolojisindeki rolüne ilişkin yapılan ilk çalışma olması ve patofizyolojiye dair elde edilen sonuçlar açısından büyük önem taşımaktadır. İlk defa Wolff' un vasküler teorisi (11) ile başlayan migren patofizyolojisini aydınlatma çabaları, üzerinden yıllar geçmiş olmasına rağmen hala devam etmektedir. Teşhis edilebilir herhangi bir spesifik serebral patolojisi olmaması (26) migren patofizyolojisinin anlaşılmasını ve buna bağlı olarak etkin bir tedavisinin geliştirilmesini zorlaştırmıştır. İlerleyen yıllarda migren patofizyolojisini açıklamakta vasküler teorinin tek başına yetersiz kalması, migren baş ağrısının tam iyileşme sağlayan etkin bir tedavi şeklinin geliştirilememesi ve her geçen gün artan bulgular migren patofizyolojisine dair yeni teorilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Vasküler teoriye göre vazodilatasyon sonucu perivasküler olarak yerleşim gösteren mekanosensitif nosiseptörlerin damarların genişlemesine cevap olarak ateşleme yaptığı ve buna bağlı olarak migren baş ağrısının geliştiği varsayılmaktadır. Ancak sonraki çalışmalar serebral damarlardaki vazodilatasyonun migren baş ağrısı oluşumundan tek başına sorumlu olmadığını bunun patofizyolojinin nedenlerinden sadece bir tanesi olduğunu ortaya koymuştur. Bu doğrultudaki araştırmalar sonucunda damar değişikliklerinin nöronal bir aktivasyonu takiben ortaya çıktığını savunan nörovasküler teori ortaya çıkmıştır (18, 136). Dalessio (18) tarafından ortaya atılan ve daha sonra Moskowitz (137) tarafından geliştirilen bu teoriye göre periferik trigeminal aksonların aktivasyonu antidromik olarak içerdiği nöropeptidlerin (CGRP, SP, NKA) perivasküler alana salınmasına ve vazodilatasyona, kan akımı artışına ve plazma protein ekstrasvazasyonuna yani nörojenik inflamasyona neden olmaktadır ancak bu steril bir inflamasyondur. Meningiyal ve diğer kan damarlarına yakın yerleşim gösteren trigeminal sinirin akson terminallerinden salınan SP, NKA ve CGRP gibi nöropeptitler kan damarlarının çevresinde inflamatuvar bir cevap oluşturmakla kalmayıp aynı zamanda sinir terminallerini duyarlılaştırmakta ve sonuçta bu durum uzun süreli baş ağrısını devam ettiren bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer taraftan Leao (104) ilk defa migren patofizyolojisinde esas rolü kortikal yayılan depresyon' un oynadığını ileri sürmüştür. Nöronal ve gliyal

membranların yavaş bir şekilde ilerleyen depolarizasyonunu takiben nöronal aktivitenin uzun süreli baskılanması şeklinde tanımlanan KYD' nin direk olarak trigeminal sinirleri uyardığı öne sürülmektedir (19,20,26). Beynin bir odağından başlayan ve beyin boyunca ilerleyen depolarizasyon dalgası intrakranyal ve dural kan damarlarını innerve eden nosiseptif trigeminal lifleri uyarmakta uyarılan bu liflerden SP, CGRP, VIP, NKA, 5-HT ve NO gibi vazoaaktif nöromediyatörlerin salınımı gerçekleşmekte sonuçta bu moleküller de baş ağrısına neden olmaktadır (48,49,53-55). KYD nedeni olarak genetik bazı iyon kanalopatileri, ekstrasellüler K^{+1} veya glutamat düzeyindeki artışlar ileri sürülse de KYD' yi ortaya çıkaran esas faktör hala bulunamamıştır.

Bahsedilen teoriler birlikte değerlendirildiğinde ağrının daha çok serebral, dural kan damarlarında vazodilatasyon, bu vazodilatasyona bağlı olarak trigeminal sinir terminallerinin uyarılması, plazma protein ekstrasvazasyonu ve bunun neden olduğu steril nörojenik inflamasyon, damarlara yakın yerleşim gösteren baş ve yüzün ağrı sinyallerini beyindeki ağrı merkezine taşıyan trigeminal duysal sinirlerin sensitizasyonu veya aktivasyonu ile ilişkili olduğu ancak bu denklemlerde rol alan moleküllerin, etki mekanizmalarının ve kaynaklarının farklı olduğu açıktır. Bu hipotezden hareketle sunulan çalışmada pürin nükleotitlerin özellikle de ATP' nin migren patofizyolojisindeki rolünü araştırdık.

ATP' nin hücre içi enerji kaynağı olmasının dışında bir nörotransmitter olarak işlevi olduğunun fark edilmesi (117) ve bazı purinoseptörleri üzerinden dorsal kök gangliyonu (DRG) nöronlarında somatik periferel ağrının iletilmesinde rolü olduğunun gösterilmesi (138) migren baş ağrısı gibi visseral ağrılarda da rolü olabileceğine dair kapı aralamıştır. Bununla uyumlu olarak çalışmamızda ATP' nin dural trigeminal sinir terminallerinde ağrı *spike*' larını tetiklediğini bulduk. ATP' nin sinir sisteminde temel eksitatör nörotransmitter olarak görev yaptığına dair kanıtlar (139,140) da ATP' nin ağrının iletilmesi ile ilgili bulgularımızı desteklemektedir. ATP purinoseptörleri üzerinden etkisini direk gösterir ancak ektonükleotidazlar tarafından hızla yıkıma uğradığı için yıkım ürünleri olan ADP, AMP ve adenosinin purinoseptörler üzerinden etkisi ise aslında ATP' nin direk değil dolaylı bir etkisidir. ATP, ADP ve AMP P2 reseptörleri üzerinden etkilerini gösterirken adenosin ise P1 reseptörleri üzerinden etki eder (141). Non-selektif katyon kanalı olan ATP' nin P2X

reseptörleri hücre içi pozitif yük artışı ile eksitator cevaplara aracılık eder. Daha önce trigeminal gangliyon ve dorsal kök gangliyon nöronları üzerinde yapılan *patch-clamp* çalışmaları ATP' nin hücre içi Ca^{+2} u artırarak ağrının geçişinde rolü olduğunu önermişlerdir (75,142). Elektrofizyolojik çalışmalar duysal nöronlardaki P2X reseptörlerinin periferden medulla spinalise ağrı sinyalinin oluşumunda ve modülasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir (138).

Sunulan çalışmada meningeal nosisepsiyona ATP' nin etkisi ex-vivo olarak ilk kez çalışılmıştır. Elde ettiğimiz ATP' nin ağrı *spike*' larını tetikleyici etkisi (ekstrasellüler ATP postsinaptik membranda bulunan ektonükleotidazlar tarafından hızlı bir şekilde yıkıldığı için) yıkım ürünleri olan ADP, AMP ve adenozinin herhangi birine veya bunların kombinasyonlarına da ait olabilirdi çünkü bu pürin nükleotitlerden ADP ve AMP P2; adenozin ise P1 reseptörlerinin endojen ligandlarıdır. Bunu aydınlatmak amacıyla ADP, AMP ve adenozin farklı preparasyonlara uyguladık. ATP' nin bu üç yıkım ürünü de ağrı *spike*' ları üzerine anlamlı bir etki oluşturmadı, bu durum dural trigeminal sinir nosiseptörlerinin ATP' nin direk etkisi sonucu uyarıldığını göstermektedir. Bu sonuçlara göre ATP pürinerjik reseptörlerine, yıkım ürünleri olan ADP ve AMP' den daha güçlü ve uzun süre bağlanma yeteneğine sahip olabilir.

Diğer taraftan P1 reseptörlerine bağlanma yeteneğinde olan ve dorsal kök gangliyonu nöronlarında A2A reseptörleri üzerinden ağrının geçişinde rol oynadığı ileri sürülen (142) adenozin, çalışmamızda trigeminal duysal liflerde ağrı *spike*' larını kısmen artırma yönünde bir etki gösterse de bu etki istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. Çalışmamızda ATP' nin dural trigeminal duysal sinir terminallerini uyararak ağrı *spike*' larını tetiklemiş olması ATP' nin duysal nöronlarda ağrı geçişine aracılık ettiğini öneren önceki çalışmalarla uyumludur. Elektrofizyolojik kayıtları aldığımız trigeminal sinirin mandibular bölümünün *nervus spinosus* dalı ince çaplı miyelinsiz C ve miyenli Aδ duysal liflerini içermektedir. Bu duysal nöronlarda tüm P2X reseptörleri (P2X1-P2X7) mevcuttur (139). Ancak küçük ve orta çaplı primer duysal nöronlarda başlıca P2X3 reseptör alt tipinin daha fazla oranda eksprese olduğu bilinmektedir (143-145). ATP' nin metabotropik reseptörlerinden olan P2Y1, P2Y2, P2Y4 ve P2Y6 mRNA' ları DRG, nodoz ve trigeminal gangliyon nöronlarında eksprese olmaktadır (85). ATP' nin bu etkisini hangi reseptörler üzerinden

gösterdiğini araştırmak amacıyla kullandığımız α,β -MeATP P2X2, P2X3 ve P2X2/3 reseptör agonistidir ve bu reseptörlere ATP' den 1000 kat daha güçlü bir şekilde bağlanabilmektedir. Çalışmamızda α,β -MeATP' nin dural duysal trigeminal sinirlerde ağrı *spike*' larını 3 kat artırdı ve bu artışlar geniş spektrumlu P2 reseptör antagonisti olan suramin ve P2X3 ve P2X2/3 reseptörlerinin spesifik antagonisti olan A317491 tarafından ayrı ayrı bloke edildi. Diğer taraftan P2X7 reseptör agonisti BzATP ve P2Y1 reseptör agonisti olan 2-MeSADP dural duysal trigeminal sinirler üzerinde bir etki oluşturmadı. Bu sonuçlar ATP' nin dural duysal trigeminal sinir terminallerinde P2X2, P2X3 ve P2X2/3 reseptörleri aracılığıyla ağrı *spike*' larını tetiklediğini göstermektedir. Bu duysal sinirleri oluşturan hiç kuşkusuz miyenli A δ ve miyelinsiz C-lifleridir ve yukarıda bahsedildiği gibi çok miktarda P2X3 reseptörü içermektedir. Daha önceki çalışmalardan bazıları metabotropik P2Y1, P2Y2 ve P2Y4 reseptörlerinin nosisepsiyonla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (82) ancak çalışmamızda 2-MeSADP (P2Y1, P2Y12, P2Y13 reseptörleri için spesifik agonist) ve ADP (P2Y2 ve P2Y13 reseptörleri için spesifik agonist) dural duysal trigeminal lifler üzerinde bir etki oluşturmadı. Elde ettiğimiz bu bulgular ATP' nin meninkslerdeki ağrı tetkleyici etkisinin P2Y1, P2Y2, P2Y12 ve P2Y13 reseptörleri üzerinden olmadığını göstermiştir. Dolayısıyla bu etkide ATP' nin metabotropik P2Y reseptörlerinin rolünün olmadığı yada çok az olabileceği söylenebilir. Bir çok araştırıcı merkezi ve periferik nöronlarda P2X7 reseptörü bulunmadığını fakat az sayıda araştırıcı ise bulunduğunu ileri sürmektedir (146,147) P2X7 reseptörleri selektif olarak, mast hücreleri, lenfositler, eritrositler, fibroblastlar ve perifereal makrofajlar gibi hematopoietik kökenli hücrelerde ekspresse olmaktadır (148). Fonksiyonel P2X7 reseptörleri MSS' de mikrogliya ve Schwann hücreleri üzerinde yerleşmişlerdir (149,150). P2X7 reseptör agonisti olan ve ATP' den 5-10 kat daha güçlü bir şekilde P2X7 reseptörlerine bağlanan BzATP' nin çalışmamızda dural trigeminal duysal nosisseptörleri aktive etmemiş olması nöronlarda fonksiyonel P2X7 reseptörlerinin olmadığını ileri süren araştırıcıları desteklemektedir.

Trigeminal gangliyon nöronları üzerinde yaptığımız Ca^{+2} -görüntüleme çalışması ile ATP hücre içine Ca^{+2} geçişlerini anlamlı düzeyde artırdı, bu sonuç elektrofizyolojik kayıtlardan elde ettiğimiz ve yukarıda anlatılan bulgularla birlikte değerlendirildiğinde ATP' nin P2X reseptörleri üzerinden hücre içi depolarizasyonu

önemli ölçüde tetiklediğini göstermektedir. Bu hücre içi pozitif yük artışı trigeminal duysal nöronlarda P2X reseptörleri üzerinden ağrının başlamasına yol açmaktadır. Sinirler tarafından yoğun bir şekilde innerve edilmiş olan dura mater çok sayıda mast hücresi içermektedir (37,39). Mast hücreleri, granüllerinde nosiseptif nükleotitler (adenozin, ATP) ve nöropeptitler içerirler ve bunlar için hücre yüzeyinde reseptör bulundururlar. Çalışmamızda compound 48/80 ile tetiklenen hücre içi Ca^{+2} artışının suramin ile engellenmesi bu Ca^{+2} akımlarına ATP' nin aracılık ettiğini göstermektedir.

Mast hücrelerinin membranında bir çok reseptörün yanında purinoseptörler, nörokinin-1, CGRP-1 reseptörleri de bulunmaktadır (40,151). Dura materdeki kan damarlarına yakın yerleşim gösteren sinirlerden salınan vazoaaktif nöropeptitler mast hücrelerini tetikleyebilmekte ve buna karşılık mast hücreleri degranülasyon sonucu ortama saldıkları SP, adenosin, ATP, bradikinin, histamin, serotonin, VIP gibi moleküller aracılığı ile dural duysal sinirleri ve kan damarlarını etkileyerek nörojenik inflamasyon ve dolayısıyla baş ağrısında rol oynayabilmektedir. Bu bilgilerle uyumlu olarak çalışmamızda trigeminal gangliyon nöronları ve peritoneal mast hücreleri ko-kültüründe bir mast hücre degranülatörü olan compound 48/80' in Ca^{+2} geçişlerini artırması ve bu artışların suramin tarafından bloke edilmesi, mast hücrelerinin degranülasyon sonucu ortama saldığı ATP aracılığı ile trigeminal nosiseptörleri aktive ettiğini göstermiştir.

Bu bulgular baş ağrılarının oluşumunda mast hücre-nöron karşılıklı etkileşiminin önemli bir rol oynadığını farklı açıdan bir kez daha doğrulamıştır. Bu mast hücreleri dura materde hem duysal nöronlara hem de damarlara bitişik olarak bulunmaktadır. Daha önceki çalışmalar mast hücre aktivasyonu ve degranülasyonu sonucu nöroaktif ve vazoaaktif bradikinin, histamin, prostaglandinler, $TNF-\alpha$, vasküler endotelyal büyüme faktörü ve serotonin gibi moleküllerin ortama salınması ile duysal nöronlar üzerinde CGRP salınımını tetikleyerek bir pozitif feed-back döngüsü oluşturduğunu böylece ağrıya katıldığını önermişlerdir (151,152) ancak çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular bu döngüde ATP' nin de inkar edilemez bir rolü olduğunu göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmalara göre dura materi innerve eden mekano-sensitif nöronlar mast hücre degranülasyonundan sonra kısa süreli aktivite artışı göstermekte ve hiperaktivite saatlerce sürmektedir, bir antimigren ilaç

olan sumatriptanın trigeminal nosiseptörlerden CGRP salınımını önlediği ve TNC üzerine mast hücre degranülasyonunun etkisini bloke ettiği bilinmektedir (60, 61), mast hücre degranülasyonunun bu uyarıcı etkisi bulgularımıza göre muhtemelen ortama saldığı ATP' nin nosiseptörleri uyarması ve sensitize etmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu olarak daha önce Levy ve arkadaşlarının (44) yaptığı bir çalışmada compound 48/80' in trigeminal gangliyonda meningeal nosiseptörlerin uzun süreli aktivasyonunu tetiklediği düşünülürse bu etkinin mast hücrelerinden salınan ATP' den kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda ayrıca compound 48/80 dural mast hücre sayısını etkilemezken orta meningeal arter ve dallarında vazodilatasyon oluşturmuştur. Migrenin nörojenik inflamasyon teorisine göre nöropeptitler, mast hücreleri ve mast hücre mediyatörleri parakrin aktivasyonun üçlü saç ayağını oluştururlar (151,152). Mast hücrelerinden degranülasyon sonucu salınan SP, adenozin, ATP, bradikinin, histamin, serotonin, VIP gibi moleküllerin dural duysal sinirleri ve kan damarlarını etkileyerek nörojenik inflamasyonda rol oynadığı düşünülürse çalışmamızda compound 48/80' in meningeal arterleri dilate etmesi mast hücrelerinden salınan bu vazoaktif maddelerin önemli rolünü bir kez daha ortaya koymaktadır.

Ayrıca çalışmamızda dural preparasyonlara *ex-vivo* olarak ATP uygulamasının dural damarlar ve mast hücreleri üzerinde herhangi bir etki oluşturmaması compound 48/80' in dolaylı vazodilatör etkisinin ATP aracılığıyla olmadığını fakat muhtemelen CGRP, SP, bradikinin gibi vazoaktif nöropeptitler aracılığıyla olduğunu desteklemektedir. Mast hücreden yoksun ve NK1 nakavt farelerde stresle tetiklenmiş dural vasküler permeabilite gelişmemesi (153) de mast hücre degranülasyonu sonucu ortama salınan vazoaktif nöropeptitlerin plazma protein ekstrasvazasyonu aracılığı ile nörojenik inflamasyonda dolayısıyla baş ağrısında önemli bir rol oynadığını desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmadan elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda ATP' nin bazal serebral ve dural kan damarlarının yakınında yerleşmiş olan primer afferentlerin nosiseptif terminallerini aktive ederek migren baş ağrısına katkıda bulunduğu söylenebilir. ATP bu etkisini dural duysal trigeminal sinir terminallerinde bulunan P2X2, P2X3 ve P2X2/3 reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirmektedir. ATP meninkslerde ağrı *spike'* larını tetikleyerek migren patofizyolojisinde direk rol oynamaktadır. ATP' nin nosiseptörleri aktive edici etkisinde iyonotropik P2X7; metabotropik P2Y1, P2Y2, P2Y12 ve P2Y13 reseptörlerinin rolünün olmadığı anlaşılmıştır. ATP trigeminal gangliyon nöronlarında hücre içine Ca^{+2} geçişlerini artırarak baş ve yüzün ağrı sinyallerini taşıyan trigeminovasküler sistemi uyarmaktadır. Peritoneal mast hücreleri ve trigeminal gangliyon nöronlarının birlikte kültürü yapıldığında, mast hücre degranülasyonu sonucu salınan ATP trigeminal gangliyon nöronlarını uyarmaktadır. Mast hücrelerinden salınan vazoaktif moleküller meningeal arterleri dilate ederek nörojenik inflamasyona dolayısıyla migren ağrısına neden olmaktadır.

ATP, bu dilate edici endojen maddeler arasında değildir. ATP, P2X2, P2X3 ve P2X2/3 iyonotropik reseptörleri üzerinden direk, mast hücreleri ise mast hücre-nöron etkileşimi sonucu dolaylı olarak migren patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Her ne kadar bu deneysel koşullarda ADP ve AMP' nin etkileri bulunmasa da ADP ve AMP' nin P2 reseptörleri üzerine etkilerinin *patch-clamp* tekniği ile araştırılması faydalı olacaktır. P2X2, P2X3 ve P2X2/3 reseptör antagonistleri migrenin yeni tedavi seçeneği olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders. 2nd edition. *Cephalalgia*, **2004**; 24 (1): 16-151.
2. **Masterson CG, Durham PL.** DHE repression of ATP-mediated sensitization of trigeminal ganglion neurons. *Headache*, **2010**; 50(9):1424-1439.
3. **Zhang X, Kainz V, Zhao J, Strassman AM, Levy D.** Vascular extracellular signal-regulated kinase mediates migraine-related sensitization of meningeal nociceptors. *Ann Neurol*, **2013**; 73(6):741-750.
4. **Pietrobon D.** Familial hemiplegic migraine. *Neurotherapeutics*, **2007**; 4(2):274-284.
5. **Arulmozhi DK, Veeranjanyulu A, Bodhankar SL.** Migraine: current therapeutic targets and future avenues. *Curr Vasc Pharmacol*, **2006**;4(2):117-128.
6. **Lipton RB, Derby CA.** Migraine with aura. *BMJ*, **2008**; 337:361-362.
7. **Izzati-Zade KF.** The Role of Serotonin in the pathogenesis and clinical presentations of migraine attacks. *Neurosci Behav Physiol*, **2008**; 38:501–505.
8. **Stovner LJ, Zwart JA., Hagen K, Terwindt, GM., Pascual J.** Epidemiology of headache in Europe. *European Journal of Neurology*, **2006**;13(4): 333-345.
9. **Pietrobon D.** Migraine: New molecular mechanisms. *Neuroscientist*, **2005**;11:373–386.
10. **Siva A.** Baş Ağrısı Epidemiyolojisi İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Baş, Boyun, Bel Ağrıları Sempozyum Dizisi No: **2002**; s. 9-14.
11. **Wolff HG, Marcussen RM, Kunkle EC.** Studies on headache; analysis of the contractile state of the cranial vascular tree in migraine. *Trans Am Neurol Assoc*, **1948**;73: 14-17.
12. **Appenzeller O.** Pathogenesis of migraine. *Med Clin North Am*, **1991**; 75 (3): 763-789.
13. **De Vries P, Heiligers JPC, Villalon CM, Saxena PR.** Blockade of porcine carotid vascular response to sumatriptan by GR127935, a selective 5-HT1D receptor antagonist. *Br J Pharmacol*, **1996**;118:85-92.
14. **Kristiansen KA, Edvinsson L.** Neurogenic inflammation: a study of rat trigeminal ganglion. *J Headache Pain*, **2010**;11(6):485-495.
15. **Moskowitz MA.** Pathophysiology of headache--past and present. *Headache*, **2007**; 47(1):58-63.
16. **Peroutka SJ.** Neurogenic inflammation and migraine: implications for the therapeutics. *Molecular Interventions*, **2005**; 5:304-311.

17. **Spierings EL.** Spreading depression, neurogenic inflammation, and the parallel theory of migraine pathogenesis. *Headache*, **2001**;41(9):911-913.
18. **Dalesio DJ.** Vascular permeability and vasoactive substances: Their relationship to migraine. *Adv. Neurol.* **1974**; 4:395–401.
19. **Charles AC, Baca SM.** Cortical spreading depression and migraine. *Nat Rev Neurol*, **2013**; 9(11): 637 - 644.
20. **Costa C, Tozzi A, Rainero I, Cupini LM, Calabresi P, Ayata C, Sarchielli P.** Cortical spreading depression as a target for anti-migraine agents. *J Headache Pain*, **2013**;14(1):1-18.
21. **Eikermann-Haerter K, Negro A, Ayata C.** Spreading depression and the clinical correlates of migraine. *Rev Neurosci*, **2013**; 24(4):353-363.
22. **Silberstein SD.** Migraine pathophysiology and its clinical implications. *Cephalalgia*, **2004**;24(2):2-7.
23. **Leão AA, Morison RS.** Propagation of spreading cortical depression. *J. Neurophysiol*, **1945**; 8: 33–45.
24. **Franceschini A, Vilotti S, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Nistri A, Fabbretti E.** TNF α levels and macrophages expression reflect an inflammatory potential of trigeminal ganglia in a mouse model of familial hemiplegic migraine. *PLoS One*, **2013**;8(1):1-12.
25. **Brietzke E, Mansur RB, Grassi-Oliveira R, Soczynska JK, McIntyre RS.** Inflammatory cytokines as an underlying mechanism of the comorbidity between bipolar disorder and migraine. *Med Hypotheses*, **2012**;78(5):601-615.
26. **Bozoghlanian M, Vasudevan S.** Migraine pathophysiology. *Pain Manag*, **2011**; 1(4):337-352.
27. **Wolff HG, Tunis MM.** Analysis of cranial artery pressure pulse waves in patients with vascular headache of the migraine type. *Trans Assoc Am Physicians*, **1952**; 65:240-244.
28. **Ostfeld AM, Wolff HG.** Arterenol (norepinephrine) and vascular headache of the migraine type; studies on headache. *AMA Arch Neurol Psychiatry*, **1955**;74(2):131-136.
29. **Willems EW, Valdivia LF, Villalon CM, Saxena PR.** Possible role of a adrenoceptor subtypes in acute migraine therapy. *Cephalalgia*, **2003**;23:245-257.
30. **De Vries P, Willems EW, Heiligers JP, Villalon CM, Saxena PR.** Pharmacological aspects of experimental headache models in relation to acute antimigraine therapy. *Eur J Pharmacol*, **1999**;375:61-74.
31. **Dalesio DJ.** Vascular permeability and vasoactive substances: Their relationship to migraine. *Adv. Neurol.* **1974**; 4:395–401.
32. **Moskowitz MA.** The visceral organ brain: implications for the pathophysiology of vascular head pain. *Neurology*, **1991**; 41:182-186.

33. **Panconesi A, Bartolozzi ML, Guidi L.** Migraine pain: reflections against vasodilatation. *J Headache Pain*, **2009**;10(5):317-325.
34. **Moskowitz MA, Macfarlane.** Neurovascular and molecular mechanisms in migraine headaches. *Cerebrovasc Brain Metab*, **1993**; 5: 159-177.
35. **Bolay H, Reuter U, Dunn A, Huang Z, Boas D, Moskowitz A.** Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nature Medicine*, **2002**; 8:136-142.
36. **Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA.** Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *J Neurosci*, **1987**; 7: 4129-4136.
37. **Tore F, Tuncel N.** Mast Cells: Target and Source of Neuropeptides. *Current Pharmaceutical Design*, **2009**; 15: 3433-3445.
38. **Crivellato E, Beltrami C, Mallardi F, Ribatti D.** Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. *Br J Haematol*, **2003**; 123: 19-21.
39. **Tore F, Reynier-Rebuffel AM, Tuncel N, Callebert J, Aubineau P.** Effects of sepsis on mast cells in rat dura mater: influence of L-NAME and VIP. *Br. J. Pharmacol*, **2001**;134: 1367-1374.
40. **Bulanova E, Bulfone-Paus S.** P2 receptor-mediated signaling in mast cell biology. *Purinergic Signal*, **2010**; 6(1):3-17.
41. **Xanthos DN, Gaderer S, Drdla R, Nuro E, Abramova A, Ellmeier W et al.** Central nervous system mast cells in peripheral inflammatory nociception. *Mol Pain*, **2011**; 7:1-17.
42. **Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS.** The human mast cell: an overview. *Methods Mol Biol*, **2006**;315:13-34.
43. **Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA.** Mast cells. *Physiol Rev*, **1997**; 77: 1033-1079.
44. **Levy D, Burstein R, Kainz V, Jakubowski M, Strassman AM.** Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache. *Pain*, **2007**;130(1):166-176.
45. **Theoharides TC, Cochrane DE.** Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *J Neuroimmunol*, **2004**;146(2):1-12.
46. **Bergerot A, Reynier-Rebuffel AM, Callebert J, Aubineau P.** Long-term superior cervical sympathectomy induces mast cell hyperplasia and increases histamine and serotonin content in the rat dura mater. *Neuroscience*, **2000**; 96: 205-213.
47. **Ayata C.** Cortical spreading depression triggers migraine attack: pro. *Headache*, **2010**; 50(4):725-730.
48. **Dalkara T, Zervas NT, Moskowitz MA.** From spreading depression to the trigeminovascular system. *Neurol Sci*, **2006**;27(2):86-90.

49. **Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD.** Migraine-current understanding and treatment. *N Engl J Med*, **2002**;346(4):257-270.
50. **Smith JM, Bradley DP, James MF, Huang CL.** Physiological studies of cortical spreading depression. *Biol Rev Camb Philos Soc*, **2006**;1-25.
51. **Faria LC, Mody I.** Protective effect of ifenprodil against spreading depression in the mouse entorhinal cortex. *J Neurophysiol*, **2004**; 92(4): 2610-2614.
52. **Sanchez-Del-Rio M, Reuter U, Moskowitz MA.** New insights into migraine pathophysiology. *Curr Opin Neurol*, **2006**; 19(3):294-298.
53. **Pietrobon D, Striessnig J.** Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci*, **2003**; 4:386-398.
54. **Zhang X, Levy D, Kainz V, Noseda R, Jakubowski M, Burstein R.** Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression. *Ann Neurol*, **2011**;69(5):855-865.
55. **Mick G.** Physiopathology of the migraine attack and mechanisms of action of anti-migraine agents: recent findings in animals. *Pathol Biol*, **2000**;48(7):593-607.
56. **Leopoldo M, Lacivita E, Berardi F, Perrone R, Hedlund PB.** Serotonin 5-HT₇ receptor agents: structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. *Pharmacol Ther*, **2011**; 129:120–148.
57. **Nagata E, Shibata M, Hamada J, Shimizu T, Katoh Y, Gotoh K et al.** Plasma 5-Hydroxytryptamine (5-HT) in migraine during an attack free period. *Headache*, **2006**; 46:592-596.
58. **Izzati-Zade KF.** The Role of Serotonin in the pathogenesis and clinical presentations of migraine attacks. *Neurosci Behav Physiol*, **2008**; 38:501–505.
59. **Hamada J.** Use of antiepileptic drugs for the preventive treatment of migraine. *Brain Nerve*, **2009**;61:117-124.
60. **Panconesi A, Sicuteri R.** Headache induced by serotonergic agonists a key to the interpretation of migraine pathogenesis? *Cephalgia*, **1997**; 27:1295–1300.
61. **Panconesi A.** Serotonin and migraine: a reconsideration of the central theory. *J Headache Pain*, **2008**; 9:267–276.
62. **Goadsby PJ, Edvinsson L.** The trigeminovascular system and migraine: Studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann Neurol*, **1993**;33:48-56.
63. **Matthys A, Haegeman G, Van Craenenbroeck K, Vanhoenacker P.** Role of the 5-HT₇ receptor in the central nervous system: from current status to future perspectives. *Mol Neurobiol*, **2011**;43(3):228-253.

64. **Yan J, Melemedjian OK, Price TJ, Dussor G.** Sensitization of dural afferents underlies migraine-related behavior following meningeal application of interleukin-6 (IL-6). *Mol Pain*, **2012**; 8(6): 1-9.
65. **Empl M, Sostak P, Riedel M, Schwarz M, Müller N, Förderreuther S et al.** Decreased sTNF-RI in migraine patients? *Cephalalgia*, **2003**; 23:55–58.
66. **Longoni M, Ferrarese C.** Inflammation and excitotoxicity: role in migraine pathogenesis. *Neurol Sci*, **2006**; 27: 107–110.
67. **Magni G, Ceruti S.** P2Y purinergic receptors: new targets for analgesic and antimigraine drugs. *Biochem Pharmacol*, **2013**; 85(4):466-477.
68. **Burnstock G.** Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*. **2007**; 87(2):659-797.
69. **Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H.** Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci*, **2009**;32(1):19-29.
70. **Zimmermann H.** Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers Arch*, **2006**;452(5):573-588.
71. **Abbracchio MP, Burnstock G.** Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn. J. Pharmacol*,**1998**;78:113–145.
72. **Cotrina ML, Lin JH, López-García JC, Naus CC, Nedergaard M.** ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci*. **2000**; 20(8):2835-2844.
73. **Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H.** Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci*, **2009**;32(1):19-29.
74. **Hwang SW, Oh U.** Current concepts of nociception: nociceptive molecular sensors in sensory neurons. *Curr Opin Anaesthesiol*, **2007**; 20(5):427-434.
75. **Wirkner K, Sperlagh B, Illes P.** P2X3 receptor involvement in pain states. *Mol Neurobiol*, **2007**;36(2):165-83.
76. **Hamilton SG, McMahon SB.** ATP as a peripheral mediator of pain. *J Auton Nerv Syst*, **2000**;81(3):187-194.
77. **Fischer W, Krügel U.** P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Curr Med Chem*, **2007**;14(23):2429-2455.
78. **Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP.** Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch*, **2006**;452(5):513-537.
79. **Ambalavanar R, Dessem D.** Emerging peripheral receptor targets for deep-tissue craniofacial pain therapies. *J Dent Res*, **2009**; 88(3):201-211.

80. **Barret K.E, Barman SM, Boitano S, Brooks HL.** Ganong' un Tıbbi Fizyolojisi. 23. Basım, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, **2011**: 145.
81. **Ambalavanar R, Moritani M, Dessem D.** Trigeminal P2X3 receptor expression differs from dorsal root ganglion and is modulated by deep tissue inflammation. *Pain*, **2005**;117(3):280-291.
82. **Okada M, Nakagawa T, Minami M, Satoh M.** Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **2002**; 303(1):66-73.
83. **Vikelis M, Mitsikostas DD.** The Role of Glutamate and its Receptors in Migraine. *CNS and Neurological Disorders - Drug Targets*, **2007**; 6:251-257.
84. **Gerevich Z, Illes P.** P2Y receptors and pain transmission. *Purinergic Signal*, **2004**;1(1):3-10.
85. **Ruan HZ, Burnstock G.** Localisation of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. *Histochem Cell Biol*, **2003**;120(5):415-426.
86. **Moriyama T, Iida T, Kobayashi K, Higashi T, Fukuoka T, Tsumura H et al.** Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J Neurosci*, **2003**;23(14):6058-6062.
87. **Malin SA, Davis BM, Koerber HR, Reynolds IJ, Albers KM, Molliver DC.** Thermal nociception and TRPV1 function are attenuated in mice lacking the nucleotide receptor P2Y2. *Pain*, **2008**;138(3):484-96.
88. **Stucky CL, Medler KA, Molliver DC.** The P2Y agonist UTP activates cutaneous afferent fibers. *Pain*, **2004**;109(2):36-44.
89. **Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Buell G, Surprenant A, North RA et al.** Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology*, **1997**;36(9):1229-1242.
90. **Zimmermann K, Reeh PW, Averbeck B.** ATP can enhance the proton-induced CGRP release through P2Y receptors and secondary PGE(2) release in isolated rat dura mater. *Pain*, **2002**; 97(3):259-265.
91. **McCloskey MA, Fan Y, Luther S.** Chemotaxis of rat mast cells toward adenine nucleotides. *J Immunol*, **1999**;163(2):970-977.
92. **Cannon KE, Chazot PL, Hann V, Shenton F, Hough LB, Rice FL.** Immunohistochemical localization of histamine H3 receptors in rodent skin, dorsal root ganglia, superior cervical ganglia, and spinal cord: potential antinociceptive targets. *Pain*, **2007**;129(1-2):76-92.
93. **Dux M, Rosta J, Sántha P, Jancsó G.** Involvement of capsaicin-sensitive afferent nerves in the proteinase-activated receptor 2-mediated vasodilatation in the rat dura mater. *Neuroscience*, **2009**;161(3):887-894.
94. **van Diest SA, Stanisor OI, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ, van den Wijngaard RM.** Relevance of mast cell-nerve interactions in intestinal nociception. *Biochim Biophys Acta*, **2012**;1822(1):74-84.

95. **Stovner L, Hagen K, Jensen R, Katsarava Z, Lipton R, Scher A et al.** The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide. *Cephalalgia*, **2007**;27:193–210.
96. **Lipton RB, Steward WF, Diamond S.** Prevalence and burden of migraine in US: Data from the American Migraine Study. *Headache*, **2001**;646–657.
97. **Chabriat H, Danchot J, Michel P, Joire JE, Henry P.** Precipitating factors of headache. A prospective study in a national controlmatched survey in migraineurs and nonmigraineurs. *Headache*, **1999**; 39(5):335–338.
98. **Wöber C, Brannath W, Schmidt K, Kapitan M, Rudel E, Wessely P et al.** Prospective analysis of factors related to migraine attacks: the PAMINA study. *Cephalalgia*, **2007**; 27(4):304–314.
99. **Cutrer FM.** Pathophysiology of *migraine*. *Semin Neurol*, **2010**; (2):120-130.
100. **Olesen J, Friberg L, Olsen TS, Iversen HK, Lassen NA, Andersen AR et al.** Timing and topography of cerebral blood flow, aura, and headache during migraine attacks. *Ann. Neurol*, **1990**; 28(6):791–798.
101. **Matta GM, Torchio F.** The Role of CGRP and its Antagonists in Migraine. **2013**. <http://flipper.diff.org/app../items/5242>. erişim tarihi: 08.06.2014.
102. **Kaiser EA, Russo AF.** CGRP and migraine: could PACAP play a role too? *Neuropeptide*, **2013**; 47(6):451-61.
103. **Williamson DJ, Hargreaves RJ.** Neurogenic inflammation in the context of migraine. *Microscopy Research and Technique*, **2001**; 53:167–178.
104. **Leao AAP.** Spreading depression of activity in cerebral cortex. *J. Neurophysiol*, **1944**; 7: 359–390.
105. **Lashley KS.** Patterns of cerebral integration indicated by the scotoma of migraine. *Arch. Neurol. Psychiatry*, **1941**; 42: 259–264.
106. **Olesen J, Larsen B, Lauritzen M.** Focal hyperemia followed by spreading oligemia and impaired activation of rCBF in classic migraine. *Ann. Neurol*, **1981**; 9(4):344–352.
107. **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. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2001**; 98(8): 4687–4692.
108. **Zhang X, Levy D, Nosedà R, Kainz V, Jakubowski M, Burstein R.** Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura. *J. Neurosci*, **2010**; 30(26):8807–8814.

109. **Lambert GA, Zagami AS.** The mode of action of migraine triggers: a hypothesis. *Headache*, **2009**; 49(2):253–275.
110. **Raskin NH, Hosobuchi Y, Lamb S.** Headache may arise from perturbation of brain. *Headache*, **1987**; 27(8):416–420.
111. **Lambert GA, Zagami AS.** The mode of action of migraine triggers: a hypothesis. *Headache*, **2009**; 49(2):53–275.
112. **Sprenger T, Goadsby PJ.** Migraine pathogenesis and state of pharmacological treatment options. *BMC Med*, **2009**; 7(71): 1-5.
113. **Stankewitz A, Aderjan D, Eippert F, May A.** Trigeminal nociceptive transmission in migraineurs predicts migraine attacks. *J. Neurosci*, **2011**; 31(6):1937–1943.
114. **Burnstock G.** Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci*, **2006**; (3):166-176.
115. **Drury AN, Szent-Gyorgyi A.** (The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physio*, **1929**; 68:213–237.
116. **Emmelin N, Feldberg W.** Systemic effects of adenosine triphosphate. *Br. J. Pharmacol*, **1948**; 3: 273–284.
117. **Holton P.** The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J. Physiol*. **1959**; 145: 494–504.
118. **Buchthal F, Folkow B.** Interaction between acetylcholine and adenosine triphosphate in normal, curarised and denervated muscle. *Acta Physiol. Scand*, **1948**; 15:150–160.
119. **Ginsborg BL, Hirst GDS.** The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J. Physiol*, **1972**; 224:629–645.
120. **Abbracchio MP, Burnstock G.** Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Therap*, **1994**; 64: 445–475.
121. **Bradbury EJ, Burnstock G, McMahon SB.** The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Mol. Cell Neurosci*, **1998**; 12: 256–26
122. **Burnstock G, Kennedy C.** Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol*, **1985**; 16: 433–440.
123. **Giniatullin R, Nistri A.** Desensitization properties of P2X3 receptors shaping pain signaling. *Front Cell Neurosci*, **2013**; 7:1-9.
124. **Fabbretti E.** ATP P2X3 receptors and neuronal sensitization. *Front Cell Neurosci*, **2013**; 4(7):1-6.

125. **Tzabazis AZ, Klukinov M, Crottaz-Herbette S, Nemenov MI, Angst MS, Yeomans DC.** Selective nociceptor activation in volunteers by infrared diode laser. *Mol Pain*, **2011**;7(18):1-7.
126. **Shevel E.** The dura and migraine. *Future Neurol*, **2012**; 7(5):573–580.
127. **Goadsby PJ, Zagami AS, Lambert GA.** Neural processing of craniovascular pain: a synthesis of the central structures involved in migraine. *Headache*, **1991**; 31(6): 365–371.
128. **Andres KH, von Düring M, Muszynski K, Schmidt RF.** Nerve fibres and their terminals of the dura mater encephali of the rat. *Anat Embryol (Berl)*, **1987**;175(3):289-301.
129. **Schreiber CP.** The pathophysiology of migraine. *Dis Mon*, **2006**; 52(10):385-401.
130. **Cockcroft S, Gomperts BD.** ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells. *Nature*, **1979**; 279:541–542.
131. **Van Kolen K, Slegers H.** Integration of P2Y receptor-activated signal transduction pathways in G protein-dependent signaling networks. *Purinergic Signalling*, **2006** 2:451–469.
132. **Osipchuk Y, Cahalan M .** Cell-to-cell spread of calcium signals mediated by ATP receptors in mast cells. *Nature*, **1992**; 359:241–244.
133. **Suzuki R, Furuno T, Okamoto K, Teshima R, Nakanishi M.** ATP plays a role in neurite stimulation with activated mast cells. *J Neuroimmunol*, **2007**; 192:49–56.
134. **Schemann M, Kugler EM, Buhner S, Eastwood C, Donovan J, Jiang W et al.** The mast cell degranulator compound 48/80 directly activates neurons. *PloS One*, **2012**; 7(12):1-9.
135. **Schueler M, Neuhuber WL, De Col R, Messlinger K.** Innervation of Rat and Human Dura mater and Pericranial Tissues in the Parieto-Temporal Region by Meningeal Afferents. *Headache*, **2014**; 54(6):996-1009.
136. **Lewis DW.** Toward the definition of childhood migraine. *Curr Opin Pediatr*, **2004**; 16: 628-636.
137. **Moskowitz MA.** The visceral organ brain: implications for the pathophysiology of vascular head pain. *Neurology*, **1991**; 41:182–186.
138. **Burnstock G, Wood JN.** Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr. Opin. Neurobiol*, **1996**; 6:526–532.
139. **North RA.** Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev*, **2002**; 82:1013–1067.
140. **Luo J, Yin GF, Gu YZ, Liu Y, Dai JP, Li C et al.** Characterization of ATP-activated currents in relation to P2X subunits in rat trigeminal ganglion neurons. *Brain Res*, **2005**; 1115:9–15.
141. **Arulkumaran N, Unwin RJ, Tam FWK.** A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin Investig Drugs*, **2011**; 20(7): 897–915.

142. **Burnstock G.** Purinergic receptors and pain. *Curr Pharm Des*, **2009**; 15(15):1717–1735.
143. **Kim YS, Paik SK, Cho YS, Shin HS, Bae JY, Moritani M et al.** Expression of P2X3 receptor in the trigeminal sensory nuclei of the rat. *J Comp Neurol*, **2008**; 506:627–639.
144. **Eriksson J, Bongenhielm E, Kidd B, Matthew K, Fried K.** Distribution of P2X3 receptors in the rat trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve injury. *Neurosci Lett*, **1998**; 254: 37–40.
145. **Ichikawa H, Sugimoto T.** The co-expression of P2X3 receptors with VR1 and VRL-1 in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res*, **2004**; 998: 13–135.
146. **Zhang X-F, Han P, Faltynek CR, Jarvis MF, Shieh C-C.** Functional expression of P2X7 receptors in non-neuronal cells of rat dorsal root ganglion. *Brain Res*, **2005**; 1052:63–70.
147. **Anderson CM, Nedergaard M.** Emerging challenges of assigning P2X(7) receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci*, **2006**; 29:257–262.
148. **Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G.** The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, **1996**; 272:735–738.
149. **Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vibois M, North RA, Buell G.** Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, **1997**; 36:1277–1283.
150. **Sim JA, Young MT, Sung HY, North RA, Surprenant A.** Reanalysis of P2X7 receptor expression in rodent brain. *J Neurosci*, **2004**; 24:6307–6314.
151. **Rychter JW, Van Nassauw L, Timmermans JP, Akkermans LM, Westerink RH, Kroese AB.** CGRP1 receptor activation induces piecemeal release of protease-1 from mouse bone marrow-derived mucosalmast cells. *Neurogastroenterol Motil*, **2011**;23(2):57-68.
152. **Keller JT, Marfurt CF.** Peptidergic and serotonergic innervation of the rat dura mater. *J Comp Neurol*, **1991**; 309(4):515-534.
153. **Kandere-Grzybowska K, Gheorghe D, Priller J, Esposito P, Huang M, Gerard N et al.** Stress-induced dura vascular permeability does not develop in mast cell-deficient and neurokinin-1 receptor knockout mice. *Brain Research*, **2003**; 980:213–220.

8. EKLER

1. Etik kurul onayı

ÖZGEÇMİŞ

Erkan KILINÇ 1981' de Gaziantep' te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Gaziantep' te tamamladıktan sonra Gaziantep Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü' nden 2006 yılında bölüm ikincisi olarak mezun oldu. Daha sonra Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı' nda başladığı Yüksek Lisans eğitimini 2010 yılında tamamladı. Yüksek Lisans eğitiminin ardından Yükseköğretim Kurulu Başkanlığı' nın açtığı Öğretim Üyesi Yetiştirme Programını kazandı ve bu program kapsamında Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı' nda doktora eğitimine başladı. Doktora eğitimi sırasında Yükseköğretim Kurulu Başkanlığı tarafından verilen yurtdışı doktora araştırma desteğini kazanarak Finlandiya' nın Kuopio şehrinde bulunan University of Eastern Finland, A.I. Virtanen Institute for Molecular Sciences, Department of Neurobiology' de, Prof. Dr. Rashid GINIATULLIN' in grup liderliğinde, doktora tez çalışmalarını tamamladı. Temmuz 2014 tarihi itibarıyla Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı' nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

