

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ELEKTROKONVULZİF NÖBETLERİN FARELERDE
NÖROİNFLAMATUVAR YANIT ÜZERİNDEKİ OLASI
ETKİSİ VE BU ETKİNİN DOĞURDUĞU
SONUÇLARIN İNCELENMESİ**

Dr. Zümrüt Duygu ŞEN

Temel Nörolojik Bilimler Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2017

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ELEKTROKONVULZİF NÖBETLERİN FARELERDE
NÖROİNFLAMATUVAR YANIT ÜZERİNDEKİ OLASI
ETKİSİ VE BU ETKİNİN DOĞURDUĞU
SONUÇLARIN İNCELENMESİ**

Dr. Zümrüt Duygu ŞEN

Temel Nörolojik Bilimler Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Turgay DALKARA

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Emine Eren Koçak

ANKARA

2017

**ELEKTROKONVULZİF NÖBETLERİN FARELERDE
NÖROİNFLAMATUVAR YANIT ÜZERİNDEKİ OLASI ETKİSİ VE BU
ETKİNİN DOĞURDUĞU SONUÇLARIN İNCELENMESİ**

Dr. Zümrüt Duygu Şen

Bu çalışma 28.02.2017 tarihinde, jürimiz tarafından "Temel Nörolojik Bilimler Programı"nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Aygün Ertuğrul

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Danışmanı:

Prof.Dr. Turgay Dalkara

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye:

Doç.Dr. Hülya Karataş Kurşun

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye:

Doç.Dr. Hatice Özdemir

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

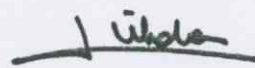
Üye:

Doç.Dr. Kemal Sayar

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.


Prof.Dr.Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

x Tezimin/Raporumun 01.01.2022 .tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

o Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

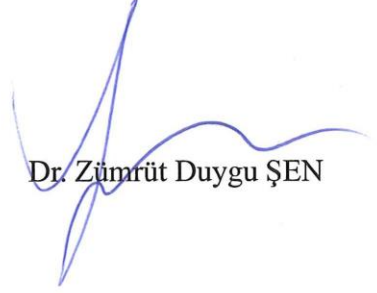
o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

28/02/2017

Dr.Zümrüt Duygu ŞEN

ETİK BEYAN

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



Dr. Zümrüt Duygu ŞEN

TEŞEKKÜR

Kendimi yolunu kaybetmiş bulduğum birçok zaman, *neuroscience*'a olan heyecanım yolumu bulmama yardım etti. *Neuroscience* benim, içimde, kendi adıma büyütmeğe çalıştığım bir ağaçtır. İç çatışmaların benim için kaçınılmaz olduğu bu sancılı sürece devam edebilmemi sağlayan ve vazgeçmeme izin vermeyen Prof. Dr. Turgay Dalkara ve Doç. Dr. Emine Eren Koçak'a bana hem psikolojik hem de bilimsel destekleri için içtenlikle teşekkür ederim.

Ayrıca tıp fakültesini tercih etme nedenim olan Tıp-Bilim Doktorluğu Bütünleşik Programını hayata geçiren Prof. Dr. Turgay Dalkara' ya tekrar teşekkür ederim.

Laboratuvara geldiğimde 22 yaşındaydım. Takip eden yıllar boyunca bana bilimsel olarak yol göstermenin dışında beni eğiten hocalarım ve ablalarım Prof. Dr. Yasemin Gürsoy Özdemir'e, Prof. Dr. Müge Yemişçi Özkan'a ve Doç. Dr. Hülya Karataş Kurşun'a çok teşekkür ederim. Bu laboratuvarda büyüdüğümü söylemek yanlış olmaz.

Dr. Buket Demir'e bu zor süreç boyunca gösterdiği manevi destek ve deneyler boyunca bir kere bile hayır demeden ortaya koyduğu büyük emek için minnettarım. Ayrıca deneylerimde Dr. Sinem Yılmaz Özcan ve Dr. Murat Yılmaz'a katkıları için sonsuz teşekkür ederim. Laboratuvarda geçirdiğim süre boyunca Dr. Sevda Lüle ve Dr. Kıvılcım Kılıç'ın beni ne kadar desteklediklerini unutamam. Mesut Fırat'ın her teknik sorunumuza getirdiği çözümler anlatmakla bitmez. Özlem Hökeleli'nin yardımları için teşekkür ederim.

Bu tezin tamamlanması için benden desteklerini esirgemeyen Psikiyatri Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine teşekkürü borç bilirim.

Son olarak beni bugünlere getiren aileme ve bana bu süreç boyunca destek olan yakın dostlarıma teşekkür ederim.

ÖZET

Şen Z.D., Elektrokonvulzif Nöbetlerin Farelerde Nöroinflamatuvar Yanıt üzerindeki Olası Etkisi ve Bu Etkinin Doğurduğu Sonuçların İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Nörolojik Bilimler Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017. Epilepsi ve iskemi gibi birçok patolojik süreçle ilişkili olduğu ortaya konmuş olan nöroinflamatuvar yanıtın, homeostazdaki kaymalar tarafından tetiklendiği ve nörogenез gibi birçok fizyolojik süreçte rolü olduğu gösterilmiştir. Nöroinflamatuvar yanıtın merkezi sinir sisteminde hücreler arası iletişimin önemli bir parçası olabileceği görüşü giderek yaygınlaşmaktadır. Kortikal yayılan depresyonun oluşturduğu masif depolarizasyona benzerliği nedeniyle elektrokonvulzif tedavinin (EKT) etki mekanizmasında nöroinflamatuvar yanıtın rol oynayabileceği düşünülmüştür. Şimdiye kadar az sayıdaki çalışmada EKT'nin mikrogliaların etkinliğini artırdığı bildirilmiştir. Bildiğimiz kadarı ile EKT ile tetiklenen nöron ve diğer glia hücreleri kaynaklı nöroinflamatuvar yanıt üzerine çalışma yayınlanmamıştır. Çalışmamızda kemirgenlerde bir EKT modeli olan elektrokonvulzif nöbet (EKN) sonrasında beyinde nöroinflamatuvar yanıtın incelenmesi hedeflenmiştir. Tek EKN'nin proinflamatuvar bir molekül olan HMGB1'in düzeyi ve beyindeki dağılımı üzerindeki etkileri, EKN sonrası birinci saatten altıncı saate kadar 4 noktada değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal boyama ile EKN'den sonra HMGB1 (+) hücre oranının frontal korteksin mediyalinde ve hipokampusta yalancı uygulamaya göre daha düşük olduğu ve beyin omurilik sıvısında HMGB1 miktarının arttığı tespit edilmiştir. Western blotlama ile prefrontal korteks ve hipokampusta toplam HMGB1 protein düzeyinin değişmediği görülmüştür. Bunun yanısıra tek EKN'den sonra BDNF düzeyinin birinci saatten itibaren hipokampusta ve altıncı saatte prefrontal kortekste arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular tek EKN'den sonra hipokampus ve prefrontal kortekste HMGB1'in hücre dışına taşınması ile tetiklenen inflamatuvar sürecin bu bölgelerde BDNF protein düzeyinde artışa neden olmuş olabileceğini akla getirmektedir.

Anahtar Kelimeler: Elektrokonvulzif Nöbet, HMGB1, Nöroinflamatuvar yanıt, BDNF

ABSTRACT

Şen Z.D., Effect of Electroconvulsive Seizures on Neuroinflammatory Response and Exploration of Consequences of This Effect. Hacettepe University Institute of Health Sciences Program of Neuroscience Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2017. Neuroinflammation has been shown to be involved in pathological conditions like cortical spreading depression, seizures and ischemia. Its involvement in physiological processes like neurogenesis, learning and memory has also been reported. Recent research also points out a role for neuroinflammation in intercellular signaling in the central nervous system, which is triggered by homeostatic imbalance. Based on these findings, we hypothesized that neuroinflammation may have a central role in understanding mechanisms of action of electroconvulsive therapy (ECT), one of the oldest and most effective treatments in psychiatry. Limited data points to a microglial activation after ECT, but to our knowledge, the neuroinflammatory response originating from neurons and other glial cells after ECT has not been examined before. In our study, we aimed to focus on neuroinflammatory response after a single electroconvulsive seizure (ECS), which is a rodent model of ECT. We examined expression and secretion of HMGB1, which is known to have a proinflammatory role outside the cell, at four time points after a single ECS (1, 2, 4 and 6 hours). We detected a lower ratio of HMGB1 (+) cell compared to sham group in the hippocampus and medial regions of frontal cortex by immunohistochemical staining and increased amount of HMGB1 level in cerebrospinal fluid. There were no differences in HMGB protein expression in hippocampus and prefrontal cortex between sham operated animals and ECS group as detected by Western blotting. Moreover, brain derived neurotrophic factor (BDNF) level was increased in hippocampus and prefrontal cortex 1 hour and 6 hours after ECT, respectively. These findings may suggest a relationship between the HMGB1 release and BDNF increase but this hypothesis remains to be tested.

Key words: Electroconvulsive Seizure, HMGB1, Neuroinflammatory response, BDNF

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET BEYAN SAYFASI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Elektrokonvülsif Tedavi (EKT)	4
2.1.1. Elektrokonvülsif Tedavi ile İlgili Genel Bilgiler	4
2.1.2. EKT'nin Etki Mekanizmaları	5
2.1.3. EKT ve İnflamatuvar Yanıt	10
2.2. “High Mobility Group Box 1” (HMGB1)	17
2.2.1. HMGB1 ile İlgili Genel Bilgiler	17
2.2.2. HMGB1’in Merkezi Sinir Sistemindeki Rolü	22
2.3. Panneksin Kanalları	25
2.3.1. Panneksin Kanalları ile İlgili Genel Bilgiler	25
2.3.2. Panneksin Kanallarının Merkezi Sinir Sistemindeki Rolü	29
3. GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1. Deney Hayvanları	32
3.2. Elektrokonvülsif Nöbet (EKN) Uygulaması	32
3.3. Kullanılan kimyasal maddeler	33
3.4. Serebral ventrikül içine yapılan enjeksiyonlar	33
3.4.1. Sıçanlarda Serebral Ventrikül İçine Enjeksiyon	33
3.4.2. Farelerde Serebral Ventrikül İçine Enjeksiyon	34

	x
3.5. Sisterna Magnadan Beyin Omurilik Sıvısı Toplanması	35
3.6. İmmunohistokimyasal Boyamalar	35
3.7. Western Blotlama	36
3.8. Davranış Deneyleri	38
3.8.1. Kuyruktan Asma Testi	38
3.8.2. Sükroz Tercih Testi	38
3.9. İstatistiksel Yöntemler	39
3.10. Yöntemsel Optimizasyon Deneyleri	39
3.10.1. EKN Optimizasyonu	39
3.10.2. Ventrikül İçi Enjeksiyonların Optimizasyonu	40
3.10.3. HMGB1'in Hücre İçi Lokalizasyonunun Tespitinin Optimizasyonu	42
4. BULGULAR	45
4.1. Tek EKN HMGB1 salınımını tetikler.	45
4.2. Tek EKN Sonrasında BOS'ta HMGB1 düzeyi yükselmiştir.	45
4.3. Tek EKN Uygulanmasından İtibaren İlk Altı Saatlik Zaman Diliminde Fare Hipokampusunda ve Prefrontal Korteksinde HMGB1 Miktarında Artış Olmamıştır.	45
4.4. Tek EKN Uygulanmasından İtibaren İlk Altı Saatlik Zaman Diliminde Fare Hipokampusunda ve Prefrontal Korteksinde BDNF Miktarında Artış Olmuştur.	46
4.5. Tek EKN sonrası Antidepresan Benzeri Davranış Görülmemiştir.	46
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
7. KAYNAKLAR	63
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzini	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIM2	" <i>Absent in melanoma 2</i> "
AP	Anterioposterior
ASC	" <i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i> "
ATP	Adenin Trifosfat
BDNF	Beyin kökenli nörotrofik faktör
<i>bdnf</i>	Beyin kökenli nörotrofik faktör geni
BOS	Beyin omurilik sıvısı
DAMP	Danger associated molecular pattern
DK	Doğal katil hücreleri
DNA	Deokisribonükleik asit
DV	Dorsoventral
EGR1	" <i>Early growth response protein</i> "
ER	Endoplazmik retikulum
EKT	Elektrokonvulzif terapi
EKN	Elektrokonvulzif nöbet
ENP	Erken nöron progenitörleri
FGF 2	Fibroblast büyüme faktörü 2
HMGB1	" <i>High mobility group box 1</i> "
INF-α	İnterferon-alfa
IL-1β	İnterlökin-1 beta
IL-6	İnterlökin-6
IL-14	İnterlökin 14
IL-18	İnterlökin 18
i.p.	İntraperitoneal
i.s.v	İntraserebroventriküler
KARB	Karbenoksolon
KAT	Kuyruktan asma testi

KYD	Kortikal yayılan depresyon
LPS	Lipopolisakkarid
MAPK	Mitogen activated protein kinases
ML	Mediolateral
mRNA	Mesajcı RNA
Nf-kB	" <i>Nuclear factor kappa B</i> "
NGF	Sinir büyüme faktörü
NLR	" <i>Nod like receptor</i> "
NLRP3	" <i>Nod like receptor 3</i> "
Npy	Nöropeptit Y
OD	Optik Dansite
Panx1	Panneksin1
PI	Propidium İyodür
PFK	Prefrontal Korteks
PHYN	"Pyrin and HIN200 domain-containing protein"
PRR	" <i>Pattern recognition receptors</i> "
PSD95	Postsinaptik dansite proteini 95
RAGE	" <i>Receptor for advanced glycation end products</i> "
RNA	Ribonükleik asit
STT	Sükroz tercih testi
TLR2	" <i>Toll like receptor 2</i> "
TLR4	" <i>Toll like receptor 4</i> "
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VGf	Vasküler büyüme faktörü
Y.U.	Yalancı uygulama

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. İnflamazomun etkinleşmesi ve IL-1b salınımı	18
2.2. Hücre dışındaki HMGB1'in etkisi	22
3.1. Mediyal kortekste HMGB1'in immünopozitifliğinin değerlendirilen bölgeler.	44
3.2. İ.s.v. PI enjeksiyonundan sonra kortekste PI immünopozitif hücreler	45
4.1. EKN'den sonra HMGB1 immünopozitifliğinin kortekste ve hipokampusta Y.U. grubuna göre azalması.	48
4.2. Korteksin mediyal bölgelerinde ve hipokampusta HMGB1 immünopozitifliğinin Y.U. ve EKN gruplarındaki yoğunluğu.	49
4.3. Western blotlama ile PFK ve hipokampusta HMGB1 miktarının ölçülmesi.	50
4.4. Western Blotlama ile BDNF miktarının PFK ve hipokampusta ölçülmesi.	51
4.5. EKN veya Y.U. sonrasında KAT ve STT'de gruplar arasında hareketsiz kalma süreleri ve sükröz tüketim süreleri açısından farklar.	52
5.1 HMGB'in iskemiden sonra oynadığı ikili rol	60

1. GİRİŞ

En yaygın psikiyatrik bozukluklardan biri olan majör depresyon, belirgin yeti yitimine neden olabilen ve sıklığı giderek artan bir psikiyatrik rahatsızlıktır [1]. Depresyon tedavisinde son yarım yüz yılda yeni bulunan tedavi yöntemleri sayesinde önemli değişiklikler gerçekleşmiştir. Ancak azımsanmayacak sayıda hasta farmakoterapiye cevap vermemektedir. 2006 yılında yapılan bir meta-analize göre bu oran %40'tır [2]. Dirençli hastaların %60'ından fazlasında elektrokonvulzif tedavinin (EKT) etkin olduğu gösterilmiştir [3]. Birçok çalışmada EKT, belirgin şekilde farmakoterapiden etkili bulunmuştur; bu nedenle EKT'nin etkinliği kanıtlanmış en güçlü antidepresan tedavi olduğu düşünülmektedir [4]. Ayrıca farmakoterapilerin aksine EKT ile tedavi etkinliğinin daha erken başladığını gösteren çalışmalar hızlı etkili antidepresanların gündemde olduğu bu günlerde dikkatleri tekrar EKT'nin etki mekanizmaları ile ilgili çalışmalara çekmiştir [5].

EKT beynin elektriksel uyarımıyla jeneralize nöbetler oluşturulması esasına dayanan en eski biyolojik tedavi yöntemlerinden birisidir. 1938 yılından beri psikiyatrik hastalıklarda kullanılmasına rağmen etki mekanizması henüz anlaşılamamıştır [6]. Serebral metabolizmada akut değişikliklere yol açtığı, nöbet eşliğini yükselttiği bilinmektedir ve insanda ve hayvanda yapılan birçok çalışma nöroplastik değişikliklere neden olduğunu göstermiştir. Bu alanda karşılaşılan en büyük güçlük, yayılan nöbetin beyinde çok sayıda sistemi etkilemesi ve EKT sonucunda tespit edilen akut veya kronik değişikliklerin hangilerinin antidepresan etkinliğe yol açtığının saptanamamasıdır.

Depresyon patogenizinde ve antidepresan tedavilerin etki mekanizmalarında inflamatuvar süreçlerin rolü olduğuna işaret eden kanıtlar tıbbın diğer bir çok alanında olduğu gibi depresyon araştırmalarında dikkatleri bu süreçlere çekmiştir [7]. EKT'nin periferde ve kemirgenlerde bir EKT modeli olan elektrokonvulzif nöbetin (EKN) beyin dokusunda tetiklediği inflamatuvar yanıtın araştırıldığı az sayıda araştırma, tek EKT ve EKN'den sonra inflamatuvar etkinlikte artış olduğunu göstermiştir [8, 9]. Ancak gün geçtikçe hücreler arası iletişimde de rolü belirginleşen ve dokudaki çeşitli değişiklikler sonucu tetiklenen nöroinflamatuvar yanıtın EKN ile

ilişkisi üzerine yapılmış bir çalışma bilindiği kadarıyla bulunmamaktadır. EKN'ye yanıt olarak hücre düzeyinde hızlıca ortaya çıkan bu tür değişikliklerin anlaşılması EKT'nin etki ve yan etkilerinin altında yatan mekanizmaların anlaşılması açısından önem taşıyabilir.

Panneksin 1 (Pannx1) kanalları çeşitli durumlarda (iskemi, epilepsi, membran depolarizasyonu, ekstrasellüler K iyonu artışı ve ATP) açılarak, fizyolojik koşullarda geçişine izin verilmeyen 1000 kD altındaki iyon ve sinyal moleküllerinin sitoplazma ve hücre dışı ortam arasında taşınmasına izin vermektedir [10]. Pannx1 açılmasının hücre içi çeşitli inflamatuvar yolları uyardığı ve sonucunda *High Mobility Group Box 1* (HMGB1), intörlökin-1beta (IL-1b) gibi inflamatuvar yolak elemanlarının nöronlardan hücre dışına salıverildiğine dair kanıtlar ortaya konmuştur [11]. Nöbetlerin ve EKN'nin hücre dışı ATP miktarını arttırdığı bilinmektedir [12]. Bu bilgilerden yola çıkarak, çalışmamızın başında tek EKN'den sonra hücre dışında artan ATP ve potasyum konsantrasyonu sonucu Pannx1'in açılarak nöronlardan IL-1b ve HMGB1 gibi sitokinlerin salındığını ve kontrollü ve kısa süreli bir uyarım sonucu doğan bu sitokin cevabının nörotrofik faktörlerin miktarında artışa yol açacağını öne sürdük.

Çalışmamızda tek EKN'nin HMGB1 düzeyi ve dağılımı üzerindeki etkileri EKN sonrası birinci saatten altıncı saate kadar toplam 4 noktada değerlendirilmiş, birinci saatte beyin omurilik sıvısında (BOS) HMGB1 düzeyinin arttığı gösterilmiş ve EKN sonrası birinci saatte medial prefrontal kortekste ve hipokampusta HMGB1 pozitif hücre sayısının azaldığı saptanmıştır. HMGB1 miktarının EKN'den sonra hipokampusta ve prefrontal kortekste değişmediği görülmüştür. Bu bulgular bize HMGB1'in EKN'den sonra hücre dışına salındığını düşündürmüştür. Ayrıca tek EKN'den sonra beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) düzeyinin birinci saatten itibaren hipokampusta ve altıncı saatte prefrontal kortekste arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular tek EKN sonrası prefrontal kortekste HMGB1'in hücre dışına taşınması ile tetiklenen sürecin prefrontal kortekste BDNF protein düzeyinde artışa neden olmuş olabileceğini akla getirebilir.

EKN'nin Panx1 kanalları üzerindeki etkisini saptamak amacı ile Panx1 üzerinden hücre içine girdiği düşünülen Propidyum İyodürün (PI) ventrikül içi enjeksiyonu sonrası hücrelerin PI tutulumu değerlendirilmiş, seçici olmayan bir Panx blokörü olan karbeneksolonun (KARB) enjeksiyonu ile PI tutulumundaki değişikliklerin saptanması hedeflenmiştir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda intraserebroventriküler (i.s.v.) enjeksiyonun yarattığı mekanik travmanın neden olduğu etkinin EKN'ye bağlı olası sinyali maskeliyor olabileceği sonucuna varılmıştır.

Tek EKN'den sonra kısa bir süre içinde HMGB1'in hücre içinde azaldığı ve BOS'ta arttığına dair bulgularımız, tek EKN'den sonra inflamatuvar yanıtın tetiklendiğine işaret etmektedir. HMGB1'in salınımına neden olan süreçler ile hipokampus ve prefrontal kortekste BDNF artışı arasındaki ilişkinin anlaşılması için ileri deneyler yapılmalıdır.

2. GENEL BİLGİLER

21. Elektrokonvulzif Tedavi

21.1. Elektrokonvulzif Tedavi ile ilgili Genel Bilgiler

1938 yılında Ugo Cerletti ve Lucia Bini tarafından ilk defa kullanılmaya başlandığı günden beri elektrokonvulzif tedavinin (EKT) depresyon, mani ve şizofreni tedavilerinde etkili olduğu gösterilmiştir [13]. EKT'nin geliştiği bu dönemlerde insülin ile veya pentilentetrazol enjeksiyonu ile nöbetler tetiklenerek psikotik bozukluklar tedavi edilmeye çalışılmaktaydı. Uygulaması daha kolay ve güvenilir olan EKT nöbet tetiklemede kullanılan diğer yöntemlerin yerini almıştır. 1950'li yıllardan sonra psikotrop ilaçların kullanılmaya başlanması ile daha az tercih edilmeye başlanmışsa da, 1980'li yıllardan sonra kardiyopulmoner ve elektroensefalografik monitorizasyondaki gelişmeler, daha güvenli anestetik ajanların geliştirilmesi ile kullanımı tekrar yaygınlaşmıştır.

Psikozu tedavi etmek için geliştirilmiş olan EKT'nin şizofreni tedavisinde yeri antipsikotik tedavideki gelişmelerden sonra geri planda kalmıştır. Günümüzde EKT daha ziyade duygudurum bozukluklarında uygulanmaktadır; bu hasta grubunda düzelme oranlarının %80 civarında olduğu gösterilmiştir [14]. Birçok çalışmada EKT belirgin şekilde hem etkinlik hem de hız bakımından farmakoterapiden üstün bulunmuştur [6, 15]. EKT, gebelik veya yaşlılık gibi farmakoterapi ile ilişkili risklerin yüksek olduğu durumlarda majör depresyon tedavisinde önemli bir seçenektir [6]. Bu hastalıklar dışında EKT'nin şizoafektif bozukluk, katatonik durumlar, Parkinson hastalığı, nöroleptik malign sendrom, status epileptikus, obsesif kompulsif bozukluk tedavisinde etkili olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır [13].

EKT'de ciddi morbidite ve mortalite nadir olmakla birlikte kalp-damar bozuklukları, oluşmamış, uzamış, gecikmiş ya da yetersiz nöbet, bellek sorunları, kas ağrıları, mani, konfüzyon, nöbet içi ya da nöbet sonrası deliryum en sık rastlanan yan etkiler olarak sayılabilir [13]. Şimdiye kadar beyinde bu yan etkilere neden

olabilecek bir hasar gösterilememiştir. Manyetik rezonans görüntüleme ile yapılan çalışmalar EKT sonrasında hipokampus hacminde bir azalma olmadığını göstermiştir [16]. Beyin hasarına işaret ettiği kabul edilen S-100 beta proteini de EKT sonrası beyin omurilik sıvısında normal düzeylerde saptanmıştır [17]. Laboratuvar çalışmalarında da EKN sonrasında nöron veya glia hasarına işaret eden bir bulguya rastlanmamıştır [18].

Modifiye EKT uygulamalarında hastanın genel anestezisi sağlandıktan sonra EKT uygulamasına geçilmektedir. Akım kesildikten sonra genellikle önce tonik, daha sonra frekansı yavaş yavaş azalan klonik kasılmalar başlar. Nöbet aktivitesi elektroensefalografi ve elektromyografi ile izlenir. Günümüzde kullanılan modern EKT cihazları kare dalga (*square wave*) ve çok kısa vurum dalga (*ultra brief pulse*, 0,25-1,0 ms) teknik donanımına sahip olup, 25-1024 milicoulomb aralığında uyaran enerjisi verebilmektedirler. Sabit akımlıdır, ancak yüksek direnç durumunda istenen elektrik yükünü uygulayabilmek için voltajı önceden belirlenen güvenli maksimum limite kadar yükseltebilmektedirler [19].

212. Elektrokonvulzif Tedavinin Etki Mekanizmaları

70 yıldan uzun bir süredir kullanılmasına karşın EKT'nin etkisini nasıl gösterdiği üzerinde bir fikir birliğine varılamamıştır. Yaygınlaşan nöbetin beyinde birbirinden farklı çok sayıda sistemi etkilemesi, bu etkilerin hangilerinin antidepresan etkiyle hangilerinin uygulamaya bağlı yan etkilerle ilgili olduğunun saptanmasını zorlaştırmaktadır. EKT'nin antidepresan, antipsikotik, antikatatolik, antimanik, antikonvülzan etkileri vardır; yeni nöron oluşumunu artırır, nöroendokrin değişikliklere yol açar, nörotransmitter düzeyinde etki gösterir. EKT'nin tek bir etki mekanizmasına ulaşmaya çalışmaktansa birden çok etki mekanizmasını bulmayı hedeflemenin daha uygun olacağı düşünülmektedir [20]. Antidepresan etkisi ile antipsikotik etkisinin altında yatan mekanizmalar arasında muhtemelen farklılıklar olacaktır. Tedavi etkinliğinin görülebilmesi için birden fazla mekanizmanın koordinasyonu da gerekiyor olabilir. Hastalarla yapılan görüntüleme çalışmaları ve kanda bakılan belirteçlerin yanı sıra kemirgenlerde bir EKT modeli olan EKN

düzenine kullanılması ile de EKTnin etki mekanizmaları ile ilgili bilgilerimiz genişlemiştir.

Literatürde EKT'nin etki mekanizmasını açıklamayı amaçlayan dört ana görüş vardır: Monoamin nörotransmitter hipotezi, nöroendokrin hipotezi, antikonvülzan hipotezi ve nörotrofin hipotezi [21]. Geleneksel monomamin nörotransmitter teorisine göre EKT de diğer antidepresanlar gibi sinaptik aralıkta nörotransmitter düzeyini arttırarak veya reseptör duyarlılığını değiştirerek etki gösterir. EKT'nin dopaminerjik, serotonerjik ve adrenerjik sinir iletimini arttırdığı bilinmektedir [22], GABA ve glutamat iletimini de arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur [23, 24].

Nöroendokrin hipoteze göre EKT hipotalamik ve hipofizer hormonların salınmasını tetikler ve salınımı artan tiroid stimule edici hormon, adrenokortikotropik hormon ve prolaktin gibi hormonlar antidepresan etkiye neden olur. Melankolik depresyonu olan hastalarda saptanan hipotalamo-pitüiter-adrenal aksındaki bozukluğun, EKT ile normale dönmesi bu hipotezi desteklemektedir [25].

Tekrarlayan EKT'ler sonrası nöbet eşiğinin gittikçe yükselmesi ve nöbet süresinin gittikçe kısalması, EKT'nin antikonvülzan etkinliği olduğunu düşündürmüştür [21]. EKT'nin beyinde GABA düzeylerini ve GABAerjik işlevleri arttırdığı, GABA antagonistlerinin konvülzan etkilerini azalttığı, eksitatuvar nörotransmitterlerin salınımını azalttığı bilinmektedir [26]. EKT sırasında ortaya çıkan epileptik nöbetin bir sonucu olarak beyindeki değişiklikleri dengelemeye yönelik homeostatik yanıtlar aracılığıyla, nöbet eşiğinin yükseldiği düşünülmektedir. Majör depresyonda EKT uygulamasında nöbet eşiğinde yükselmenin iyi klinik yanıtla, tersine nöbet eşiğinin artmamasının ise EKT'ye kötü yanıtla ilişkili olduğuna dair yayınlar bulunmaktadır [26].

Tek EKT uygulamasından sonra hastaların küçük bir azınlığında antidepresan yanıt saptansa da, kalıcı bir antidepresan yanıt hem insan hem de hayvan çalışmalarında ancak tekrarlayan EKT'ler sonrası gösterilebilmiştir [21, 27]. Antidepresan ilaçlardakine benzer bu durum EKT sonrası tetiklenen gen ifadesindeki değişiklikleri ve nöroplastik etkileri gündeme getirmektedir. Dyrvig ve arkadaşları

farelerde tek EKN sonrası 1-48. saatler arası birçok noktada *Bdnf*, *Npy*, *c-fos*, *Psd95* ve benzeri genlerin ifadesine bakmışlar ve çalışılan birçok genin ifadesinin ilk saatlerde arttığını ancak 24. saatten sonra ifadelerinin yalancı uygulama düzeylerine döndüğünü tespit etmişlerdir [28]. İfadesi ilk saatte artan *c-fos* ve *Egr1* gibi en erken uyarılan genlerin (*immediate early genes*) transkripsiyon faktörü gibi işleyerek nöroplastiklik ve nöroenezde rol alan diğer genlerin ifadesini düzenlediği düşünülmektedir [28]. Beyin kökenli nöronal büyüme faktörü (*Bdnf*) mRNA ifadesi de erken uyarılan genler gibi hipokampusta 1. saatte artmakta, 6. saatten sonra düşmeye başlamakta ve 24. saatte yalancı uygulama düzeyine dönmektedir [29]. Tekrarlayan EKN'ler sonrası ise hipokampusta artan *bdnf* ifadesinin 48 saatten sonra düşmeye başladığı gösterilmiştir [29]. Bu bulgularla uyumlu olarak fare ve sıçanlarda *bdnf* ifadesinin EKN sonrası hipokampusta arttığını bildiren birçok çalışma yayımlanmıştır [30-32]. Tekrarlayan EKN'ler sonrası hipokampus ve frontal kortekste BDNF proteini düzeylerinde de artış saptanmıştır [31, 33].

BDNF, depresyon ve antidepresan yanıt ile ilişkisi en çok çalışılmış büyüme faktörüdür. *Bdnf* ve reseptörü *TrkB*'nin ifadesinin hipokampusta ve prefrontal kortekste (PFK) hem farmakolojik antidepresanlarla hem de EKT ile arttığı gösterilmiştir [30, 34]. Kemirgenlerde çeşitli stres paradigmaları sonucu *bdnf* ifadesinin azaldığı gösterilirken majör depresyon hastalarının serumlarında ve ölümardı hipokampuslarında BDNF düzeylerine dair karışık sonuçlar yayımlanmıştır [35]. Öyle ki depresyonda BDNF hipotezinin henüz çok yüzeysel olduğu, BDNF aracılı sinyallerin strese ve antidepresanlara nöroplastik cevapta yer aldığı ancak bu etkilerin bölgeye özgü olduğu, farklı antidepresanlarla BDNF yanıtlarının topografisinin farklı olduğu ve bütün bu değişikliklerin diğer güçlü genetik ve çevresel etkenlerin etkisi altında gerçekleştiği düşünülmektedir [36]. Tailaz ve arkadaşları tekrarlayan EKN'ler sonrasında *bdnf* ifadesinin hipokampusta arttığını ancak ventral tegmental alanda azaldığını bulmuş; antidepresan cevabın sanıldığı gibi hipokampusta *bdnf* indüksiyonunun artması ile değil, ventral tegmental alanda *bdnf* geninin susturulması ile önlendiğini göstererek BDNF'nin bölgesel dağılımının önemini ortaya koymuştur [37]. EKN ve çeşitli farmakoterapiler sonrasında sıçan

beyninin çeşitli bölgelerinde BDNF düzeylerini araştıran bir çalışmada, tek EKN sonrası kontrollere göre sadece amigdala %25 BDNF artışı olduğu bulunmuştur [33]. Bu çalışmada tek EKN sonrası hipokampusta BDNF artışının saptanmaması, EKN'den sonra 24. saatte sakrifiye edilen hayvanlarda BDNF'nin birçok çalışmada tespit edilmiş daha erken saatlerdeki artıştan sonra tekrar eski düzeylerine inmiş olabileceği lehinde yorumlanmıştır. Aynı çalışmada 10 gün boyunca uygulanan EKN'ler sonrasında hipokampus, frontal korteks, amigdala ve beyin sapında %40-100 artış saptanmış; dezipramin (10 mg/kg), fluoksetin (10 mg/kg) ve fenelzin (10mg/kg) ile 21 gün enjeksiyon sonrasında BDNF'nin sadece frontal kortekste %10-30 arttığı gösterilmiştir [33]. Bu çalışmada olduğu gibi kronik antidepresan tedavisi ile hipokampusun bütününde BDNF proteini artışı gösterememiş başka çalışmalar da mevcuttur; bunun nedeni hipokampusun tüm bölgelerinin işleme alınarak yeterli uzaysal çözünürlüğün sağlanamaması olabilir [31]. Fluoksetin ile 21 günlük tedavi sonrası BDNF immunoreaktivitesinin CA2 ve CA3 bölgelerinde arttığı ancak dentat girusta artmadığı gösterilmiştir [38]. Nordgren ve arkadaşları yaptıkları çalışmada tekrarlayan EKN'ler sonrasında *bdnf* ifadesinin dentat girusta, CA1, CA3 ve CA4'tekine göre belirgin derecede daha güçlü uyarıldığını ortaya koymuşlardır [39]. Özetle hayvan çalışmaları farmakolojik antidepresanlarla prefrontal kortekste ve hipokampusun genelinde olmasa bile belirli bölgelerinde BDNF ifadesi ve miktarının arttığını göstermektedir. EKN sonrasında hipokampus ve PFK dışındaki beyin bölgelerinde de görülen artmış BDNF protein düzeyi, EKT'nin tedaviye dirençli depresyonlardaki etkinliğinin altında yatan mekanizmalardan biri olabilir [31].

Literatürde insanlarda EKT sonrasında kanda BDNF düzeyinin arttığını [40-42] ve değişmediğini saptayan çalışmalar mevcuttur [43, 44]. Lin ve arkadaşları tedaviye dirençli 55 depresyon hastası ile yaptıkları çalışmada EKT sonrası kan BDNF düzeyinde değişiklik ya da bazal BDNF düzeyi ile tedaviye yanıt arasında ilişki saptamamışlardır [45]. Literatürdeki bu çelişkili bulgular, BDNF düzeylerinin plazmada ya da serumda bakılması, kanların EKT sonrası kaçınıcı günde toplandığı,

EKT'nin yanında kullanılan ilaçlar, örneklemin yaş ortalaması, hastaların ektanıları ile ilişkili olabilir.

Newton ve arkadaşları birçok büyüme faktörü ve EKN arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında, tekrarlayan EKN'lerden sonra sıçanlarda BDNF'ye ek olarak vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), sinir büyüme faktörü (NGF), *neuritin*, vasküler büyüme faktörü (VGF) ve fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF 2) ifadelerinin de arttığını göstermiştir [46]. Segi-Nishida ve arkadaşlarının sıçanlarla yaptıkları çalışmada dentat girusun supragranüler bölgesinde EKN'nin VEGF aracılığı ile yeni nöron oluşumunu sağladığı ortaya konmuştur [47]. EKT'nin sadece mitotik aktiviteleri yüksek, erken nöron progenitörlerinin (ENP) çoğalmasını tetiklediği gösterilmiş olan fluoksetinden farklı olarak hem ENP'leri hem de çoğalma hızları daha yavaş olan latent nöral progenitörlerin çoğalmasını tetiklediği, bu etkinin hem tek hem de tekrarlayan uygulamalar sonrasında hızlıca ortaya çıktığı gösterilmiştir. EKN'nin latent nöral progenitörleri de uyarabildiğini gösteren bu bulgular EKN'nin neden kimyasal antidepresanlara göre nörojenezi daha hızlı ve daha fazla tetiklediğini açıklayabilir [48]. Ito ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada tekrarlayan EKN'nin nörojenezi 10 kat, tek EKN'nin ise 1.3 kat tetiklediğini göstermişlerdir [49]. EKN'nin yeni nöron oluşumu dışında hipokampusta endotel hücreleri ve glia hücrelerinde de artışa neden olduğu bildirilmiştir [50, 51]. Jansson ve arkadaşları sıçanlarda glial progenitör hücrelerin hipokampusun yanı sıra prefrontal korteks, amigdala, hipotalamus, piriform korteks ve entorhinal kortekste de arttığını bulmuştur.

EKN'nin sinaptik plastiklik üzerinde de etkileri olduğu gösterilmiştir. EKN hipokampusta sinaptik proteinlerde, sinaps sayısında artışa neden olmaktadır [52, 53]. Tekrarlayan EKN hipokampus granül hücrelerinin aksonlarının (*mossy fibers*) tomurcuklanmasını (*sprouting*) arttırmakta ve bu etki uygulamadan sonra altıncı aya kadar görülebilmektedir [54, 55]. Olgun hücrelerdeki sinaps yoğunluğunu arttırmasının yanı sıra EKN'nin yeni oluşan hücrelerdeki dendritik dikenlerin olgunlaşmasını destekleyerek [56], bu hücrelerin dentat devre içinde daha güçlü sinaptik bağlantılar kurmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir [57]. Nordgren

ve arkadaşları EKN'nin sinaptik yapıların stabilizasyonunu sağlayan anahtar moleküllerin ifadesini geçici olarak azaltırken nörotrofik faktörlerde artışa neden olduğu, böylece sinaptik plastikliğin arttığı kısa bir zaman penceresi sağladığını, hemen ardından sinaptik ağın yeni ve bir miktar değişmiş şekilde tekrar stabilize olduğunu öne sürmektedir [39]. EKN'nin hem etki hem de yan etkilerinin sinapsların bu şekilde yeniden düzenlemesi ile ilişkili olabileceğinin üzerinde durulmaktadır.

213. EKT ve İnflamatuvar Yanıt

Depresyon patogenizinde ve antidepresan tedavilerin etki mekanizmalarında bağışıklık sisteminin rolü olduğuna işaret eden kanıtlar tıbbın diğer bir çok alanında olduğu gibi depresyon araştırmalarında dikkatleri inflamatuvar süreçlere çekmiştir [58]. Bu kanıtlara örnek vermek gerekirse depresyon ile ilişkili olduğu öne sürülen bağışıklık sistemi genlerindeki polimorfizmler [59], depresyon hastalarında büyük çaplı epidemiyolojik çalışmalar ve meta-analizlerde ortaya konan C-reaktif protein [60], interlökin-6 (IL-6) [56], IL-14 ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF-a) [61], IL-1 [62] gibi proinflamatuvar aracılardan kan düzeylerindeki artış ve depresyon hastalarının PFK'larının ölümüne incelemelerinde tespit edilen çeşitli inflamatuvar sitokinlerin ifadelerindeki artıştan bahsedilebilir [63]. Bunların yanı sıra hepatit C enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan interferon-alfa (INF-a) kullanımı sırasında olduğu gibi, proinflamatuvar sitokinlerin kullanıldığı tedaviler esnasında hastaların önemli bir kısmında depresyonun tetiklenmesi [64] ve kronik inflamasyonla ilişkili olduğu bilinen diyabetes mellitus, kardiyovasküler hastalıklar ve otoimmün hastalıklarda depresyon eş tanısının sıklığı da araştırmacıları bağışıklık sistemi elemanları ve inflamatuvar yanıt üzerinde çalışmaya davet etmiştir [58]. Depresyon hastalarındaki proinflamatuvar durumun hastalığın etiyolojisinde, patogeneğinde ve gidişinde etkili olduğu düşüncesi birçok araştırmaya temel olmuştur, öyle ki PubMed'de inflamasyon ve depresyon anahtar kelimeleri ile yapılan arama sonucunda 2016 yılında bu konuda 604 çalışmanın basıldığı öğrenilmiştir. Ancak özellikle psikiyatri literatüründe inflamasyon terimine atfedilen süreçler ne yazık ki açık değildir. Bağışıklık yanıtı, inflamasyon, inflamatuvar yanıt gibi terimler

değişmeli olarak kullanılabilmekte ve bu yanıtların merkezi ya da periferik sinir sisteminde ortaya çıkışı arasında bir ayırım yapılmamaktadır. Tarafımızca bu tutum hücreler arası iletişimde oynadığı önemli rol gittikçe belirginleşen inflamatuvar yanıt ve geleneksel olarak doku hasarı ile ilişkilendirilmiş inflamasyon arasındaki farkın atlanmasına neden olmaktadır. Öte yandan bahsi geçen süreçlerin inflamasyon olarak adlandırıp adlandırılmayacağı tartışmalıdır, keza inflamasyon patolojik bir tanımlamadır ve örneğin akut dönemde dokuya ödem, vazodilatasyon, hücre göçü, proinflamatuvar sitokinlerin etkinliğindeki artış gibi işaretler üzerinden tanımlaması yapılır [65]. Bazı yazarlar nöroinflamatuvar süreçlerin hepsini bir başlık altına alıp şiddetine ve süresine göre derecelendirmeyi önermektedir. Örneğin travmatik beyin hasarı şiddetli geçici bir inflamasyon ile ilişkilendirilmişken, nörodejeneratif hastalıklar şiddetli kronik inflamasyon ile ilişkilendirilmiştir [66]. Depresyonun düşük-orta şiddette inflamasyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir, öyle ki nörodejeneratif hastalıklarda veya travmatik beyin hasarında olduğu gibi kan beyin bariyeri geçirgenliğinde artış, adaptif bağışıklık hücrelerinin beyin dokusuna belirgin infiltrasyonu veya hücre ölümü görülmez. Aynı yazarlar nöroinflamasyonun olumlu yönleri başlığı altında bağışıklık sistemi ve beyin arasındaki karşılıklı etkileşimden doğan düşük şiddetli geçici inflamasyonu, fizyolojik gelişim, öğrenme ve hafızada rol aldığı gösterilmiş nöroinflamatuvar sinyal yolağını ve doku hasarına yanıt olarak ortaya çıkan geçici ve orta şiddette inflamasyonu birlikte sıralandırmışlardır. Literatürde bağışıklık sistemi hücrelerini ve araçlarını içeren her süreç inflamasyon olarak anılabilmektedir. Ancak birbirinden şiddet, süre ve sonuç açılarından bu kadar farklı olan süreçlerin aynı sürecin farklı noktalarını değil de benzer hücre ve araçları kullanan farklı mekanizmaları yansıttığı olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Nitekim bağışıklık sisteminin hücre ve araçlarının farklı şartlar altında farklı davrandıkları artık iyi bilinmektedir [67]. Sıkı düzenlenmiş, kısa süreli, birçok fizyolojik süreçte rolü olan ve iç ve dış uyaranların homeostazda yarattığı kaymalara bağlı tetiklenen inflamatuvar yanıtın, kronik ve şiddetli inflamatuvar süreçlerden farkının niceliksel değil niteliksel olabileceği unutulmamalıdır [68]. Bağışıklık elemanları birbirleriyle ve çevreleri ile oldukça karmaşık etkileşimlere girerler, bu

nedenle geçici ve iyi kontrol edilen nöroinflamatuvar yanıt ile benzer sinyal yollarının rol aldığı ancak patolojik sonuçların gözlemlendiği inflamasyonu bir süreklilik içinde düşünmek doğru olmayabilir. Öyle ki SSS'deki inflamatuvar yanıtı ifade eden nöroinflamatuvar yanıt fizyolojik süreçlerin bir parçası olabileceği gibi ortamdaki olumsuz koşullar ile birlikte patolojik durumların ortaya çıkmasına giden yolu başlatabilir ve güçlendirebilir [69]. Bu nedenle ilerleyen paragraflarda çalışma bulgularına yaklaşırken inflamatuvar süreçler arasındaki farkların mümkün olduğunca gözetilmesi hedeflenmiştir.

EKT alanında şimdiye kadar yapılan çalışmalar EKT sonrası sitokinlerin kan düzeyleri ve periferik doğal bağışıklık hücreleri etkileri üzerine yoğunlaşmıştır. Az sayıdaki çalışmada kemirgenlerde EKN'nin mikrogliaların etkinliği üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ancak bilindiği kadarı ile şimdiye kadar bizim çalışmamızda olduğu gibi tek EKN'den sonra beyin dokusunda hücre düzeyinde hücreler arası iletişimde önemli rolü olduğu gösterilmeye başlanan nöroinflamatuvar yanıt incelenmemiştir. Aşağıda önce depresyon hastalarında tek ve tekrarlayan EKT'lerin periferik kandaki etkileri, daha sonra ise tek ve tekrarlayan EKN'lerin kemirgenlerde makrofajlar ve mikrogliya etkinliği üzerindeki etkisine değinilecektir.

Antidepresanların bağışıklık sistemini düzenleyici etkileri olduğu, bağışıklık sistemini düzenleyen faktörlerin de antidepresan etkileri olduğu gösterilmiş [70, 71]; yapılan meta-analizler antidepresan tedavi sonrasında periferik proinflamatuvar sitokin düzeylerinin düştüğünü ortaya koymuştur [72, 73]. Depresyon hastalarında tek EKT'den sonra plazma IL-1b ve IL-6 düzeylerinin 3 saate kadar arttığı, 24 saat içinde bazal seviyeye döndüğü gösterilmiştir [74]. Hestad ve arkadaşlarının (2003) yaptıkları çalışmada tedavi öncesi sağlıklı kontrollere göre yüksek olan plazma TNF- a düzeylerinin ilk EKT'den sonra arttığını ve tekrarlayan EKT'ler sonrasında sağlıklı kontroller düzeyine gerilediği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada 12. EKT seansından 24 saat sonra proinflamatuvar sitokinler olan IL-5 ve eotaxin-3 ifadesinde azalma saptanmıştır [75].

Majör depresyon hastalarında nötrofil sayılarının sağlıklı kontrollerdekine göre daha yüksek olduğu, doğal katil (DK) hücrelerinin etkinliğinin azaldığı ve T

hücrelerinin mitojen ile daha az çoğaldıkları bildirilmiştir [76]. EKT'nin doğal hücrel bağışıklık üzerindeki etkilerini araştıran çalışmaların sonucunda tek EKT'den sonra DK hücrelerinin etkinliğinin dakikalar içinde arttığı gösterilmiştir [77, 78]. Lipopolisakkarid (LPS) uyarımı sonrası monositler tarafından üretilen IL-6 düzeyinde tek EKT'den sonra artış olduğu; lökosit, monosit, granülosit ve DK hücrelerinin sayısında yarım saat içinde bazal seviyelere dönen bir artış tespit edildiği bildirilmiştir [9]. Aynı çalışmada benzer tablonun 5. EKT ve 11. EKT'den sonra da tespit edilmesi bazı yazarlara tekrarlayan EKT'lerin tek tek EKT'lerin etkilerinin üzerine ek bir etkisi olmayabileceğini düşündürmüştür [79].

Hayvan çalışmalarında ise tekrarlayan EKN'lerin peritoneal makrofajların metabolik aktivitesini ve çoğalma hızını arttırdığı gösterilmiştir [80]. SSS'de ise tekrarlayan EKN'lerden sonra SSS infiltrasyonu olmaksızın hipokampal damarlara makrofaj akışının arttığı bulunmuştur [81]. EKN'nin beyin parankimindeki bağışıklık sistemi elemanlarının etkileri üzerine yapılmış az sayıda çalışmalar, tekrarlayan EKN'lerden sonra mikrogliaların sayısı ve etkinliğinde bir artış olduğunu [82, 83] ve bu değişikliklerin tekrarlayan EKN'lerden sonra hipokampusta 4 haftaya kadar kalıcı olabileceğini göstermiştir [84]

Çalışmalar tek EKT ve EKN'den sonra periferik kanda ve mikroglialarda inflamatuvar etkinliğin arttığını göstermektedir [8, 74, 84]. İlk bakışta etkili bir antidepresan olan EKT'nin inflamasyonu çağrıştıran etkilerinin olmasına anlam vermek zor olsa da yukarıda değindiğimiz inflamasyon ve inflamatuvar yanıt arasındaki fark bu durumu kavramamıza olanak verebilir. Van Buel ve arkadaşları her EKT'den sonra geçici bir inflamatuvar etkinlik olduğunu ancak bazı çalışmalarda tekrarlayan EKT'lerden sonra görülen bağışıklık parametrelerindeki düşüşün EKT'nin değil depresyonun iyileşmesi ile ilişkili olan başka bir süreci yansıttığını olabileceğini öne sürmüşlerdir [79]. Öyle ki antidepresan etkinliği yetersiz olduğu bilinen tek bir EKT'den sonra oluşan inflamatuvar etkinlik tekrarlayan EKT'ler sonucunda belki antidepresan yanıtı katkıda bulunuyor olsa da henüz o aşamada (o düzey ve sürede) depresan veya antidepresan etki ile ilişkili olmayabilir. Çoğunlukla periferik kandan elde edilen bu sonuçlar yorumlanırken kaçırılmaması gereken başka

bir nokta periferik inflamatuvar yanıtın SSS'deki inflamatuvar yanıtı etkilediği veya tetiklediğini gösteren kanıtlar olsa da bu etkinin niceliği ve niteliğinin bilinmiyor olduğudur [85]. Elbette tek EKT ve EKN ile tetiklenen inflamatuvar yanıtın bize çelişkili gelmesinin en önemli nedeni uzun süredir IL-1b, IL-6 gibi sitokinlerin sadece patolojik etkileri üzerinde durulması, hücreler arası iletişimde etkin rol aldığı son yıllarda ortaya çıkan moleküllerin zihnimizde kabaca patolojik ve fizyolojik olarak ikiye ayrılmasıdır. Sitokinlerin ve hatta diğer bir çok hücreler arası aracının farklı şartlar altındaki çeşitli davranışları gün geçtikçe ışığına çıkmaktadır. Bu durum aşağıda depresyon literatüründe en sık çalışılmış sitokinlerden biri olan IL-1b'nin patolojik ve fizyolojik süreçlerdeki rolleri üzerinden tartışılacaktır.

Depresyon hastalarının kanlarında IL-1 düzeylerinin kontrollere göre daha yüksek olduğu ve antidepresan tedaviler ile kontrollerin düzeyine indiği birçok klinik çalışmada gösterilmiştir [61, 72]. Kemirgenlerde yapılan çalışmalar IL-1b'nin stresle tetiklenen davranışların ortaya çıkmasında anahtar bir aracı olduğuna işaret etmektedir. Kemirgenlerde stres sonrası IL-1b düzeylerinin hipokampusta arttığı [86, 87], IL-1b reseptörünün farmakolojik blokajı veya “*null mutasyonunun*” stresin anti-nörojenik ve depresyon benzeri etkilerini önlediği gösterilmiştir [88]. IL-1b'nin ventrikül içine enjeksiyonunun hipokampusta hücrelerin çoğalmasını baskıladığı [89], *bdnf* ifadesini azalttığı [90], hipokampal uzun süreli potansiyelizasyonu baskıladığı [91], öğrenme üzerinde olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir [92]. Koo ve arkadaşları [93] bir çalışmalarında IL-1b'nin bu etkilerinin NF-kB sinyal yolağının etkinleşmesi üzerinden gerçekleştiğini öne sürmüştür.

IL-1b ifadesi “*Toll Like Receptor 4*” (TLR 4)'ün etkinleşmesi (*activation*) ile artmakta, üretilen pro-IL-1b aktif formu olan IL-1b'ye kaspaz-1 aracılığı ile dönüşmektedir. IL-1b'nin oluşum süreci ve salınımı inflamazom adı verilen multiprotein kompleksleri aracılığı ile olmaktadır [94] (Şekil 2.1). İnflamazom kompleksleri genelde üç temel parçadan oluşur: hücre içi bir kalıp tanıma reseptörü (PRR) olan “*Nod-like receptor*” (NLR), kaspaz-1'in öncülü prokaspaz-1 ve adaptör protein “*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*” (ASC)'den oluşmaktadır [95]. NLR'nin değişken amino terminali farklı NLR alttiplerini belirler.

Bu grubun içinde en çok çalışılan ve birbirinden farklı tehlike sinyalleri ile aktive olan NLRP3'tür. NLRP inflamazomları dışında AIM2 ve IFI16 adlarında PHYIN içeren inflamazomlar da tanımlanmıştır. NLRP3 içeren inflamazomun etkinleşmesi kaspaz-1'in etkinleşerek IL-1b ve IL-18'i olgunlaştırması ile sonuçlanır [95]. TLR4 dışında ATP, hücre içi K⁺ konsantrasyonunda düşüş, P2X7 reseptör uyarımı ile de inflamazomun etkinleşebileceği gösterilmiştir [96]. İnflamazomun P2X7 reseptörü üzerinden ve yüksek hücre dışı K⁺ konsantrasyonu nedeni ile etkinleşmesinin, hücre membranındaki seçiciliği düşük ve büyük gözenekli Panx1 kanalları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [96, 97]. Iwata ve arkadaşları inflamazomun, psikolojik ve fiziksel stresörlerin depresyon etiyolojisine katkılarında merkezi bir önemi olduğunu, psikolojik bir uyarının inflamatuvar bir cevaba dönüşmesine aracılık ettiğini öne sürmüşlerdir [98]. Bu hipotezle uyumlu olarak Wu ve arkadaşları LPS ile depresyon davranışı tetikledikleri çalışmalarında HMGB1, IL-1b ve NLRP3 ifadesinde belirgin artış olduğunu göstermişlerdir [99]. Başka bir çalışmada kronik strese maruz bırakılan farelerde HMGB1 miktarındaki artışa ikincil NF-kB üzerinden NLRP3'ün hazırlandığı (*priming*), bu şekilde stresten sonra uygulanan LPS ile bağışıklık cevabının daha güçlü tetiklendiği bildirilmiştir [100]. Iwata ve arkadaşlarının 2015 yılında farelerde yaptıkları çalışmada akut immobilizasyon stresi sonucunda hipokampusta hücre dışında artan glutamat düzeyinin glialardan ATP salınımına neden olduğu, ATP'nin P2X7 reseptörü aracılığı ile IL-1b, TNF-a ve etkinleşmiş NLRP3 düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir [101]. Aynı çalışmada kronik stres uygulaması sonrasında P2X7 reseptörünün blokajı ile antidepresan benzeri davranış görüldüğü, nörojenizde görülen baskılanmanın azaldığı bildirilmiştir [101]. Kemirgenlerde yapılan çalışmalar beyin parankimindeki nöroinflamatuvar yanıtı odaklanırken, depresyon hastalarında yapılan çalışmalar genellikle periferik kanda ortaya çıkan inflamatuvar yanıtı ele alır. Bu iki kompartmanın geçişliliği üzerine çalışmalar sürmektedir. Buna rağmen majör depresyon hastalarından elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinde tespit edilen NLRP3'ün etkinliğinin ve yükselmiş serum IL-1b ile IL-18 düzeylerinin

amitriptilin tedavisi alan grupta görülmemiş olması inflamazomun depresyon etiyojisi ve tedavisinde oynadığı iddia edilen merkezi rolü destekler [102].

IL-1b'nin yukarıda bahsedilen nörogenez ve plastiklik üzerindeki olumsuz etkilerine karşılık bazı çalışmalar hafıza ve öğrenmede IL-1b'nin fizyolojik sürecin bir parçası olduğuna işaret etmektedir [88, 103]. Goshen ve arkadaşları ventrikül içine düşük dozda enjekte edilen IL-1'in hipokampusa bağımlı hafızayı geliştirdiği, IL-1 sinyal yolağının blokajının hafızayı bozduğunu ancak yüksek dozda enjekte edilen IL-1'in hafıza üzerinde negatif etkileri olduğunu göstermişlerdir [103]. Benzer bir ikili rol Nf-kB'nin etkinleşmesi ve nörogenez ilişkisini konu alan araştırma sonuçlarında da karşımıza çıkmaktadır. Birçok hücrede hücre ölümü ve hayatta kalımını düzenleyen Nf-kB'nin inflamasyondaki rolü çift taraflıdır. Nöronal Nf-kB yolağı nöronların hayatta kalımını sağlar, sinaptogenez ve plastikliğe katkıda bulunur, öğrenme ve hafızada rolü vardır [104-107]. Fizyolojik şartlarda Nf-kB yolağının orta şiddette etkinleşmesi nöral kök hücrelerin nöral progenitör hücrelere farklılaşmasını destekler, ancak kalıcı ve tekrarlayan şiddetli etkinleşme yaşlı hastalarda ve kronik stres durumunda görüldüğü gibi nörogenezi azaltmaktadır [108]. Özetle, proinflamatuvar sitokinlerin nörogenez üzerindeki etkilerinin konsantrasyona, hangi hücrelerin etkinleştiğine (astrozit ve mikroglia) ve nörojenik niş içindeki salınmış diğer faktörlerin varlığına bağlı olduğu düşünülmektedir

Nörogenez ve sinaptogenez, çeşitli büyüme faktörlerinin ve nörotrofik faktörleri barındıran, damar ağı ile çevrelenmiş ve glia hücrelerinin desteklediği, sürekli değişim halinde olan bir kimyasal ve elektriksel mikroçevrede gerçekleşmektedir [109]. Hem bağışıklık sistemi hücreleri hem de nöron ve glia hücreleri tarafından birbirinden farklı bir çok endojen ve ekzojen uyarana cevap olarak salınabilen bağışıklık sistemi araçları, bu karmaşık mikroçevre içinde hücreler arası iletişime ve dolayısıyla hem patolojik hem de fizyolojik süreçlerin düzenlenmesine katkıda bulunuyor olabilir.

Yukarıda özetlendiği üzere EKT ve EKN'nin periferik bağışıklık elemanları ve araçları üzerine etkileri incelenmiş, beyin parankiminde mikrogliaları etkinleştiği gösterilmiştir [8, 74, 84]. Tek EKT'nin inflamatuvar bir yanıtı tetiklediğine dair

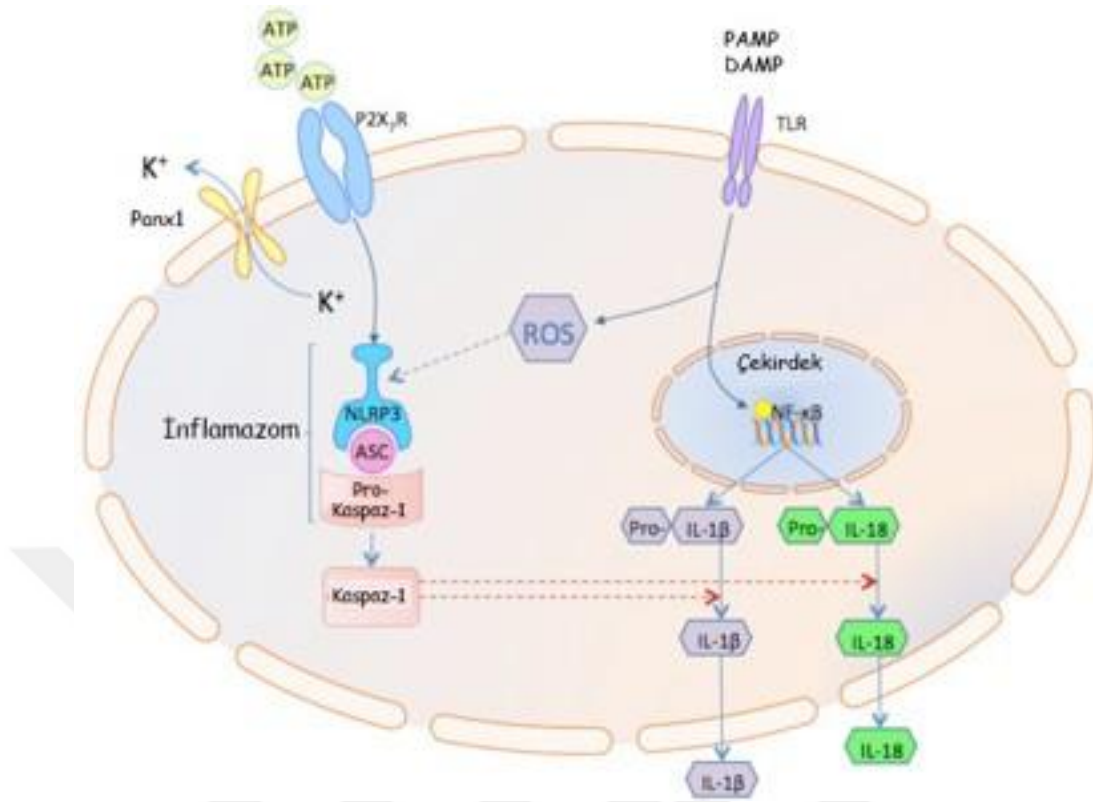
periferik kanda işaretler tespit edilmiş olsa da beyin parankiminde tek EKT ile nöroinflamatuvar yanıt arasındaki ilişki bilindiği kadarı ile henüz incelenmemiştir. Tek EKN'den sonra nöroinflamatuvar yanıtın hücresel düzeyde incelenmesi, nöroenez ve sinaptogenez üzerinde karmaşık etkileri olduğu gösterilmiş inflamatuvar moleküllerin, EKT'nin etki mekanizmalarındaki olası rollerini açığa çıkarma yoluna katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

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

2.2.1. HMGB1 ile ilgili Genel Bilgiler

“High mobility group” (HMG) proteinleri 40 yıldan uzun bir süre önce çekirdekte keşfedildiğinde elektroporetik poliakrilamid jellerdeki yüksek mobiliteleri nedeni ile bu ismi almışlardır [110]. HMG proteinlerinin HMGA, HMGB ve HMGN olarak adlandırılan üç ailesi vardır. Hepsi deoksiribonükleik aside (DNA) bağlanabilmekte ve DNA'nın şeklini değiştirebilmektedir. “High mobility group box” (HMGB) ailesinin aralarında %80 amino asit benzerliği olan üç üyesi de (HMGB1, HMGB2 ve HMGB3) DNA'nın minör oluklarına HMG kutuları aracılığı ile bağlanmaktadır. En yaygın bulunan HMGB ailesi üyesi HMGB1 bu yolla DNA'yı çeşitli transkripsiyon faktörlerinin kromatine temas etmesini sağlayacak bir şekle sokar ve transkripsiyona olanak tanır. Ayrıca HMGB1'in DNA'nın hem tamiri hem de nükleozomlara paketlenmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir [111]. HMGB1'in çekirdek içindeki bu görevleri yaşamın devamı için gereklidir. Öyle ki HMGB1 geni silinmiş fareler, transkripsiyonda oluşan bozukluklar sonucu yetersiz glukokortikoid reseptör işlevine bağlı hipoglisemi nedeni ile doğumdan hemen sonra ölmektedir [112].

DNA'ya gevşek ve geri dönüşümlü bağlanan HMGB1 hücre içinde oldukça hareketli bir moleküldür, nükleer porlar aracılığı ile nükleus ve sitozol arasında gidip gelir. Travma, enfeksiyon, stres gibi durumlarda hücre dışına aktif veya pasif olarak salınabilmekte; çeşitli reseptörlere bağlanarak proinflamatuvar sitokinlerin sentezini uyarmaktadır. Bu özelliği ile HMGB1, alarminler olarak da bilinen, hücre hasarına



Şekil 2.1. İnflamazomun etkinleşmesi ve IL-1b salınımı. IL-1b ifadesi TLR 4 etkinleşmesi ile artmakta, üretilen pro-IL-1b aktif formu olan IL-1b'ya kaspaz-1 aracılığı ile dönüşmektedir. IL-1b'nin oluşum süreci ve salınımı inflamazom adı verilen multiprotein kompleksleri aracılığı ile olmaktadır. TLR4 dışında ATP, hücre içi K⁺ konsantrasyonunda düşüş, P2X7 reseptör uyarımı ile de inflamazomun etkinleşebileceği gösterilmiştir. İnflamazomun P2X7 reseptörü üzerinden ve yüksek hücre dışı K⁺ konsantrasyonu nedeni ile etkinleşmesinin, hücre membranındaki seçiliği düşük ve büyük gözenekli Panneksin 1 kanalları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Şekil Scarpioni ve arkadaşlarından (2016) Türkçeye uyarlanmıştır.) [113].

işaret eden ve doğal bağışıklık sistemini uyaran hasar aracılı moleküler patern (DAMP) moleküllerinin prototipidir ve bazı yazarlarca doğal bağışıklığın ana düzenleyicisi olarak görülmektedir [114]. Son yıllarda doğal bağışıklık hücreleri dışında endotel hücreleri, trombosit, hepatosit, enterosit, pitusit, mikrogliya, astrosit ve nöronlardan da proinflamatuvar uyarılara cevaben salındığı ve salınan HMGB1'in proinflamatuvar cevabı indüklediği gösterilmiştir [100, 115-117]. HMGB1 aracılığı ile beyin dokusunda artan proinflamatuvar yanıtın nöbet, iskemi ve travma sonrası ortaya çıkan nöroinflamasyon ile ilişkisi birçok çalışmada ortaya

konmuş; bu patolojilerde HMGB1 yeni bir tedavi hedefi haline gelmiştir [115, 118, 119].

HMGB1 evrim süresince yüksek oranda korunmuş olup tüm memeliler arasında %99 benzerlik göstermektedir. 13q12 gen lokusunda bulunan *hmgb1* geni, 215 amino asit içeren 30kD'luk bir protein kodlar ve neredeyse tüm ökaryotik hücrelerde ifade edilir; ancak çekirdekteki ifadesi büyüme ve yaş ile değişir [120]. Yapısal olarak DNA bağlayan iki bölge (A kutusu ve B kutusu) ve asidik karboksi terminalinden oluşur. DNA'ya bağlı değilken, HMGB1'in uzun asidik kuyruğu, A-kutusu ve B-kutusu yapılarına bağlanarak bu yapıların protein etkileşimlerinden korunmasını sağlar [121]. HMGB1 A-kutusu ve B-kutusu yapılarının yardımıyla DNA'nın minör oluşuna bağlanır ve helikal yapının bükülmesini tetikler. Böylece steroid hormon reseptörleri, NF-kB, p53 ve RAG1 rekombinazın transkripsiyonel aktivitelerini düzenler [120]. Yapı-işlev analizi çalışmaları HMGB1'in sitokin aktivitesinin B kutusu tarafından gerçekleştirildiğini, A kutusunun ise HMGB1 aracılı proinflamatuvar sitokinlerin makrofajlardan sekresyonunu azaltan spesifik bir antagonist olarak görev yaptığını göstermiştir [121].

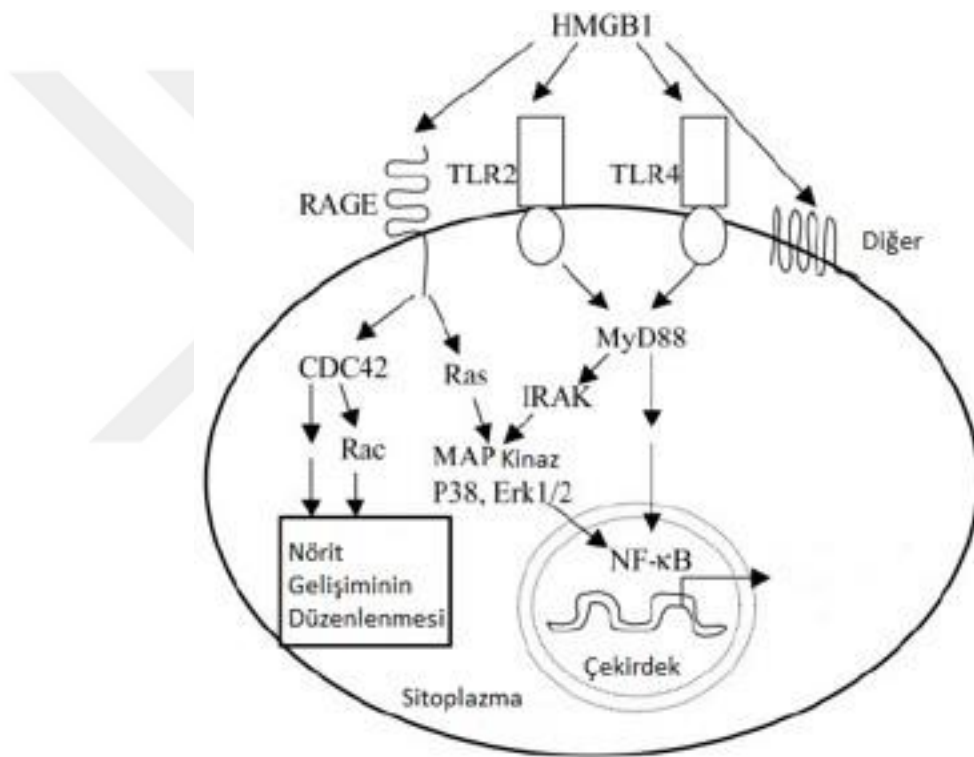
HMGB1 ilk olarak kromatine bağlı bir çekirdek proteini olarak keşfedilmiş, daha sonra hücre dışı bir sinyal molekülü olduğu bulunmuş, son dönemde ise otofaji, virüsleri tanıma ve immunometabolizmada rolü olduğu ortaya konmuştur [111]. Birbirinden farklı bu etkilerinin altında HMGB1'in yer aldığı hücre kompartmanı, farklı reseptörleri ve redoks izoformlarının yattığı düşünülmektedir [111]. HMGB1, ikisi disülfid bağı oluşturabilen üç sistein rezidüsü (C23, C45 ve C106) içermektedir. Çevredeki oksidasyon durumuna hassas bu üç izoform, "disülfid HMGB1", "tam indirgenmiş tiyol HMGB1" ve "okside HMGB1" olarak adlandırılmıştır [122]. Çekirdekte daha ziyade tiyol izoformu bulunur ve nekrotik dokuda en çok tiyol formu salınır. Kemokin "CXCL12" ile bir kompleks oluşturarak nekroza giden bölgeye inflamatuvar hücreleri çektiği gösterilmiştir [123]. Disülfid formu ise TLR 4 üzerinden inflamatuvar araçların ve sitokinlerin üretimini uyarak proinflamatuvar sitokinlere benzer hareket eder [124]. Akut veya kronik inflamasyon sırasında hücre dışında ve serumda biriken HMGB1 çoğunlukla disülfid formundadır [111]. Okside

HMGB1'in henüz bir işlevi gösterilememiş olup, HMGB1'in diğer izoformlarının oksidasyon ile etkisiz hale getirilmesinin bir geri bildirim mekanizması olabileceği üzerinde durulmaktadır [111]. İndirgenme ve yükseltgenmeye bu kadar hassas olmasının HMGB1'in bulunduğu mikroçevrenin değişen koşullarına göre farklı işlevleri yerine getirebilmesine olanak tanıdığı düşünülmektedir [125].

Birçok hücrede HMGB1 yoğun olarak çekirdek içinde bulunur, kalıp tanıma reseptörlerinin (PRR) etkinleşmesinden dakikalar sonra ise sitoplazmada birikmeye başlar. HMGB1 nükleer porlardan sürekli, aktif olarak girip çıkmaktadır. Sitoplazmada HMGB1'in birikme hızı nükleer lokalizasyon sekanslarında yer alan lizin rezidülerinin asetilasyon durumuna bağlıdır. Histon asetiltransferazların lizinlerin asetillenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir [126]. HMGB1'in çekirdekten sitoplazmaya ve takiben sitoplazmadan hücre dışına geçisini kontrol eden iki kritik düzenleyici basamak vardır. JAK-STAT molekülleri asetilasyon hızını düzenleyerek çekirdekten sitoplazmaya geçişi düzenlerken [127], NLRP3 inflamazomun ve kaspaz-1'in etkinleşmesi HMGB1'in sitoplazmadan hücre dışına salınmasını düzenler [128]. HMGB1 sitoplazmada sekretuar veziküllerde birikir ve endoplazmik retikulum/golgi yolağı dışında bir mekanizma ile aktif olarak hücre dışı ortama salınır [129]. Aktif salınımının dışında HMGB1 hücre dışına nekrotik hücrelerden pasif olarak da salınabilmekte ve proinflamatuvar cevabı uyatabilmektedir [129]. Apoptoza gitmekte olan hücrelerden HMGB1 salınımı gerçekleşmemektedir, bunun nedeninin HMGB1'in enzimatik olarak kesilmiş DNA parçalarına veya apoptotik çekirdekteki hipoasetile proteinlere sıkıca bağlanması olduğu düşünülmektedir [130].

Hücre dışına salındıktan sonra HMGB1'in PRR'ler (TLR 2 ve TLR4) ve "receptor for advanced glycation end products" (RAGE) üzerinden hareket ettiği düşünülmektedir [131]. RAGE etkinleşmesi hem hücre göçü ve çoğalmasını sağlayan yolağı hem de proinflamatuvar sitokin sentezini uyaran yolağı başlatabilir. Bu yolaklardan biri hücre motilitesi ve nörit uzamasını (*outgrowth*) düzenleyen guanozin trifosfataz CD42 ve RAC etkinleşmesine neden olurken, bir diğeri NF- κ B'yi etkinleştiren çeşitli "mitogen activated protein kinases" (MAPK)'lerin

fosforilasyonuna neden olur [132]. TLR2 ve TLR4'ün etkinleşmesi de MyD88 aracılığı ile benzer MAPK'ları fosforile ederek NF- κ B'nin çekirdeğe girmesi ile sonuçlanır [132]. Son yıllarda HMGB1'in MAPK üzerinden inflamatuvar sitokinlerin ifadesini arttırmasının yanı sıra nöronal kök hücre ve endotelial progenitör hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı gösterilmiştir [133, 134]. HMGB1'in aktivitesinin reseptöre beraber bağlandığı moleküllere (IL-1, endotoksin, trombomodulin) bağlı olarak arttığı veya azaldığı bilinmektedir [111]. (Şekil 2.2)



Şekil 2.2. Hücre dışındaki HMGB1'in etkisi. RAGE reseptörü üzerinden CDC 42 ve Rac etkinleşmesine neden olarak nörit gelişiminin düzenlenmesinde rol alır. TLR2 ve TLR4 reseptörleri üzerinden Myd88-MAPKinaz yolağını etkinleştirerek Nf- κ B' nin çekirdeğe tranlokasyonunu sağlar (Şekil türkçeye uyarlanmıştır, [128]).

2.2.2. HMGB1'in Merkezi Sinir Sistemindeki Rolü

Son on yılda HMGB1'in merkezi sinir sistemindeki rolü üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda HMGB1'in nöronal göç ve nörit gelişimini düzenlediği [135]; nörit büyümesini ve nöronların hayatta kalımını arttırdığı bildirilmiştir [136]. Farelerde i.s.v. HMGB1 uygulamasının TNF-a ve IL-1 üretimini artırıp, afazi, ateş gibi durumları tetiklediği gösterilmiştir [137].

Santral sinir sistemi patolojilerinden HMGB1 ile en sık ilişkilendirilen hastalık inmedir. İnme geçiren hastalarda HMGB1'in plazma düzeyinin kontrollere göre 10 kat yüksek olduğu saptanmıştır [138]. Kemirgenlerde bir inme modeli olan serebral damar oklüzyonundan sonra, 1 saat içinde nöronlar çekirdeklerindeki HMGB1'in sitoplazmaya geçtiği ve nöronların hızla HMGB1'den fakir hale geldiği görülmüştür [139]. Hücre kültüründe iskemi sonrası, HMGB1'in astrosit ve mikrogliaları etkinleştirerek, bu hücrelerde inflamasyonla ilişkili reaktif değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olduğu bildirilmiştir [115]. Rekombinan HMGB1'in i.s.v. enjeksiyonu ile enfarkt hacmi artarken, HMGB1'e karşı poliklonal veya monoklonal antikorlar kullanılarak veya HMGB1'e karşı ribonükleik asit (RNA) interferansı oluşturularak nöroproteksiyon sağlanabilmektedir [115, 140]. Epileptik nöbetler ile tetiklenen nöroinflamasyonda HMGB1'in rolü olduğu ve yeni bir tedavi hedefi olabileceği üzerinde durulmaktadır [141]. Nöbet aktivitesi sırasında hem astrositlerde hem de mikroglialarda HMGB1'in sitoplazmaya geçtiği; çevredeki nöronlarda ve aktive olmuş astrositlerde TLR4 ifadesinin arttığı görülmüştür [118]. Benzer patern temporal lob epilepsisi olan hastalardan alınan epileptik dokuda da gösterilmiştir [118]. HMGB1'in prokonvülzan bir uyarı sonrasında ilk olarak, hızlıca var olan, nöronal kaynaklardan salındığı, daha sonra glia hücrelerinde HMGB1 sentezinin zaman içinde artması ile ikinci bir HMGB1 dalgasının oluştuğu ve bu ikinci dalga IL1-b ile birlikte inflamasyonun devamını sağlayarak nöbetlerin tekrar etmesine neden olduğu düşünülmektedir [142].

Geçen yıllarda laboratuvarımızda yapılan bir çalışma ile migren ve HMGB1 ilişkisi ortaya konmuştur [11]. Bir auralı migren modeli olan kortikal yayılan depresyon (KYD) sonrası açılan Panx1 kanallarının nöronlarda kaspaz-1

aktivasyonuna neden olduğu ve bunun sonucunda nöronlardan hücre dışına HMGB1 ve IL-1b gibi sinyal moleküllerinin salınarak trigeminal sinirlerin uyarıldığı, bu yolla migren ağrısının tetiklendiği gösterilmiştir [11].

Nörolojik olguların dışında psikiyatrik patolojilerin de son yıllarda HMGB1 ile ilişkileri araştırılmaktadır. HMGB1'in otizm [143] ve anoreksia nervoza [144] ile ilişkisini araştıran çalışmalar yayımlanmış olsa da, literatürde en çok alkol kötüye kullanımı ile ilişkisi üzerinde durulmaktadır. Farelerde ve insanlarda etanol ile inflamatuvar yanıtın indüklendiği [145]; farelerde bu durumun etanol tüketimini arttırdığı [146] ve bağışıklık sistemi ile ilişkili bazı genleri silinmiş transjenik farelerin daha az etanol tükettiği bilinmektedir [146]. Etanol ile tetiklenen bağışıklık cevabına HMGB1'in aracılık ettiği üzerinde durulmaktadır. Etanole uzun süreli maruz kalmanın HMGB1'in asetilasyonunu uyararak nöronlardan salınımını arttırdığı gösterilmiştir [147]. Zhou ve Crew aynı zamanda etanolün astrosit ve nöronlarda NLRP3 ifadesini ve IL-1b düzeyini arttırdığını ortaya koymuş [148]; etanolün hücre kültüründe nöronlardan aktif HMGB1 salınımına neden olarak TLR4 üzerinden NLRP3 ve IL-1b etkinleşmesine neden olduğunu göstermiştir [145].

2015 yılında yayımlanan bir çalışmada ise HMGB1'in stresin bağışıklık sistemini etkinleştirmesine aracılık ettiği ortaya konmuştur [100]. Sıçanlarda tekrarlayan kuyruk şokunun hemen sonrasında veya 24 saat sonra hipokampusta HMGB1 protein düzeyinin arttığı ve mikrogliyalardan HMGB1'in disülfid formunun aktif olarak salınımında artış olduğu; hem disülfid HMGB1'in hem de stresin NLRP3 ifadesini arttırdığı gösterilmiştir.

HMGB1'in patolojik durumların yanısıra, fizyolojik etkileri de tanımlanmıştır. HMGB1'in endotel aktivasyonunu [149], nörit büyümesini ve nöronların hayatta kalımını arttırdığı bildirilmiştir [136]. HMGB1'in diyabetik farelerin iskemik arka bacaklarında kollateral kan akımını VEGF bağımlı bir mekanizma ile arttırdığı ve iskeminin indüklediği angiogenez için kritik bir önemi olduğu gösterilmiştir [150]. Kalpte iskemik alana HMGB1 enjekte edildiğinde RAGE üzerinden doku yenilenmesini desteklediği ve kardiyak performansta anlamlı bir iyileşme sağladığı ortaya konmuştur [151]. HMGB1'in kök hücre ve progenitör

hücre takviyesi ile doku rejenerasyonu ve yeniden yapılanmasında da rol oynadığı kabul edilmektedir [152]. İntraserebral kanamadan 14 gün sonra BDNF düzeyinde ve BrdU (+) hücre sayısında görülen artış, HMGB1 artışı engellendiğinde veya RAGE reseptörleri susturulduğunda görülmemekte ve nörolojik iyileşme daha yavaş olmaktadır [153]. HMGB1'in bu ikili davranışının hücre dışındaki konsantrasyonuna, bağlandığı reseptörlere ve o reseptörlere birlikte bağlandığı sitokin, fosfolipidlere, tek iplikli nükleik asitler gibi doku hasarında hücre dışında konsantrasyonları artan moleküllere bağlı olabileceği düşünülmektedir [117]. Öyle ki endotelial progenitör hücre kültüründe HMGB1'in düşük konsantrasyonlarının çoğalma yönünde etki yaptığı gösterilmişken [154], yüksek doz HMGB1'in doku hasarına yol açtığı bilinmektedir [155]. Hayakawa ve arkadaşları iskeminin erken döneminde inflamasyona bağlı hücre hasarını arttıran HMGB1'in geç dönemde dokunun yenilenmesinde rol aldığını öne sürmektedir [117]. Yukarıda da bahsedildiği gibi son dönemde yapılan çalışmalar HMGB1'in hücre çoğalması üzerindeki etkisini RAGE üzerinden VEGF ve BDNF gibi trofik faktörleri arttırarak gerçekleştirdiğine işaret etmektedir [153, 154]. Gözden kaçırılmaması gereken bir nokta geç dönemde pozitif etkilerinden bahsedilen HMGB1'in kaynağının reaktif astrositler olduğudur. Literatürde bazı kaynaklar hasar veya uyarıdan günler sonra astrositlerden HMGB1 salındığına işaret etmektedir [139], ancak erken dönemde astrositlerde HMGB1 indüksiyonu olduğunu bildiren çalışmalar da vardır [134, 156]. HMGB1 nöronlardan KYD, iskemi veya epileptik nöbet durumlardan ilk birkaç saat içinde salınmaktadır. Nöronlardan erken dönemde salınan HMGB1 inflamasyon ve doku hasarı ile ilişkilendirilmiş, ancak geç dönemdeki HMGB1 aktivitesine nöronların katkısı henüz gösterilmemiştir [11, 118, 157]. HMGB1'in hücresel kaynağı, ikili etkiye neden olan faktörlerden biri olabilir; ancak mikroçevrenin karmaşık doğası düşünüldüğünde daha ziyade HMGB1'in etkisi ile ilişkili faktörlerden biri olduğunu varsaymak daha uygun olacaktır.

2.3. Panneksin Kanalları

2.3.1. Panneksin Kanalları Hakkında Genel Bilgiler

Panneksinler oluklu bağlantı proteinleri olan konneksin ve inneksinlerle membran yerleşimi açısından belirgin benzerlik gösteren integral membran proteinleridir. İlk defa 2000 yılında Panchina ve arkadaşları tarafından memeli genomunda tespit edilen Panneksin kanal proteinleri ailesinin Panneksin 1 (Pax1, 426 amino asit, 48.2 kDa), Panneksin 2 (Pax2 667 amino asit, 73.5 kDa) ve Panneksin 3 (Pax 3, 392 amino asit, 44.9 kDa) olarak adlandırılmış üç üyesi vardır [158]. Panneksinler, omurgasızlarda bulunan oluklu bağlantı proteinleri inneksinler ile olan dizi homolojileri (%25-33 benzerlik) sayesinde keşfedilmiş ve omurgalıların oluklu bağlantı proteinleri olan konneksinler ile benzer görevlerde rol aldıkları ileri sürülmüştür [158]. Panneksinler ile konneksinler arasında herhangi bir dizi homolojisi bulunmadığı halde, panneksinler benzer membran topolojisi göstermektedir. Dört adet alfa-heliks transmembran bölge, iki adet hücre dışı ve bir adet hücre içi ilmek yapısı bulundurulur; amino (N) ve karboksil (C) terminalleri hücre membranının sitoplazma yüzeyinde bulunmaktadır [158]. İlk öne sürülenin aksine, panneksinlerin konneksinler gibi oluklu bağlantı oluşturmadaıkları, hücre yüzeyinde hücre dışı ve içi arasında molekül geçişine aracılık eden tek bir kanal oluşturdıkları düşünülmektedir [10].

Literatürde en çok üstünde durulmuş panneksin ailesi üyesi Pax1'dir. Pax1 geni 11q14.3 lokusunda yer alır, 5 ekzon ve 4 introndan oluşur ve en az iki alternatif eklenmiş mesajcı RNA'sı (mRNA) vardır [159]. Panneksin geninin çeşitli ürünlerin ifade edilmesine olanak tanıyan bu yapısı nedeniyle, literatürde Pax1 için bildirilmiş çeşitli işlevler, farklı hücresel yerleşimler ve hatta farklı moleküler ağırlıklar vardır. Pax1'in memelilerde pannekzon denilen 6 tane alt ünitelerden oluşan oligomerler oluşturarak hücre yüzeyinde tek başına işlev gören, geniş gözenekli ve seçiliği düşük tek bir kanal oluşturduğu gösterilmiştir [160]. Bu kanalın ATP'ye, ikincil mesajcılara, iyonlara, amino asitlere ve Propidyum İyodür (PI), Yo-Pro gibi boyalara geçirgen olduğu düşünülmektedir [160]. 2004 yılında Pax1'in ATP'ye

geçirgen bir kanal olduğu gösterildiğinden beri nöronlarda, astrositlerde, tat tomurcuklarında, T-hücrelerinde, eritrositlerde, hava yolu epitel hücrelerinde, endotel hücrelerinde, iskelet ve düz kas hücrelerinde ve hipofizer hücrelerde Panx1'in ATP salınımını sağlayan ana kanallardan biri olduğu bildirilmiştir [161]. Merkezi sinir sisteminde Panx1 serebellumda, serebral kortekste, olfaktor bulbusta, "*inferior olive*"de, substantia nigrada, talamusta, amigdalada, prefrontal korteksin 5. katmanında ve hipokampusta ifade edilmekte, embriyonik ve genç dokuda yüksek olan ifadesi erişkin dokusunda azalmaktadır [162]. Hücre düzeyinde Panx1 mikrogliyalarda, astrositlerde, piramidal hücrelerde, Purkinje hücrelerinde, dopaminerjik nöronlarda, kolinerjik motor nöronlarda ve ara nöronlarda tespit edilmiştir [163-166]. Panx1 genellikle sinaptik aralığın postsinaptik kısmında "postsinaptik dansite proteini 95" (PSD 95) ve glutamat reseptörleri ile birlikte bulunmakla beraber [163], özellikle talamustaki nöronların hücre gövdelerinde de bulunabildiği gösterilmiştir [167]. Panx1'in postsinaptik yerleşiminin işlevi tam olarak anlaşılamasa da LTP ve sinaptik plastiklikte rolü olabileceği one sürülmüştür [168].

Panneksinlerin ATP ve diğer büyük moleküllerin geçişine izin verdiği düşünüldüğünde, membran boyunca elektrokimyasal gradientin korunabilmesi için bu kanalların açılıp kapanmasının sıkı bir denetim altında olması gereklidir. Panx1 işlevinin denetimi kanalın plazma membranındaki aktivitesi üzerinden olabileceği gibi, kanalın membran trafiğini oluşturan birçok basamak üzerinden de olabilir. Diğer integral membran proteinleri gibi Panx1 de endoplazmik retikulumda (ER) sentezlenir, N-glikolizasyon sonrası golgiye gider, orada işlenerek klasik ER-golgi salınım yolağı olan COPII bağımlı Sar1 aracılı sekretuvar yolak ile hücre membranına taşınır. [169]. Panx1'in plazma membranına taşınması glikolizasyonu inhibe eden ilaçlarla belirgin derecede bozulmaktadır [160]. Panx1 membranda saatler veya günler süresince kalabilir, daha sonra yıkım için lizozomlara alınır [160].

Panx1 voltaja duyarlıdır ve negatif membran potansiyelinde kanalın açık olma ihtimalleri çok düşüktür [170]. Pozitif voltajlarda karakteristik, iletkenliği

yüksek kanal ortaya çıkar, ancak uyarılabilir hücreler dışında membran potansiyelinin 0 mV'un üstünde olması nadirdir. Panx1 aktivasyonuna neden olduğu düşünülen dört mekanizma vardır: Mekanik uyarı, hücre dışı potasyum konsantrasyonunda artış, C terminalinin kaspaz-3 veya kaspaz-7 tarafından proteolitik kesilmesi, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda artış. C terminalinin kaspazlar tarafından kesilmesi kanalın sürekli açık kalmasına neden olmaktadır ve bu durum apoptozla ilişkilendirilmiştir [171]. Konneksinlerden farklı olarak panneksinler hücre dışı kalsiyum konsantrasyonuna duyarlı değildir, ancak hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun mM düzeyine yükselmesi normal istirahat potansiyelinde bile kanalın açılmasına neden olmaktadır [168, 172, 173]. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu arttıran bir çok fizyolojik sürecin Panx1 aktivitesini etkilediği bilinmektedir [162]. G protein kenetli reseptörler olan purinerjik P2Y reseptörlerinin etkinleşmesi, fosfolipaz C bağımlı inozitol 1,4,5,-trifosfat (IP3) üretimi ile internal depolardan kalsiyum salınımına neden olarak ATP uyarımı sonrası Panx1 etkinleşmesine neden olur [172, 174]. Bir diğer purinerjik reseptör sınıfı olan P2X reseptörleri kanal proteinleridir ve etkinleştiklerinde hücre içine kalsiyum girişini arttırır. Bunun dışında P2X reseptörleri ve Panx1 arasında doğrudan bir ilişki olduğu, böylece kalsiyum konsantrasyonundaki lokal artışların Panx1 tarafından tespit edilebildiği; ATP uyarımı sonrası ilki P2X reseptörlerinden, ikincisi Panx1 kanallarından olmak üzere bifazik akım oluştuğu öne sürülmektedir [175, 176]. Panx1 aktivitesi negatif membran potansiyeli dışında, negatif geribildirim yolunu oluşturan hücre dışı yüksek ATP konsantrasyonu [177], karbondioksit aracılı sitoplazmik asidifikasyon [172], taklit edici peptitler [178] ve karbeneksolon (KARB), probenesid, fluefenamik asit gibi farmakolojik kanal engelleyiciler [179] tarafından da durdurulabilmektedir.

Panx1 aracılı ATP salınımının purinerjik reseptörlerle birlikte kalsiyum dalgalarının yayılmasında rolü olduğu [172]; salınan ATP ve UTP'nin apoptotik hücre temizlenmesinde "beni bul" sinyali görevi gördüğü [171], vasküler tonu düzenlediği [180], akciğerde mukosiliyer temizlikte [181] ve bağışıklık cevabında [175] rolü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca tümör oluşumu [182], iskemik hücre ölümü

[183], epileptik nöbet [184] patofizyolojisinde de etkileri olduğu ortaya konmuştur. Şimdiye kadar üretilen dört farklı *Panx1 knock-out* farelerin hepsi fertildir ve fenotiplerinde belirgin farklılıkları yoktur [162]. *Panx1*'lerin iddia edilen hayati görevleri ile örtüşmüyor gibi görünse de bu durumun *Panx1*'in yokluğunda gelişen telafi edici mekanizmaların devreye girmesi ile ilişkili olabileceği ya da bazı *knock-out* stratejilerinin *Panx1*'i tamamen ortadan kaldırmıyor olabileceği düşünülmektedir.

2.3.2. *Panx1*'in Merkezi Sinir Sistemindeki Rolü

Panx1'in merkezi sinir sisteminde belirli bir patoloji ile ilişkisi ilk defa beyin dilimlerinde ortaya konmuştur. Roger Thompson ve arkadaşları bir iskemi modeli olan oksijen/glukoz deprivasyonu sonrası, hipokampal nöronlarda görülen anoksik depolarizasyonun panneksin kanalı aktivitesi ile ilişkili olduğunu bildirmişler [183]; daha sonra panneksin kanal blokörleri, siRNA, *knock-out* fare kullanılarak yapılan deneylerde nöronal hasarın daha az olduğu ortaya konularak bu bulgu teyit edilmiştir [185-188]. NMDA reseptörlerinin, *Panx1* geçirgenliğini Src ailesi kinaz aracılığı ile düzenleyerek, anoksik depolarizasyonda rolü olabileceği düşünülmektedir [189].

Panx1'in NMDAR aracılı açılışının piramidal nöronların epileptiform aktivitelerini de arttırdığı gösterilmiştir [183]; *Panx1*'i silinmiş fareler ile yapılan çalışmalar, *in vivo* epileptik nöbetlerin şiddetine *Panx1*'in katkı sağladığını doğrulamaktadır [184].

Panx1 aktivitesi ile ilişkilendirilen bir başka patoloji de KYD'dir. Auralı migren ağrısının nedeni olarak kabul gören KYD dalgasının nöronal *Panx1* kanallarının geçici olarak açılmasına neden olduğu gösterilmiştir [11]. Bu çalışmada ayrıca KYD ile açılan *Panx1* kanallarının nöronlarda kaspaz-1'in etkinleşmesine neden olduğu ve bunu takiben nöronlardan hücre dışına HMGB1 ve IL-1b gibi bağışıklık sistemi araçlarının salındığı gösterilmiştir. Bu yolla trigeminal sinirlerin uyarılarak migren ağrısını tetiklediği öne sürülmüştür. *Panx1*'in farmakolojik (karbeneksolon, probenesid), protein taklidi (¹⁰*Panx*) ve genetik (*Panx1*-siRNA) ajanlar kullanılarak inhibisyonunun ise KYD ile tetiklenen migren ağrısını azalttığı ve migren tedavisinde bir tedavi hedefi olabileceği gösterilmiştir.

Panneksin kanalları ve inflamatuvar yanıt arasındaki ilişki ilk defa Pelegrin ve Suprenant tarafından 2006 yılında gösterilmiştir. LPS ile uyarılan makrofajlarda kaspaz-1'in etkinleşmesinde Panx1 kanallarının ve P2X7 reseptörlerinin rolü olduğu ortaya konulmuştur [175]. Daha sonra Silverman ve arkadaşları nöron ve astrosit kültüründe Panx1'in hücre dışı yüksek potasyum konsantrasyonu ile açıldığını, bunu takiben nöronal inflamazom yanıtının tetiklendiğini göstermiş; Panx1'in P2X7, kaspaz-1 ve inflamazom kompleksi proteinleri ile birlikte bulunduğunu tespit etmişlerdir [96]. Bu bulgulardan hareketle hücre dışı potasyum konsantrasyonunun artmasına neden olacak nöbet ve iskemi gibi durumlarda, açılan Panx1'den hücre dışına çıkan ATP'nin P2X7 reseptörlerini etkinleştirilmesi sonucu kaspaz-1'in etkinleşerek aktif IL-1b salınımına neden olduğu öne sürülmektedir [10].

Panx1'in patolojik durumlar dışında fizyolojik durumlarda da rol aldığı düşünülmektedir. Panneksin kanallarının doku yenilenmesinde ve yara iyileşmesinde rol oynadığı; progenitör hücre göçü, hücre çoğalması ve farklılaşmasına katkı sağladığı bilinmektedir [190]. Panx1'in sinaptik plastiklikte rolü olduğu ve öğrenme için Panx1 aktivitesinin gerekli olduğu öne sürülmektedir [168]. Panx1'in yokluğunda uyarılabilirliğin arttığı görülmüş, güçlü ve sürekli LTP yanıtları elde edilmiştir. Anksiyete benzeri davranışların arttığı; uzaysal öğrenmenin ve nesne tanımanın bozulduğu gösterilmiştir. Prochnow ve arkadaşları bu durumu açıklamak için, Panx1'in presinaptik A1 reseptörleri üzerinden geri bildirim vererek glutamat salınımını inhibe ettiğini ve yokluğunda ortaya çıkan aşırı uyarım sonucu LTP'nin doyma noktasına geldiğini öne sürmüşlerdir. Diğer bir çalışmada erişkin farelerde Panx1 kanalları engellendiğinde veya Panx1'in yokluğunda hipokampal beyin dilimlerinde uzun süreli depresyondan uzun süreli potansiyel artışına bir kayma olduğu ortaya konmuş ve Panx1'in eksitatuvar sinaptik plastiklik eşiğini düzenlediği öne sürülmüştür [191]. Yazarlar Vroman ve arkadaşlarının son dönemde yayımladıkları bir çalışmadan hareketle Panx1 kanallarından salınan ATP'nin, ekto-ATPazlar tarafından inozin, fosfat ve proton iyonlarına yıkılarak sinaptik aralığı asidik hale getirdiğini, pH'daki bu değişimin sinaptik terminaldeki voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını inhibe etmesi sonucu glutamat salınımının azaldığını, ayrıca

düşük pH'nın NMDA reseptörlerinin açılmasını zorlaştırdığını bu nedenlerle Panx1'in yokluğunda ortaya çıkan alkalizasyonun sinaptik kuvveti arttıracaklarını öne sürmüşlerdir [192].

Panneksin kanalları hücrenin mikroçevresindeki değişiklikleri algılamasını sağlayarak, çevresel streslere proaktif cevaplar vermesine olanak tanımaktadır [190]. Birçok dokuda ifade edilen panneksin kanallarının çok çeşitli işlevleri, onları kanser, bağışıklık sistemi hastalıkları gibi bir çok rahatsızlık için potansiyel tedavi hedefi yapmaktadır. Yara iyileşmesinde ve doku yenilenmesinde hücre göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemek amacı ile hedeflenebileceği öne sürülmektedir [190]. Ancak hücre ölümüne sebep veren proinflamatuvar moleküllerin salınımı ve doku yenilenmesi arasındaki ince denge üzerinde literatür henüz yeterli bilgi yoktur.

Nöbetlerin ve EKT'nin hücre dışı ATP miktarını arttırdığı bilinmektedir [12]. Yukarıdaki bilgiler ışığında EKN ile hücre dışında artan ATP ve potasyum konsantrasyonu sonucu Panx1'in açılarak inflamazomun etkinleştiği, bu yolla nöronlardan IL-1b ve HMGB1 gibi sitokinlerin salındığı ve kontrollü ve kısa süreli bir uyarım sonucu doğan bu sitokin cevabının nörotrofik faktörlerin sentezini, hücre çoğalmasını ve sinaptogenezi sağlayacak mekanizmaları başlattığı hipotezinin öne sürülebileceği düşünülmüştür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi, Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü, Beyin Araştırmaları Laboratuvarında yapılmıştır ve deneysel işlemler Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 15.11.2013 tarihinde 52338575-130 sayılı belge ile onaylanmıştır.

Deneyler için optimizasyon amacı ile 24 adet Sprague Dawley (250-300 g) erkek sıçan ve 51 adet Swiss albino (25-35 g) erkek fare ve deneyler için 75 adet Swiss albino erkek fare kullanılmıştır. Fareler 18-21°C oda sıcaklığında, 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda, serbest yiyecek ve suyun sağlandığı kafeslerde muhafaza edilmiştir. Serebral ventriküllere kanül yerleştirilen deneylerde fareler 2-3.5 litre/dk izofloran anestezisi ile uyutulmuşlar; deney süresince 2 litre/dk oksijen desteği ile kendi solunumlarına bırakılarak izlenmiş; rektal sıcaklık takip edilerek homeotermik battaniye kontrol ünitesi (Harvard Apparatus Limited, İngiltere) ile vücut ısısı $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ arasında tutulmuştur. Deney süresince noninvazif olarak alt ekstremiteden nabız ve doku oksijen saturasyonu (V3304 Digital Table-Top Pulse Oximeter, SurgiVet, Amerika Birleşik Devletleri) takipleri yapılmıştır.

3.2. Elektrokonvulzif Nöbet (EKN) Uygulaması

Elektrik uyarısını vermek için PowerLab (8/30, ADInstruments) veri kazanım ve analiz sistemi tarafından kontrol edilen bir uyarıcı (World Precision Instruments, Stimulus Isolator, Model A385) kullanılmıştır. Fareler uyarı öncesinde 2 dakika boyunca oksijen tankında 2 litre/dk oksijen almıştır. Uyarıyı takibeden ilk 5 dakikada ilave oksijenasyonun devamı sağlanmıştır. Uyarıdan önce kornealara iki taraflı uyarı veren elektrotlar serum fizyolojik ile ıslatılmıştır. İntraserebroventriküler (i.s.v.) kanül takılan fareler enselerinden tutularak tespit edilmiş ve gözlerinin uygulayıcının elektrotları ile tam temas etmesi sağlandıktan sonra uyarı verilmiştir. Kornealara yerleştirilen elektrotlardan ilk etapta 40 miliamper şiddetinde, 60 adet, 1.6 saniye aralıklı, 15 milisaniyelik uyarı verilmiş, eğer nöbetin etkin geçmediği düşünülürse

uyarının frekansı ve akımın şiddeti artırılarak en fazla iki uyarı daha verilmiştir. Uyarının sonunda farelerin tonik klonik nöbet geçirmesi beklenmiş, arka ekstremiteleri 5 saniyeden uzun süre tonik ekstansiyonda kalmış farelerin nöbetleri etkin kabul edilmiştir.

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Propidyum İyodür (PI, 668.4 kDa, maksimum eksitasyon: 535, maksimum emisyon: 617) nükleik asitlere bağlandığında güçlü emisyon veren floresan bir moleküldür. Bu özelliği ile DNA için floresan bir işaretleyici olan PI'nın hücre membranından geçememesi, onun nekrotik, apoptotik ve normal hücrelerin ayırımında kullanılmasını sağlamaktadır. [193]. Bunun yanı sıra PI'nın canlı hücrelere panneksin ve konneksin kanalları gibi geniş gözenekli seçiciliği düşük kanallardan da girdiği bilinmektedir; PI bu kanalların aktivitesinin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır [11, 181]. Bizim çalışmamızda da Panx1 kanallarının EKN'den sonra açılıp açılmadığını değerlendirmek amacı ile kullanılmıştır.

Karbeneksolon (KARB, Sigma, ABD) seçici olmayan bir panneksin kanal blokörüdür. Kan beyin bariyerini geçmez. Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada i.s.v. enjeksiyonunun nöronlara PI girişini baskıladığı saptanmıştır [11].

3.4. Serebral Ventrikül İçine Enjeksiyonlar

3.4.1. Sıçanlarda Yapılan Ventrikül İçi Enjeksiyonlar

Sprague Dawley sıçanlar (n=3) izofloran indüksiyonu sonrası 30 mg/kg thiyopental anestezisi ile uyutulmuş, anestezisi derinlikleri kuyruk sıkıştırılmasına verdikleri yanıtla değerlendirilmiştir. Derin anestezide olduğu teyit edilen sıçanlar stereotaksi çerçevesine (Digital Lab Standard Stereotaxic Frame, Stoelting, Amerika Birleşik Devletleri) yerleştirilmiştir. Stereomikroskop (Zeiss, SV6) altında bregma ve sağ parietal, frontal kemikler görülecek şekilde cilt kesisi yapılmış ve parietal kemik üzerinde isv enjeksiyona olanak tanıyacak bir pencere yüksek hızlı matkap ve forseps yardımı ile açılmıştır. Bregmanın +1.1 mediolateral (ML), -0.92

anteroposterior (AP), -3.5 dorsoventraline (DV) 26 G Hamilton iğnesi ile i.s.v. PI (1.5 ul, 1mg/ml distile su) enjeksiyonu yapılmıştır. İlerleyen deneylerde isv enjeksiyonun yarattığı travmanın PI tutulumu üzerine gözlemlemiş olduğumuz etkilerini azaltmak için, sıçanlara (n=6) 3 mm'lik bir kanül (Polietilen tüp, PE 20) 26 G Hamilton iğnesi yardımı ile i.s.v. olarak yerleştirilmiştir (ML: +1.1 AP: - 0.92, DV: -3.5).

342. Farelerde Yapılan Ventrikül İçi Enjeksiyonlar

Fareler (n=4) intraperitoneal (i.p.) ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) anestezisi ile uyutulmuş, anestezide derinlikleri kuyruk sıkıştırılmasına verdikleri yanıtla değerlendirilmiştir. Derin anestezide olduğu teyit edilen fareler stereotaksi çerçevesine yerleştirilmiştir. Stereomikroskop altında bregma ve sağ parietal, frontal kemikler görülecek şekilde cilt kesisi yapılmış, serebral ventrikül içine kanül yerleştirmek üzere yaklaşık 0.25 mm çapında bir alanda yüksek hızlı matkap ve forseps yardımı ile pencere oluşturulmuş ve uzunluğu 2.2 cm olan bir kanül (Polietilen tüp, PE 20) 2 mm'si kranium içinde olacak şekilde 26 G Hamilton iğnesi yardımı ile yerleştirilmiştir (ML: +0.8, AP: -0.1 ve DV: -3.1).

Anestezide altındaki farelerde nöbetlerin etkinliği değerlendirilemediği için farelerde stereotaksi çerçevesine ihtiyaç duymayan bir ventrikül içi enjeksiyon düzeneği oluşturulmuştur. Yumuşak ve esnek bir yapıya sahip olmaları nedeni ile, PE tüpten yapılan kanüller ile doğru koordinatlara i.s.v. enjeksiyon yapmak için fareleri stereotaksi çerçevesine yerleştirmek gerektiğinden bu sorunu aşmak için 24 G intraket iğneleri 1.2 cm uzunluğunda kesilerek metal kanüller elde edilmiştir. Bu kanüller 26 gauge bir Hamilton iğnesi ile izofloran anestezisi altındaki farelerin (EKN n=7, yalancı uygulama n=7) lateral ventrikülüne yerleştirilmiştir. Kanülün yerinden oynamaması için kanül dental akrilik kullanılarak kraniuma sabitlenmiştir. Fareler uyanırken i.s.v. enjeksiyon yapabilmek için 30 cm uzunluğundaki PE 10 tüpün bir ucuna 22 G iğne ucu, diğer ucuna sisteme hava girmemesine özen gösterilerek bir Hamilton iğnesi takılmıştır. Fare ensesinden tutularak sabitlenmiş, iğne kanüle yerleştirildikten sonra ikinci bir araştırmacı istenilen miktarı yavaşça

enjekte etmiş, enjeksiyon sonrası bir dakika boyunca kanülün içinden çıkartılmamıştır.

3.5. Sisterna Magnadan Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) Toplanması

EKT (n=4) ve yalancı uygulamalardan (n=4) bir saat sonra ketamin (100mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) anestezisi altında uyutulan fareler stereotaksi çeçevesine kafası vücudu ile 135°C açı yapacak şekilde yerleştirilmiş, farenin boynuna yapılan kesi sonrasında subkütan doku ve kaslar ayrılmıştır. Sisterna magnanın üzerindeki dura tabakası tespit edilerek dorsal spinal arterin lateralinden ucu inceltilmiş kapiller bir cam tüp yardımı ile sisterna magnaya girilmiştir. Basınç farkı nedeni ile tüpe dolan BOS, 3 ml iğneye bağlı PE tüp yardımı ile ependorflara alınarak -80 °C 'de saklanmıştır. Toplanan BOS örneği berrak olmadığında kan ile kontaminasyonu düşünülerek o örnekler çalışmaya dahil edilmemiştir. Western blotlama öncesinde yalancı uygulama ve EKN grupları kendi içlerinde toplanarak havuz oluşturulmuş ve 3 ul örnek tampon ve 1.2 ul merkaptotanol ile karıştırılmış, 90°C'de 10 dakika boyunca ısıtılmıştır. Örnekler %4-12 SDS-PAGE jellere yüklenmiş, 100 voltta 2 saat yürütülerek proteinlerin ayrılmaları sağlanmıştır. Örnekler yarı-kuru transfer sistemi ile PVDF membranlara aktarılmıştır (120 mA, 3 saat).

3.6. İmmunohistokimyasal Boyama

EKN sonrasında HMGB1'nin çekirdekten sitoplazmaya ve oradan da hücre dışına yer değiştirdiği hipotezini test etmek için iki grup fareye (n=3/grup) EKN veya yalancı uygulama yapılmış, fareler bir saat sonra yüksek doz i.p. kloral hidrat enjeksiyonu altında %0.9'luk serum fizyolojik içinde %0.4 heparin ve %4 paraformaldehit ile perfüze edilmiş, çıkarılan beyinler 24 saat boyunca %4'lük paraformaldehit ve ardından 48 saat boyunca %30'luk süktrozda bekletilmiştir. Beyinlerden kriyomikrotomda (Leica CM 1100) 20 um'lik koronal kesitler alınmıştır. Kesitler önce fosfat tamponlu salinle (PBS, pH=7.4), oda sıcaklığında üçer defa 5 dakika yıkanmış, ardından PBS ile %10 sulandırılmış normal keçi serumunda oda sıcaklığında 30 dakika bloke edilmiştir. Ardından kesitler tavşan

poliklonal HMGB1 (1:100, Abcam, İngiltere) primer antikoru ile bir gece +4°C’de muamele edilmiştir. Ertesi gün üçer defa 5 dakika boyunca PBS’le yıkanan kesitler, keçi anti-tavşan Cy2 antikoru (1:200, Jackson ImmunoResearch, ABD) ile oda sıcaklığında, 90 dakika inkübe edilerek sekonder işaretleme yapılmıştır. Son 3x5 PBS yıkaması ardından floresan bir çekirdek işaretleme ajanı olan Hoechst-33258 ile kapatılmıştır. Bregmaya göre +1.70 ile -1.94 arasındaki kesitlerden beşer kesit floresan mikroskop (Nikon Eclipse E600) altında değerlendirilmiş, HMGB1 ve Hoechst boyamaları için uygun filtreler (Hoechst için eksitasyon 330-380 nm, emisyon 420 nm; Cy2 antikoru için eksitasyon 489 nm, emisyon 506 nm) kullanılarak prelimbik, infralimbik, anterior singulat, retrosplenial korteksler ve hipokampustan her kesitte beşer görüntü alınması hedeflenmiştir. Alınan görüntülerde Hoechst ve HMGB1 pozitif hücreler NIS Elements 3.2 (Nikon, Japonya) programı yardımı ile sayılmıştır. HMGB1 pozitif hücre yoğunluğu milimetrekare cinsinden hesaplanmış, EKN ve yalancı uygulama grupları birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

3.7. Western Blotlama

Tek EKN sonrası prefrontal korteks ve hipokampusta HMGB1 ve BDNF düzeylerinin zamana bağlı değişiminin incelenmesi amacı ile yalancı uygulama (n=6) ve EKN (n=22) gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar EKN sonrası 1., 2., 4. ve 6. saatlerde, yalancı uygulama sonrası 2. saatte sakrifiye edilmiş ve beyinleri hızlıca çıkartılmıştır. PFK ve hipokampusları hızla ayrılmış, izopentanda hızla dondurularak western blotlamada kullanılmak üzere -80°C’de saklanmıştır.

Hipokampus ve PFK örnekleri %2 Proteaz inhibitör (Sigma, Almanya) kokteyli içeren RIPA tamponu eklendikten sonra sonikatör ile homojenize edilmiştir. Sonikasyon işlemi esnasında örneklerin ısınmasını ve bu yolla meydana gelebilecek protein kaybını önlemek amacıyla tüm işlem buz içinde ve kısa döngülerle tamamlanmıştır. Elde edilen homojenizatlar 15 dakika boyunca 14000 rpm ve +4°C’de santrifüj edilmiş ve süpernatantları ayrılarak protein miktar tayininde kullanılmıştır. Elde edilen örneklerde bulunan total protein miktarları BCA Protein assay (Pierce-

Thermoscientific, ABD) kullanılarak spektrofotometrik ölçüm yöntemiyle belirlenmiştir.

Western blotlamada SDS-PAGE jel sistemi kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda yapılan yüklemelerden elde edilen sonuçların ışığında BDNF proteininin artış ve azalış profillerinin çıkarılmasında yüklenmesi en uygun total protein miktarının 50 ug/ul olduğu tespit edilmiştir. Homojenatlar 10-12 kuyucuklu % 4-12 Bis-Tris SDS jellere (Novex, Invitrogen, ABD) yüklenmiştir. Örnekler jele yüklendikten sonra 100V'ta 2-2,5 saat yürütülerek moleküler ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlanmış; proteinlerin PVDF membrana transferi yarı-kuru (semi dry) transfer sistemiyle (80 mA/membran, 4 saat) gerçekleştirilmiştir.

Membranlar blokaj öncesi üç defa 10'ar dakika süresince Tris Buffer Saline-Tween 20 (TBS-T Tween 20 % 0,2 Sigma) içinde 70 rpm'de sallanarak yıkanmış ardından membranların blokajı %5'lik süt tozu (TBS-T içinde) ile 1 saat 70 rpm'de sallanarak gerçekleştirilmiştir. Primer antikor (anti-BDNF, 1/1000, Abcam, İngiltere; anti HMGB1, 1/1000, Abcam, İngiltere) blokaj solüsyonu içerisinde gece boyu +4°C'de 70 rpm'de sallanarak inkübe edilmiş, ertesi gün sekonder antikorda (anti-rabbit IgG-HRP, 1:5000, Cell Signalling, ABD) oda sıcaklığında 1,5 saat bekletilmiştir. Yükleme kontrolleri Anti-β-aktin antikoru kullanılmış, membranlar blokaj sonrasında Anti-β-aktin (1:7500, Sigma, Almanya) antikoru ile +4°C'de 1,5 saat 70 rpm'de sallanarak inkübe edilmiştir. Yıkamalardan sonra (3x10 dk TBST-T) 30 dakika oda sıcaklığında sekonder antikor (anti-mouse, IgG-HRP, Cell Signalling, 1:7500) solüsyonu ile 70 rpm'de sallanarak muamele edilmiştir.

Membranlar diğer antikorlarla yeniden işaretlenmeden (*reprobing*) önce soyma tamponu (*medium stripping buffer*) (15 g glycine, 1 g SDS, 10 mL Tween 20; 1000 mL, pH:2.2) ile inkübe edilmiş (2x5dakika) , sonrasında iki defa 10'ar dakika PBS ile ve iki defa 5'er dakika TBS-T ile yıkanmıştır. Membranlar Kodak 4000 MM Görüntüleme İstasyonunda görüntülenmiştir. Protein bantları kemilüminesan (Super Signal West-Femto; Pierce, ABD) kullanılarak görünür hale getirilmiştir. Image J (NIH, ABD) ile protein bantlarının optik dansiteleri ölçülmüş, HMGB1 ve BDNF bantları β-aktin ile normalize edilmiştir. Anti-BDNF antikoru ile muamale edilmiş

membranların analizinde 49kDa'ya denk gelen bantlar ölçülmüştür. Eğer üstteki ve alttaki bant birbirlerinden ayırt edilemiyorsa iki bant birlikte ölçülmüştür.

3.8. Davranış Deneyleri

3.8.1. Kuyruktan Asma Testi (KAT)

Kuyruğundan asılan fare başlangıçta bu durumdan kurtulmaya çalışır, fakat birkaç dakika sonra hareketsiz hale gelir. Kuyruktan asma testi ile hayvanın havada hareketsiz kalma süresi ölçülerek davranışsal umutsuzluğun değerlendirilmesi amaçlanmaktadır [194, 195]. Bu test uygulama kolaylığı nedeni ile ilaç geliştirme çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır.

Tek EKN sonrası antidepresan benzeri davranışın gösterilebilmesi için 9 adet fareye EKN, 9 adet fareye yalancı uygulama yapıldıktan bir gün sonra kuyruktan asma testi gerçekleştirilmiştir. Literatürde olduğu gibi fareler teker teker bir bant ile kuyruklarından 6 dakika boyunca asılı bırakılmış, test boyunca hareketsiz kaldıkları süre kronometre kullanılarak hesaplanmıştır [196].

3.8.2 Sükroz Tercih Testi (STT)

Sükroz tercih testi ile anhedoni ile ilişkili olabilecek davranışın değerlendirildiği iddia edilmektedir. Her farenin kafesinde biri %1 sükroz solüsyonu diğeri musluk suyu içeren iki suluk bulunur. Sağ-sol tercihinin ortadan kaldırılabilmesi için iki gün yapılan bu testte, ikinci gün sulukların yerleri birbirleriyle değiştirilir. Sükroz tüketimlerinin toplam sıvı tüketimlerine oranı hesaplanarak farelerin sükroz solüsyonunu ne kadar tercih ettiği saptanır ve anhedoni benzeri durumlarda sükroz solüsyonunun daha az tercih edildiği öne sürülür [197, 198].

Çalışmamızda 10 adet fare her birinde iki adet suluk olan ayrı kafeslere yerleştirilmiştir. İlk gün bütün suluklarda %1 sükroz solüsyonu bulunmaktadır. İkinci gün aynı kafesteki suluklardan birinde musluk suyu, diğerinde sükroz solüsyonu yer almaktadır. Üçüncü gün bu sulukların yerleri birbirleriyle değiştirilmiştir. Dördüncü

gün farelere EKN uygulanmıştır. Beşinci ve 6. gün sırayla suluklar kafesin iki tarafından da yerleştirilmiştir. Beşinci ve 6. günlerdeki sükröz tüketimi ile 2. ve 3. günlerdeki sükröz tüketimi bibiriyle karşılaştırılmıştır (Şekil 4.5).

3.9. İstatistiksel Yöntemler

Sonuçlar medyan ve $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. HMGB1 (+) hücre sayısı ve kuyruktan asma testi ölçümleri için gruplar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Western blotlama ölçümleri Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilmiş, istatistiksel anlamlılık varsa Mann-Whitney U testi yapılmıştır. Sükröz tercih testi sonuçları Wilcoxon testi ile değerlendirilmiştir. $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.10. Yöntemsel Optimizasyon Deneyleri

3.10.1. EKN Optimizasyonu

Başlangıçta sıçanlarda üretan (n=10) anestezisi altında farklı parametreler kullanılarak transkorneal elektrik uyarısı verilmiştir. Elektroensefalografik nöbetin frontal kemik üzerine yerleştirilen pelet elektrotlarla takip edilmesi planlanmış ancak nöbet aktivitesi gözlenememiştir. İnsanlarda EKT esnasında kullanılan bir anestetik olan tiyopental (n=7) izofloran indüksiyonu sonrası i.p. enjekte edilmiş ancak jeneralize tonik klonik nöbet görülmemiş, sadece ön ekstremitelerde klonik kasılmalar izlenmiştir. Literatürde anestezi altında EKN tetiklenebildiğini bildiren çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Bu durum ve bulgularımız nedeniyle elektrik uyarısının sıçanlar uyanık durumda iken verilmesine karar verilmiştir.

İzofloran anestezisi altında sterotaksi çerçevesine yerleştirilmiş sıçanlara (n=7) i.s.v. PI enjeksiyonu yapılmıştır. Anesteziden uyanan sıçanlar enselerinden tutularak hareketleri kısıtlanmış ve transkorneal elektrik uyarısı verilmiştir. Sıçanların üçünde tonik-klonik nöbet görülürken, diğer üç sıçanda sadece tonik, bir sıçanda sadece klonik nöbet görülmüştür. Sıçanların jeneralize tonik klonik nöbet geçirmemesi sıçanların elektrik uyarısı öncesi etkin kısıtlanmadığı ve sıçanlara

yeterli elektrik uyarısının verilemediğini düşündürmüştür. Transkorneal uyarı esnasında sıçanları tespit etmekteki zorluk nedeni ile deney protokolü tekrar gözden geçirilmiş; farelerin kısıtlanmasının görece daha kolay olması ve farelerde i.s.v. PI enjeksiyonunun laboratuvarımızda oturtulmuş bir yöntem olması nedeni ile çalışmaya fare kullanılarak devam edilmesine karar verilmiştir..

Swiss Albino farelere (n=7, erkek) izofloran anestezisi altında Hamilton iğnesi ile PI enjeksiyonu yapılmış ve fare anesteziden çıkar çıkmaz (n=2) veya 15 dakika (n=5) sonra transkorneal elektrik uyarısı verilmiştir. Anestezinin hemen ardından uyarının verildiği iki farede sadece klonik nöbet görülmüş, anesteziden 15 dakika sonra uyarının verildiği hayvanların sadece %40'nının (n=2) tonik klonik nöbet geçirdiğinin görülmesi üzerine, jeneralize tonik-klonik nöbet oluşturmadaki problemin bir sebebi olarak, izofloran anestezisinin nöbet üzerindeki olası baskılayıcı etkisinin elektrik uyarısını verdiğimiz anda devam ediyor olabileceği düşünülmüştür. Bu ihtimali test etmek için iki fareye anesteziden 20 ve 30 dakika sonra uyarı verilmiş ve jeneralize tonik klonik nöbet izlenmiştir. Ancak daha önce laboratuvarımızda yapılmış çalışmalar nöronal PI tutulumunun enjeksiyon sonrası 5. dakikadan itibaren azaldığını göstermiştir. Bütün bu bulgular ışığında i.s.v. enjeksiyonun fareler uyanık durumda iken yapılarak uyarı öncesi farelerin anestetik maddeye maruz kalmasının engellenmesine karar verilmiştir.

3.102 Ventrikül İçi Enjeksiyonların Optimizasyonu

a) İ.s.v. Enjeksiyonlar

EKN sonrası beyinde PI tutulumunun incelenmesi amacı ile Sprague Dawley sıçanlara (n=3, erkek) i.s.v. PI enjeksiyonu yapılmış ve 5 dakika sonra transkorneal yolla elektrik uyarısı verilmiştir. Enjeksiyonu başarılı olan sıçanların (n=2) ikisinin beyinde yaygın PI tutulumu görülmüştür. Ancak bu bulgunun enjeksiyonun yarattığı travma ile ilişkili olabileceği düşünülmüş, bu etkiyi azaltabilmek için sıçanlara enjeksiyonların bir gün önce yerleştirilen kanüller aracılığı ile yapılmasına karar verilmiştir.

b) Kanül Aracılığı ile Gerçekleştirilen Enjeksiyonlar

Bir gün önce ventriküllerine kanül yerleştirilmiş sıçanlar (n=6, erkek) i.s.v. PI enjeksiyonu sonrası anesteziden uyandırılmış ve transkorneal elektrik uyarısı verilmiştir. Sıçanların sadece yarısında (n=3) jeneralize tonik klonik nöbet tetiklenebilmiş ve sadece üçte birinde (n=2) PI enjeksiyonunun başarılı olduğu görülmüştür. “EKN Optimizasyonu” başlığı altında belirtildiği gibi sıçanları elektrik uyarısı esnasında tespit etmenin gücü bizi deneylere fare kullanarak devam etmeye yöneltmiştir.

Bir önceki gün i.s.v. kanül yerleştirilen farelerde, fareler uyanırken gerçekleştirilen deneylerde önce distile su (ds, 2ul) veya seçici olmayan bir Panx1 blokörü olan KARB (2ul ds /400ng) enjekte edilmiş, 10 dakika sonra gerçekleştirilen PI enjeksiyonu sonrası ikinci dakikada elektrik uyarısı verilmiş veya yalancı uygulama (Y.U) yapılmıştır. EKN (n=7,erkek), KARB (n= 7) ve yalancı uygulama (n=4, erkek) grupları arasında beyin kesitleri incelendiğinde PI pozitif hücre yoğunluğu açısından bir fark gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra 18 hayvana yapılan PI enjeksiyonlarından 7’sinin başarısız olması kanülün her zaman lateral ventriküle yerleşmiyor olabileceğini akla getirmiştir. Bu nedenle bir grup fare (n=3) kanül yerleştirildikten hemen sonra i.s.v. boya enjeksiyonu sonrası sakrifiye edilmiş ve kanüllerin hepsinin yerinde olduğu makroskopik olarak teyit edilmiştir.

Yalancı uygulama ve EKN arasında PI tutulumu açısından fark gözlenmemesinin farelere takılan kanül ve enjeksiyon sisteminin enjeksiyon esnasındaki olası hareketi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Hareketi engellemek için iki grup fareye (EKN=3, yalancı uygulama=2) izofloran altında PI enjeksiyonu yapılmış ve anesteziden uyandıktan 15 dakika sonra uyarı verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde yalancı uygulama grubundaki PI tutulumunun sağlıklı bir analizi mümkün kılmayacak ölçüde yüksek olduğu düşünülmüştür. Bu durumun olası başka bir nedeni olarak kanül çevresindeki hasar öne sürülmüştür. Kanül takıldıktan bir gün sonra hasarın hala devam edebileceği düşünülerek, EKN’nin kanül takıldıktan 3-4 gün sonra tetiklenmesi denenmiştir (EKN n=2, yalancı

uygulama n=2). Gruplar arası farkın kısmen belirginleştiği düşünülerek deneylerin kanül takıldıktan 3-4 gün sonra gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Uygulama esnasında kanül üzerindeki olası mekanik etkileri en aza indirmek amacı ile kanülün kraniuma sabitlenmesini hedefleyen aşağıdaki optimizasyon deneyleri yapılmıştır:

1. Kanülle kranium arasına sünger yerleştirme,
2. Kanül çevresini japon yapıştırıcısı sonrası dental akrilik ile çevreleme,
3. Dental akriliği cilt altına yerleştirme,
4. Dental akriliğin daha sıkı yapışması için kranium üzerinde engebeli alanlar yaratma

Sonuçta kanülün önce japon yapıştırıcı ile sabitlenip, çevresinin dental akrilik ile kaplanması ve dental akriliğin cilt altına yerleştirilmesine karar verilmiştir.

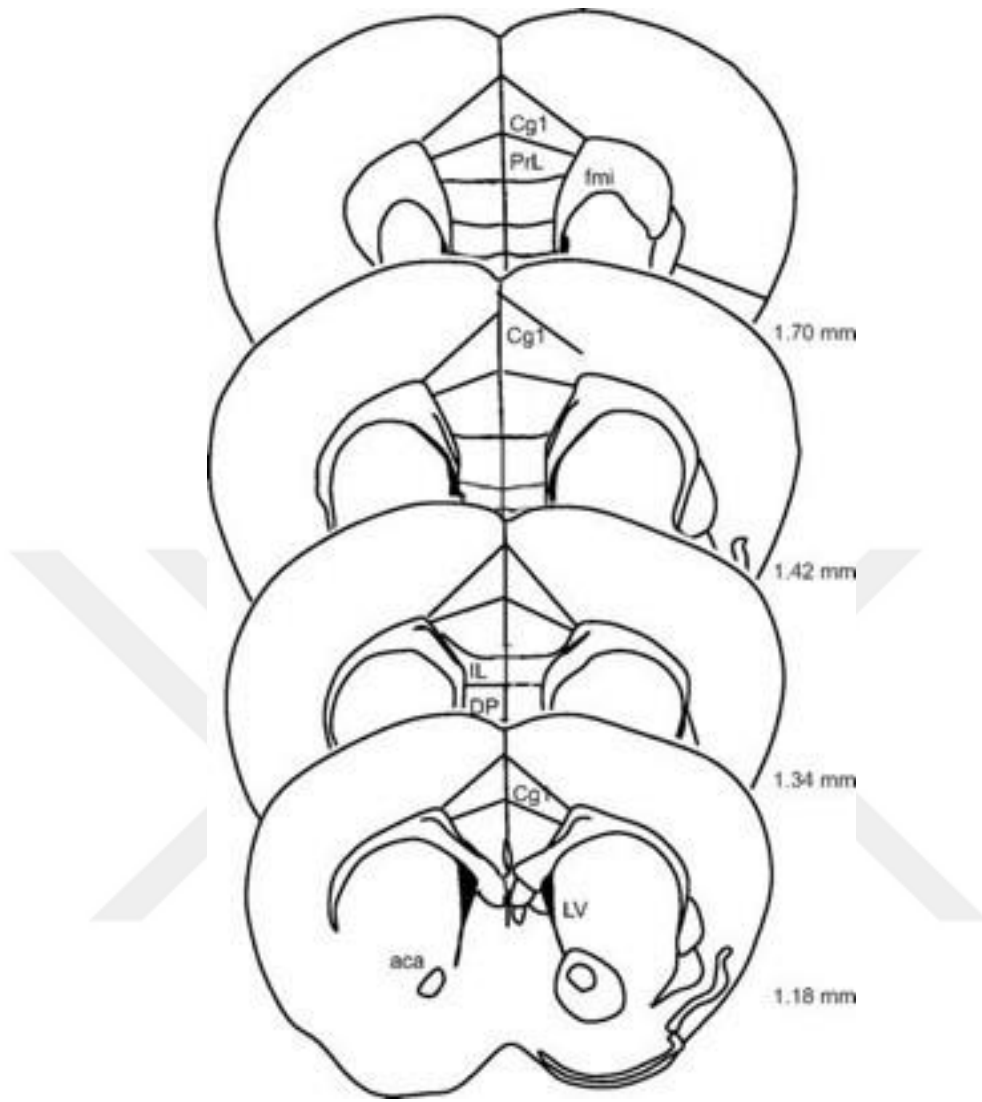
Ancak yapılan EKN (n=7), KARB (n=7) ve yalancı uygulama (n=7) deneyleri sonucunda üç grup arasında PI tutulumu açısından anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Yalancı uygulama beyinlerinde görülen EKN benzeri PI tutulumu bize EKN, kanül yerleştirme ve isv enjeksiyonun PI tutulumu üzerindeki etkilerinin bu düzenek altında ayırt edilemeyeceğini düşündürmüş ve çalışmada i.s.v. PI enjeksiyonu gerektiren basamaklara son verilmiştir.

3.10.3 Hücre içi HMGB1'in Tespitinin Optimizasyonu

Tek EKN sonrası HMGB1'in çekirdekten sitoplazmaya yer değiştirip değiştirmediğini tespit edebilmek için kanül takılmış swiss albino erkek bir grup fareye EKN'den 10 dakika önce i.s.v. distile su enjeksiyonu (n=2), bir diğer grup fareye isv KARB enjeksiyonu (n=3) yapılmış ve bir saat sonra sakrifiye edilmiştir. 3 fareye ise distile su enjeksiyonundan 10 dakika sonra yalancı uygulama yapılmış, fareler bir saat sonra sakrifiye edilmiştir. İncelenen EKN kesitlerinde yaygın olarak HMGB1 pozitif hücre yoğunluğunun azaldığı ancak KARB ve yalancı uygulama gruplarında da HMGB1'in çekirdekten sitoplazmaya ve hücre dışına yer değiştirdiği görülmüştür.

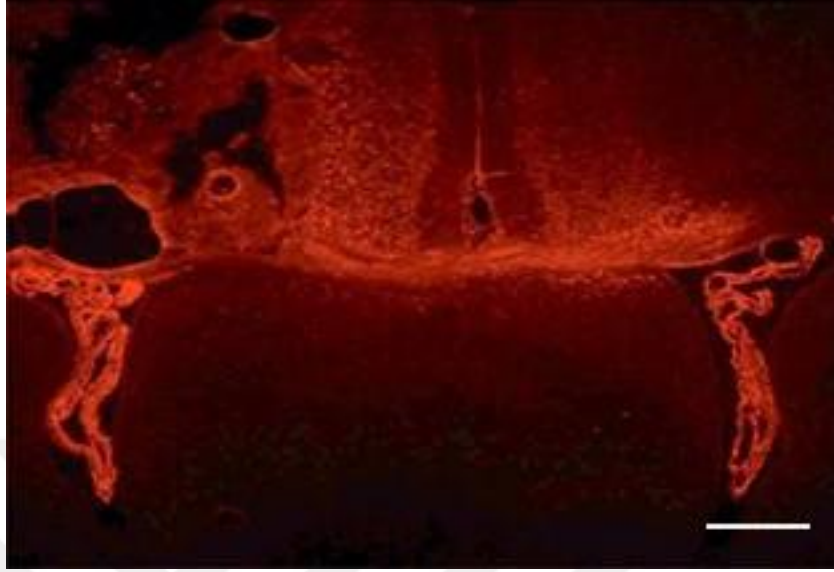
İ.s.v. kanül kullanıldığında yalancı uygulama beyinlerinde EKN grubu ile benzer şekilde HMGB1'in çekirdekten sitoplazmaya ve hücre dışına yer değiştirmesi ve Western Blotlamada da yalancı uygulama ile EKN arasında HMGB düzeyleri arasında fark görülmemesi i.s.v. enjeksiyon sırasında yaratılan olası mekanik travmayı düşündürmüştür. Bu nedenle kanül takılmayan iki fare ve hiç bir uygulama yapılmamış bir farede HMGB1 pozitif hücreler karşılaştırılmış, hiç bir uygulama yapılmamış hayvanda HMGB1 çekirdekte görülürken, EKN yapılan hayvanlarda HMGB1 yoğunluğunun çekirdekte belirgin azaldığı görülmüştür. Bu nedenle deneylere farelere i.s.v. enjeksiyon yapılmadan devam edilmesine karar verilmiştir.



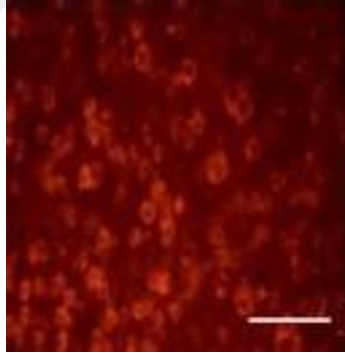


Şekil 3.1. Mediyal kortekste HMGB1 immünopozitifliğinin değerlendirildiği bölgeler. Cg1: Singulat 1, IL: İnfralimbik, PrL: Prelimbik. Morawska ve arkadaşlarının makalesinden uyarlanmıştır [199].

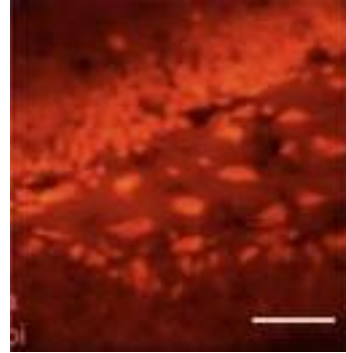
A) Başarılı PI Enjeksiyonu 10x



B) PI (+) Hücreler Korteks 40x



C) PI (+) Hücreler Dentat Girus 40x



Şekil 3.1. İ.s.v. PI enjeksiyonundan sonra kortekste görülen PI immünopozitif hücreler. **A.** İ.s.v. enjeksiyonun yapıldığı bölgeden alınan bu fotoğrafta PI'nın her iki ventrikül endodimal hücrelerinde tutulduğu, her iki hemisferin korteksinde PI pozitif hücrelerin bulunduğu görülmektedir. Ölçek=400um. **B.** Kortekste PI (+) hücreler, 40x büyütme. **C.** Dentat girusta PI (+) hücreler, 40x. Ölçek=100um.

4. BULGULAR

4.1. Tek EKN HMGB1 Salınımını Tetikler

Tek EKN (n=3) sonrasında farelerde korteksin medial bölgelerinde (prelimbik, infralimbik, anterior singulat, retrosplenial korteksler) ve hipokampusta, yalancı uygulamaya (n=3) göre gözle görünür şekilde HMGB1 pozitif hücre yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir. (Şekil 4.1A-B ve 4.2A-B). İlgili bölgelerden 40x büyümede alınan fotoğraflarla yapılan sayımda hipokampusta HMGB1 pozitif hücre sayısı yüzdesinin EKN grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde daha az olduğu saptanmıştır (Y.U.medyan= 48,68 ve EKN_{medyan}= 40,57; Mann-Whitney $U= 0$, $p=0.05$ iki kuyruklu) (Şekil 4.2C). Korteksin mediyal alanlarında HMGB1 pozitif hücre yüzdesinin yalancı uygulama grubunda daha fazla olduğu gösterilmiş, ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Y.U.medyan= 58,99 ve EKN_{medyan}= 48,22; Mann-Whitney $U= 1$, $p=0,12$ iki kuyruklu) (Şekil 4.2 D).

4.2. Tek EKN sonrasında BOS'ta HMGB1 seviyesi yükselmiştir

Tek EKN'den bir saat sonra sisterna magnadan toplanan BOS örneklerinin jelde yürütülmesi sonucunda yalancı uygulama grubunda BOS'ta HMGB1 miktarının daha düşük olduğu saptanmıştır (OD_{Y.U.}=10,07, OD_{EKN}=14,52; Şekil 4.3E).

4.3. Tek EKN uygulanmasından itibaren ilk altı saatlik zaman diliminde fare hipokampusunda ve prefrontal korteksinde HMGB1 miktarında artış olmamıştır

Tek EKN'den 1 (n=4), 2 (n=6), 4 (n=6) ve 6 saat (n=6) sonra sakrifiye edilen hayvanlar ile yalancı uygulama (n=6) sonrası sakrifiye edilen hayvanların prefrontal korteks ($x^2=4,91$, $p=0,29$) ve hipokampuslarında ($x^2=4,56$, $p=0,33$) HMGB1 protein düzeyleri açısından fark saptanmamıştır (Şekil 4.3 A-D).

4.4. Tek EKN uygulanmasından itibaren ilk altı saatlik zaman diliminde fare hipokampusunda ve prefrontal korteksinde BDNF miktarında artış olmuştur.

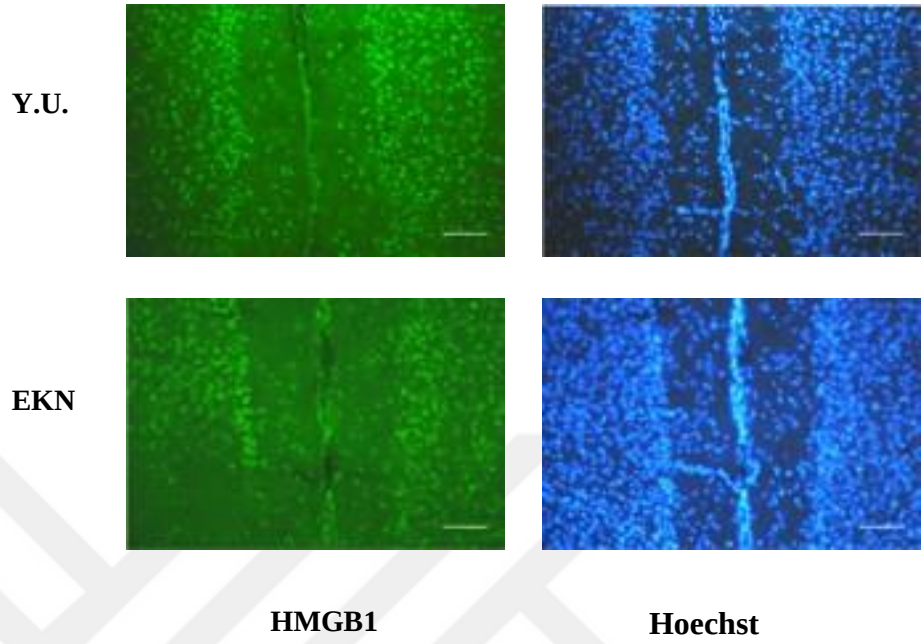
Tek EKN'den 1 (n=4), 2 (n=6), 4 (n=6) ve 6 saat (n=6) sonra sakrifiye edilen hayvanlar ile yalancı uygulama (n=6) sonrası sakrifiye edilen hayvanların prefrontal kortekslerinde ($\chi^2=7,60$, $p=0,01$) BDNF protein düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ancak 6. saat grubu ile yalancı uygulama grubu arasındaki fark anlamlı olma eğilimindedir ($EKN_{medyan}=166,17$ ve $Y.U._{medyan}=94,19$; Mann-Whitney $U=2$, $p=0,08$ iki kuyruklu). Hipokampus örneklerinde iki grup arasında belirgin fark görülmüştür ($\chi^2=13,86$, $p<0,01$). BDNF miktarları yalancı uygulama sonrasına göre 1. saatte ($EKN_{medyan}=68,45$ ve $Y.U._{medyan}=97,67$; Mann-Whitney $U=3$, $p=0,05$ iki kuyruklu), 2. saatte ($EKN_{medyan}=116,12$; Mann-Whitney $U=4$, $p=0,02$ iki kuyruklu), 4. saatte ($EKN_{medyan}=158,32$; Mann-Whitney $U=1$, $p=0,01$ iki kuyruklu) ve 6. saatte ($EKN_{medyan}=143,74$; Mann-Whitney $U=0$, $p<0,01$ iki kuyruklu) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermiştir (Şekil 4.4).

4.5. Tek EKN sonrası Antidepresan Benzeri Davranış Görülmemiştir.

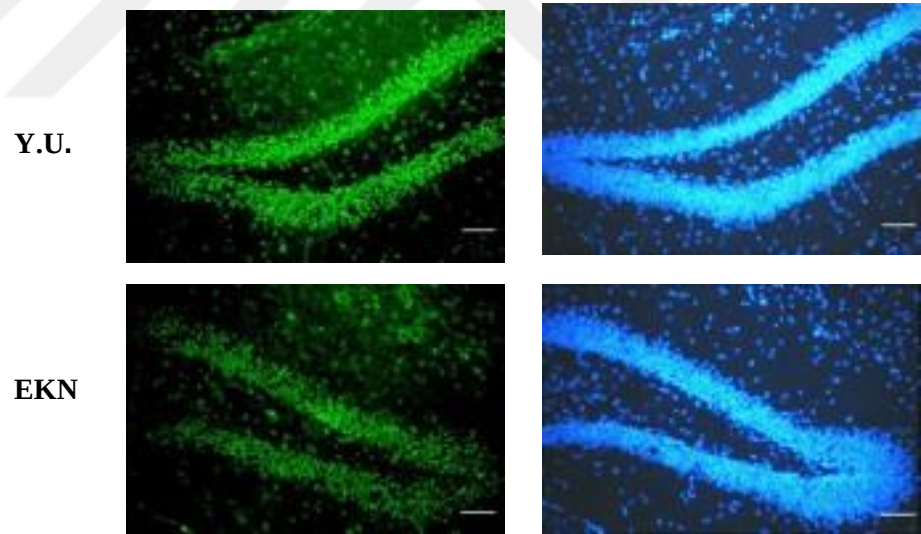
Tek EKN ve yalancı uygulamadan bir gün sonra kuyruktan asma testinde gruplar arası ortalama hareketsiz kalma süresi arasında fark saptanmamıştır ($Sham_{ort}=208,00$ ve $EKN_{ort}=236,50$; Mann-Whitney $U=27,5$, $p=0,41$) (Şekil 4.5 A).

EKN öncesi ve sonrası ortalama sükröz terchi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($EKN_{önce}=0,65$ ve $EKN_{sonra}=0,81$; $Z=-1,35$, $p=0,17$) (Şekil 4.5 C).

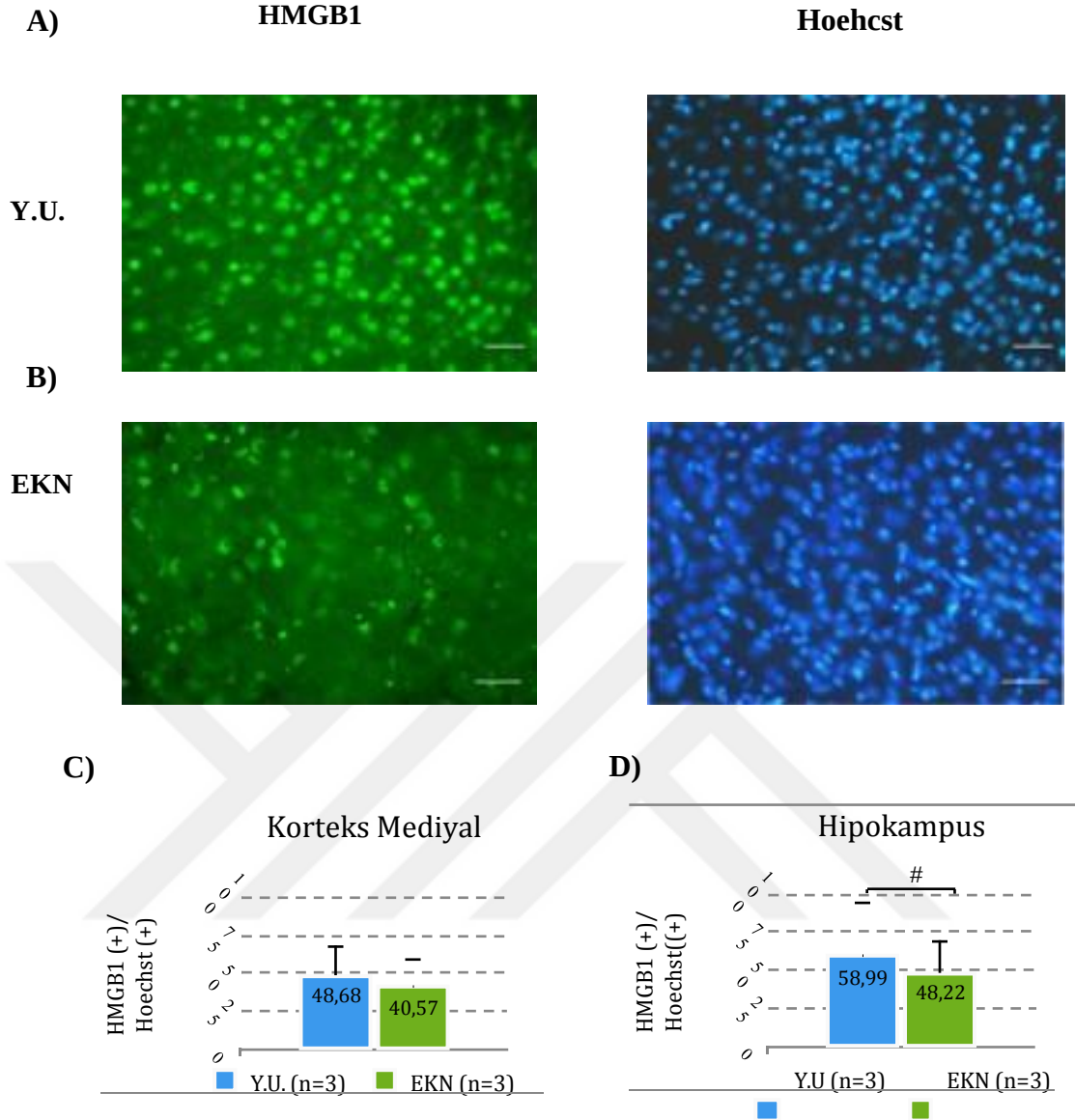
A) Anterior Mediyal Korteks 20x



B) Dentat Girus 20x

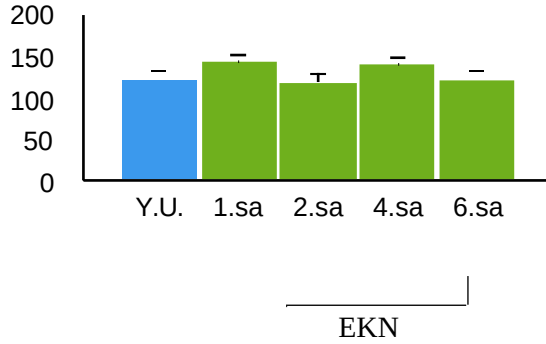


Şekil 4.1. EKN'den sonra HMGB1 immünopozitifliğinin korekte ve hipkampusta Y.U. grubuna göre azalması. Anterior Mediyal kortekste (A) ve Dentat Girusta EKN kesitlerinde HMGB1 immünopozitifliğinin azalmış olduğu görülmektedir. (B). Ölçek=100 um.

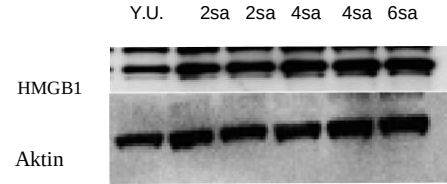


Şekil 4.2. Korteksin mediyal bölgelerinde ve hipokampusta HMGB1 immünopozitifliğinin Y.U. ve EKN gruplarındaki yoğunluğu. Anterior mediyal korteks 20x büyütme (A). Anterior mediyal korteks 40x büyütme (B). Korteksin mediyalinde HMGB1 (+) hücre oranı yüzde olarak (Y.U._{medyan}= 48,68 ve EKN_{medyan}= 40,57; Mann-Whitney U= 1, p=0.12) (C), Hipokampusta Y.U. grubunda anlamlı olarak HMGB1 (+) hücre oranı daha yüksek tespit edilmiştir (Y.U._{medyan}= 58,99 ve EKN_{medyan}= 48,22; Mann-Whitney U= 0, p=0.05 iki kuyruklu) (D). Ölçek=40um.

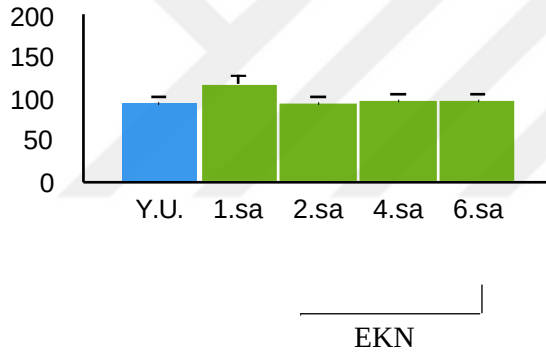
**A) PFK'da Düzeltilmiş HMGB1/Aktin
Yüzde Olarak**



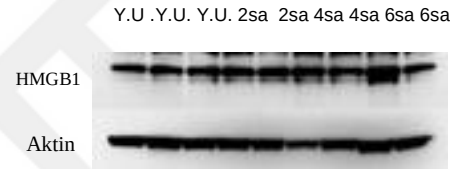
B)



**C) Hipokampusta Düzeltilmiş HMGB1/Aktin
Yüzde Olarak**



D)



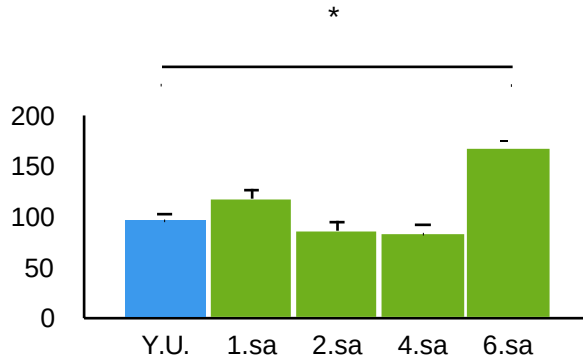
E) BOS'ta HMGB1 Düzeyi



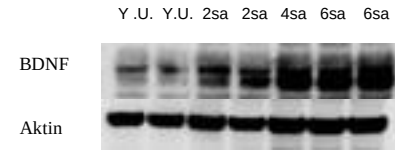
Y.U. (N=4) EKN (N=4)

Şekil 4.3. Western blotlama ile PFK ve hipokampusta HMGB1 miktarının ölçülmesi. Y.U.'dan (n=6) sonra ve EKN'den sonra 1 (n=4), 2 (n=6), 4 (n=6) ve 6. saatlerde (n=6) kurban edilen hayvanların prefrontal korteks (p=0,29) ve hipokampuslarında (p=0,33) HMGB1 miktarı açısından birbirinden farklılık göstermediği saptanmıştır (A-D). B ve D'de üst sıralarda HMGB1 antikoruna, alt sıralarda aktin antikoruna ile işaretlenmiş örnek bantları görünmektedir. BOS'ta HMGB1 düzeyi yalancı uygulamaya göre EKN sonrasında artış göstermektedir (OD Y.U.=10.07, OD EKN=14.52) (E).

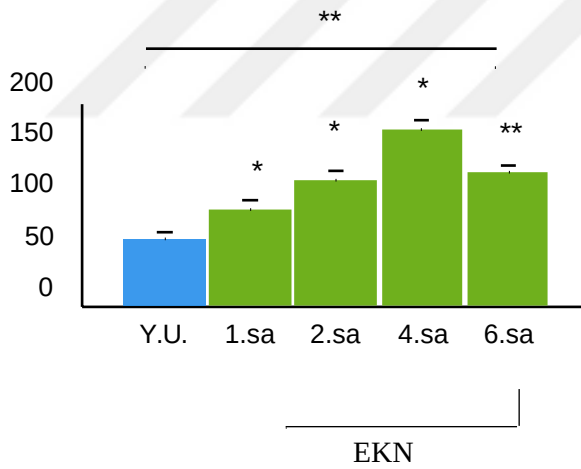
**A) PFK'da Düzeltilmiş BDNF/Aktin
Yüzde Olarak**



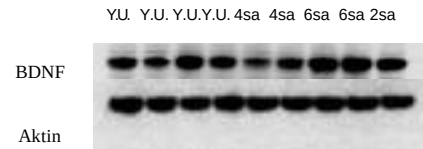
B)



**C) Hipokampusta Düzeltilmiş BDNF/Aktin
Yüzde Olarak**

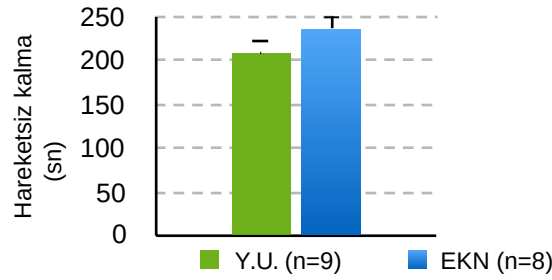


D)

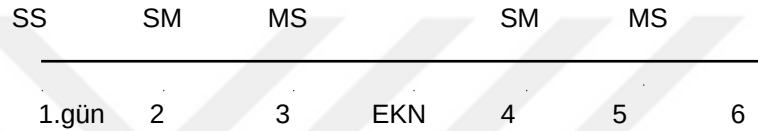


Şekil 4.4. Western Blotlama ile BDNF miktarının PFK ve hipokampusta ölçülmesi. Y.U. (n=6) ve EKN'den sonra 6. saatte sakrifiye edilen hayvanların (n=6) prefrontal korteks (p=0,08) ve hipokampus örneklerinde iki grup arasında BDNF miktarı açısından belirgin fark görülmüştür (p<0,01). Hipokampusta BDNF miktarları yalancı uygulama sonrasına göre 1. saatte (n=4, p=0,05), 2. saatte (n=6, p=0,02), 4. saatte (n=6, p=0,01) ve 6. saatte (p<0,01) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermiştir (C). B ve D'de üst sıralarda BDNF antikoruna ile, alt sıralarda aktin antikoruna ile işaretlenmiş örnek bantları görülmektedir.

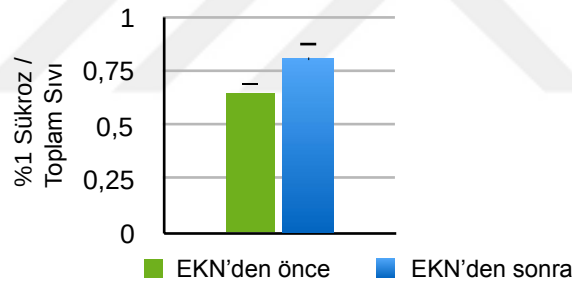
A) Kuyruktan Asma Testinde Hareketsiz Kalma Süreleri



B) Sükroz Tercih Deney Akışı



C) %1 Sükroz Çözeltisini Tercih Etme Oranları



Şekil 4.5. EKN veya Y.U. sonrasında KAT ve STT'de gruplar arasında hareketsiz kalma süreleri ve sükroz tüketim süreleri açısından farklar. (A). STT'de ilk gün bütün suluklarda %1 sükroz solüsyonu (SS), 2. gün kafesteki suluklardan birinde musluk suyu (M), diğerinde sükroz çözeltisi (S) yer almış; 3.gün sağ ve soldaki sulukların yerleri birbirleriyle değiştirilmiştir (SM/MS). 4.gün EKN uygulanmış; 5. ve 6. gün sırayla sükroz çözeltisi kafeslerin sağ ve soluna (SM/MS) yerleştirilmiştir. 5. ve 6. günlerdeki ortalama sükroz tüketimi ile 2. ve 3. günlerdeki ortalama sükroz tüketimi birbiriyle karşılaştırılmış (B), EKN öncesi ve sonrasında fark görülmemiştir ($p < 0,17$) (C).

5. TARTIŞMA

Depresyon hastalarında tek bir EKT uygulamasından sonra periferik kanda inflamatuvar yanıtın geçici bir süre ile tetiklendiği, kemirgenlerde tek EKN'den sonra mikrogliaların etkinleştiği gösterilmiştir [8, 74, 84]. Bu bulgularla uyumlu olarak bizim çalışmamızda tek EKN sonrasında hücre dışında proinflamatuvar bir sitokin gibi davrandığı bilinen HMGB1'in korteks ve hipokampusta hücre dışına çıktığı ve buna paralel olarak BOS'ta HMGB1 düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir. HMGB1 travma, enfeksiyon, stres gibi durumlarda aktif veya pasif olarak hücre dışına salınabilmekte; TLR ve RAGE reseptörlerine bağlanarak proinflamatuvar sitokinlerin sentezini uyarmaktadır. HMGB1 aracılığı ile beyin dokusunda artan proinflamatuvar yanıtın KYD, epileptik nöbet, iskemi ve travma sonrası ortaya çıkan nöroinflamasyon ile ilişkisi birçok çalışmada ortaya konulmuştur [11, 115, 118, 119]. Çalışmamızda tek EKN'den bir saat sonra HMGB1 (+) hücre sayısının yalancı uygulama ile karşılaştırıldığında korteksin mediyal alanlarında (prelimbik, infralimbik, anterior singulat, retrosplenial korteksler) belirgin olarak daha düşük olma eğiliminde olduğu, hipokampusta ise istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde daha az olduğu saptanmıştır. EKN'den bir saat sonra BOS'ta bakılan HMGB1 düzeyinin EKN grubunda daha yüksek olması, korteks ve hipokampustaki HMGB1 (+) hücre sayısındaki azalmanın HMGB1'in hücre dışına salınmasına ikincil olduğunu destekler. Yalancı uygulama ve EKN'den 1, 2, 4 ve 6 saat sonra kurban edilen farelerin prefrontal korteks ve hipokampuslarında HMGB1 miktarı açısından fark olmaması BOS'ta tespit edilen yükselmenin yeni HMGB1 sentezine (indüksiyon) değil uyarılmış hücrelerden mevcut HMGB1'in salınmasına bağlı olduğunu düşündürmektedir. Laboratuvarımızda yapılan başka bir çalışmada KYD sonrası 30. dakikada HMGB1 (+) hücre sayısının azaldığı saptanmış, ancak bu çalışmadan farklı olarak belirgin miktarda HMGB1'in çekirdekten sitoplazmaya yer değiştirdiği sitoplazmik boyanma gösteren hücreler tespit edilmiştir [11]. Çalışmamızda sitoplazmik HMGB1 (+) hücrelerin tespit edilememesinin nedeni KYD'den yarım saat sonra hayvanları kurban eden Karataş ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak çalışmamızda farelerin EKN'den bir saat sonra kurban

edilmesi olabilir. Birinci saate gelindiğinde, EKN'den hemen sonra çekirdekten sitoplazmaya yer değiştirmiş HMGB1 artık hücre dışına salınmış olabilir. Ayrıca aynı çalışmada tek KYD'den 5 dakika ve 30 dakika sonra kortekste HMGB1 (+) hücrelerin bir nöron işaretleyicisi olan NeuN ile boyanmış hücrelere oranları % 88 ve % 52 olarak bildirilmiştir. Ancak çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar HMGB1 (+) hücrelerin nöronal ve nöronal olmayan bütün nükleusları işaretleyen Hoechst ile boyanmış hücrelere oranlarıdır (EKN'den bir saat sonra % 38,74, yalancı uygulamadan sonra % 49,09); bu durum iki sonucun karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Diğer çalışmada HMGB1 düzeyi BOS'ta KYD'den bir saat sonra yalancı uygulamaya göre 10 kat artış göstermişken, bizim çalışmamızda EKN'den sonra 1.5 kat artış saptanmıştır [11]. Bu sonuç KYD'nin EKN'ye göre nöroinflamatuvar cevabı daha güçlü uyarıyor olabileceğine işaret edebilir. Ancak bizim çalışmamızda BOS'un dura delinerek sisterna magnadan toplandığı, diğer çalışmada ise BOS'un i.s.v. kanülden toplandığı unutulmamalıdır. Duranın delinmesi yalancı uygulamada bile dural mast hücrelerinden HMGB1 salıverilmesine yol açmış olabilir.

Karataş ve arkadaşlarının çalışmasında nöronlarda HMGB1'in çekirdeği panneksin kanallarının açılmasından sonra terk ettiği tespit edilmiştir. Bu bilgi bize EKN'nin HMGB1 üzerindeki etkisinde panneksin kanallarının rol oynuyor olabileceğini düşündürmüştür. Panneksin kanallarının açılması ile inflamazomun etkinleştiği, bu sayede prokaspaz-1'in kaspaz-1'e dönüştüğü ve HMGB1'in hücre dışına salındığı bilinmektedir [10, 11]. Tek EKN'nin panneksin kanalları üzerindeki etkisinin incelenmesi amacı ile panneksin kanallarının açıldığının bir işaretleyicisi olarak kullanılan PI EKN öncesinde i.s.v. olarak farelere verilmiştir. Optimizasyon deneyleri bölümünde ayrıntılı olarak anlatıldığı üzere hem EKN'den hem de yalancı uygulamadan sonra özellikle medial alanlarda PI (+) hücreler görülmüştür. Mekanik uyarılar ile panneksin kanallarının açıldığı bilinmektedir [200]. Bu nedenle yalancı uygulamadaki sinyal artışının, Karataş ve arkadaşlarının anestezi altındaki deneylerinin aksine hareketli hayvanda işlem sırasında kanülün beyin içindeki olası hareketinden kaynaklanan mekanik travma ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Kanülün kraniyuma sabitlenmesi amacı ile çeşitli yöntemler denenmiş, enjeksiyon sırasındaki travma asgari düzeye indirilmeye çalışılmıştır. Ancak yalancı uygulamada PI tutulumu devam etmiş, bu nedenle PI-panneksin deneyleri durdurulmuştur. PI tutulumunun yalancı uygulamada da tespiti yöntemimizin optimizasyona rağmen panneksin kanallarını açtığı ve etkisinin EKN'nin etkisini maskeleyebilecek düzeyde olduğunu düşündürmüştür. Aynı yöntemi (kanül aracılığı ile i.s.v. enjeksiyon) kullanarak HMGB1'in çekirdek ve hücre dışına translokasyonunu değerlendirmeyi amaçladığımız deneyler sonucunda da panneksin deneylerine benzer şekilde HMGB1'in hem yalancı uygulama hem de EKN gruplarında hücre dışına çıktığı görülmüştür. HMGB1'in de mekanik stres ile etkinleştiği düşünüldüğünde bu sonuç şaşırtıcı değildir [201]. İ.s.v. enjeksiyon yapılmayan farelerde EKN'den sonra HMGB1'in hücre dışına salındığını gösterdiğimiz deneyler bu savı desteklemektedir. İ.s.v. enjeksiyonlardaki problemler bizi i.p. uygulanabilecek bir panneksin 1 inhibitörü arayışına itmiş ve yeni ortaya çıkan ve henüz ticari olarak temin edilemeyen i.p. uygulanabilen Panx etkisini engelleyen bir peptid ile yeni deneyler planlanmıştır.

Tek ve tekrarlayan EKN sonrasında özellikle hipokampusta, daha az sıklıkla da prefrontal kortekste BDNF miktarında ve ifadesinde artış olduğu bildirilmiştir [29, 33]. Bizim çalışmamızda da BDNF miktarı hipokampusta EKN'den sonra 1. saatten itibaren artış göstermiştir. Prefrontal kortekste ise istatistiksel olarak anlamlı artış EKN'den sonra 6. saatte görülmüştür. Altar ve arkadaşları tek EKN'den 15 saat sonra sakrifiye ettikleri farelerin beyinlerinde BDNF miktarının hipokampusta ve prefrontal kortekste artış göstermediğini, en az 4 gün ard arda uygulanan EKN'den sonra bu bölgelerde artış tespit edildiğini bildirmişlerdir [31]. Benzer bir sonuç Balu ve arkadaşlarının tek EKN'den 24 saat sonra BDNF miktarına baktıkları çalışmalarında da bulunmuştur [33]. Oysa Dyrvig ve arkadaşları tek EKN'den 1 saat sonra hipokampusta arttığını tespit ettikleri BDNF mRNA ifadesinin 4. saatten sonra azaldığını ve 16. saatte eski haline döndüğünü göstermişlerdir [28]. Bu sonuçla uyumlu bir şekilde Nibuya ve arkadaşları tek EKN'den 18 saat sonra hipokampusta BDNF ifadesindeki artışın kaybolduğunu bildirmişlerdir [30]. Bu bulgular tek

EKN'den sonra hipokampusta BDNF mRNA ifadesinin hızlıca arttığını ve 6-8 saatten sonra eski düzeylerine düştüğünü düşündürmektedir. Prefrontal kortekste tekrarlayan EKN'lerden sonra BDNF ifadesi ve protein miktarında artış bir çok çalışmada gösterilse de [31, 202], tek EKN'den sonra frontal kortekste BDNF ifadesinde artış yalnızca Nibuya ve arkadaşları tarafından ve BDNF miktarında düşük miktarda artış Sartorius ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir [30]. Bazı çalışmalarda frontal kortekste tek EKN'den sonra BDNF'de değişiklik saptanmamasının nedeni, hipokampus için bahsedilen zamanlama problemi dışında prefrontal kortekste hipokampusa kıyasla daha düşük beklenen BDNF ifade ve protein miktarı artışının çalışmalar arasındaki yöntemsel farklılıklar nedeni ile gösterilememesi olabilir [203]. Örneğin sabit voltaj ile verilen uyarıların tetiklediği nöbetler daha kısa olduğu veya uyarının korneal ya da kulak elektrotları ile verilmesinin elektirik akımının geçtiği bölgeleri etkilediği düşünülmektedir [203, 204]. Ayrıca protein tayini için kullanılan ELISA ve Western blotlama yöntemlerinin de hasasiyetleri farklıdır. Nibuya ve arkadaşları hipokampusta BDNF ifadesindeki artışın 30 kat, prefrontal kortekste ise 2 kat olduğunu bildirmiştir [30]; bu durumda yöntemsel farklılıkların etkisinin prefrontal kortekste açığa çıktığı düşünülebilir. Kainik asit kullanılarak nöbet tetiklenen başka bir çalışmada da BDNF protein düzeyindeki artış prefrontal korteks, amigdala ve striatuma göre hipokampusta daha erken ve daha yüksek tespit edilmiştir [205].

Yukarıda da bahsedildiği gibi çalışmamızda, literatürde EKN ve BDNF ilişkisini araştıran birçok çalışmada olduğu gibi EKN'nin öncelikle ve daha belirgin olarak hipokampus ve prefrontal kortekste BDNF miktarında artışa neden olduğu gösterilmiştir [29, 33]. Kemirgenlerde bu ve insandaki karşılıklarının depresyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [206]. Çalışmamızda EKN'den sonra daha erken bir zamanda HMGB1'in de bu bölgelerde hücre dışına taşınması HMGB1'in salınımı ile BDNF miktarındaki artış arasında bir ilişki olabileceğini akla getirmektedir. Hayakawa ve arkadaşları iskemide erken dönemde salınan HMGB1'i geç dönemde artan BDNF miktarı ile ilişkilendirmişlerdir [117]. Bizim çalışmamızın bulgularıyla böyle bir ilişki kurmak mümkün değildir ancak BDNF miktarındaki artışın HMGB1

ile ilişkisini araştırmak için shRNA ile HMGB1 ifadesinin susturulacağı yeni deneyler planlanmıştır.

BDNF'nin antidepresan tedavi cevabı ile ilişkili olduğu birçok çalışmada ortaya konmuştur [36, 207]. Bu nedenle hipokampus ve prefrontal kortekste tespit edilen BDNF artışı ile antidepresan benzeri tedavi yanıtının birlikte değerlendirilmesinin yararlı olabileceği düşünülmüştür. Literatürde EKN'nin antidepresan etkinliğini incelemek için en sık zorlu yüzme testi (ZYT) kullanılmaktadır. Tekrarlayan EKN'lerin strese maruz bırakılmış veya bırakılmamış kemirgenlerde zorlu yüzme testinde hareketsiz kalma süresini kısalttığı gösterilmiştir [208-210]. Ancak tek EKN ile benzer bir sonuç alınamamıştır [211]. ZYT ile ortak olarak davranışsal umutsuzluğu değerlendirdiği düşünülen kuyruktan asma testinin (KAT) birkaç çalışma dışında EKN literatüründe sık kullanılmadığı görülmüştür. Tekrarlayan EKN'lerden bir gün sonra uygulanan test sonucunda EKN grubunda hareketsiz kalma süresinin yalancı uygulama grubuna göre belirgin olarak daha kısa olduğu tespit edilmiştir [212]. Tek EKN sonrası KAT inceleyen bir çalışma tarafımızca bilinmemektedir. Bu nedenle EKN ve yalancı uygulamadan 24 saat sonra KAT uygulanmış, ancak gruplar arasında hareketsiz kalma süreleri açısından anlamlı bir fark görülmemiştir. Depresyon benzeri davranışları ve antidepresan tedavi yanıtını değerlendirmek için kemirgenlerde kullanılan bir diğer test sükröz tercih testidir (STT). Anhedoni benzeri davranışı değerlendirdiği düşünülen STT strese maruz kalmış rodentlerde tekrarlayan EKN'lerden sonra kullanılmış ve EKN'nin stresin etkilerini geri çevirdiği görülmüştür [37, 213, 214]. Van Buel ve arkadaşları stres uygulanmamış farelerle yaptıkları deneylerde STT'de tek ve tekrarlayan EKN'lerin etkisini gösterememişlerdir [215]. Literatürde tek EKN'den sonra STT uygulanmış başka bir çalışma tarafımızca bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda tek EKN'den önce ve sonra farelerin %1 sükröz çözeltisini tercih etme oranları hesaplanmış ancak tek EKN'nin sükröz tercihi üzerinde bir etkisi olmadığı görülmüştür. Literatürde STT'de olası hataları önlemek için önerildiği üzere farelerin yeniliğe karşı tepkilerini ortadan kaldırmak için test gününden önce fareler sükröze alıştırmış, kafesin sağ-solunu tercih etme ihtimallerine karşı sükröz çözeltisi

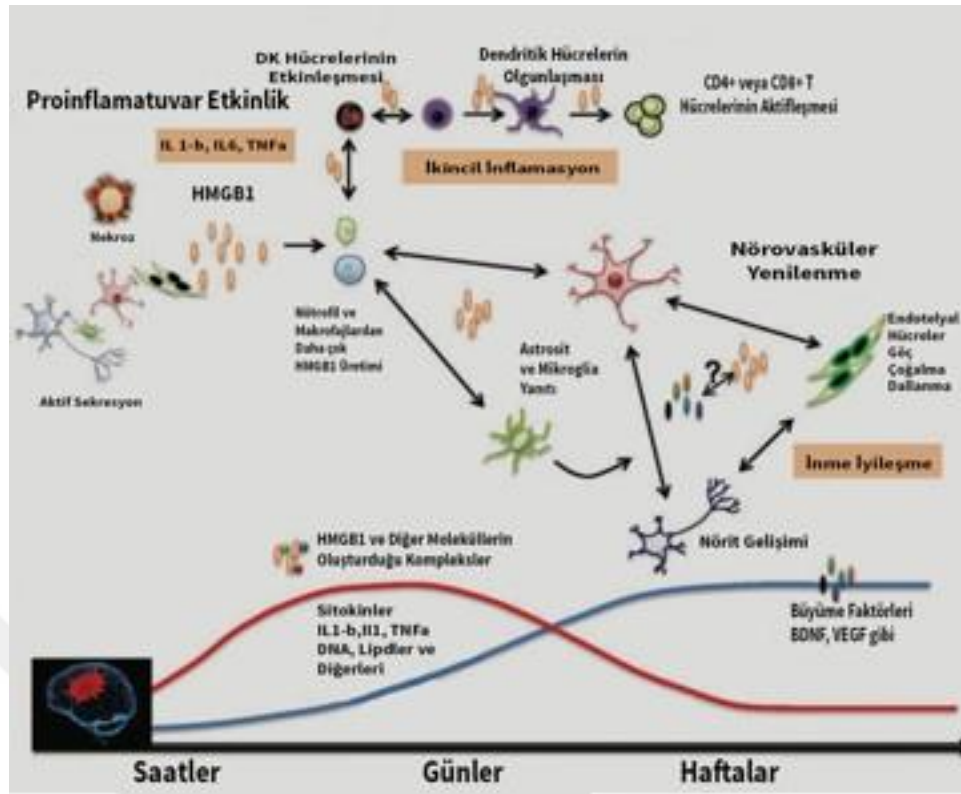
kafesin her iki tarafına da sırayla yerleştirilmiştir. Elde edilen bulgu tek EKN'nin STT üzerinde etkisi olmadığını düşündürse de, STT'nin literatürde çoğunlukla kronik stresten sonra kullanıldığı göz önünde bulundurulmalıdır. Ancak KAT sonuçlarında da EKN'nin yalancı uygulamadan üstün bir etkisi görülmemesi tek EKN'nin antidepresan benzeri davranışları sağlamada yeterli olmayabileceğinin altını çizmektedir. Bazı çalışmalar aksini gösterse de tek EKT'nin klinik olarak antidepresan etki için yeterli olmadığı çalışmalarda daha sık tekrar edilen bir bulgudur [21, 27].

Panneksin ya da P2X7 kanallarının açılması, kaspaz-1'in etkinleşmesi, HMGB1'in hücre dışına salınması ile devam eden inflamatuvar yolak şimdiye kadar genellikle epilepsi, iskemi ve migren gibi patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir [11, 118, 139]. Stresin IL-1b, HMGB1 ve NLRP3 ifadesini arttırdığı [100], depresyon modellerinde ve depresyonda proinflamatuvar moleküllerin rodent beyinde ve insan serumunda artış gösterdiği bilinmektedir [216]. Bu bilgiler nedeni ile inflamatuvar cevap son yıllara kadar doku hasarına doğru dokuyu götüren bir olgu olarak görülmüş, proinflamatuvar sitokinler hem biyolojik işaretleyici hem de yeni tedavi arayışlarının hedefi olmuşlardır. Oysa son yıllarda yapılan çalışmalar IL-1b gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve bağışıklık hücrelerinin nörogenez, nöron göçü, gelişim, öğrenme ve bellek gibi birçok fizyolojik süreçte de rol oynadığını göstermektedir [106-108]. Proinflamatuvar sitokinlerin etkilerinin konsantrasyona, hangi hücrelerin etkinleştiğine (astrosit ve mikroglia gibi) ve ortamda var olan salınmış diğer faktörlerin varlığına bağlı olduğu düşünülmektedir [217]. Örneğin hücre dışına salınan HMGB1'in RAGE reseptörünü etkinleştirmesi hem hücre göçü ve çoğalmasını sağlayan yolağı hem de proinflamatuvar sitokin sentezini uyaran yolağı başlatabilir. Bu yolaklardan biri hücre motilitesi ve nörit uzamasını (*outgrowth*) düzenleyen guanozin trifosfataz CD42 ve RAC etkinleşmesine neden olurken, bir diğeri NF-kB'yi etkinleştiren çeşitli MAPK'ların fosforilasyonuna neden olur [132]. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar MAPK etkinliğinin de nöron ve endotelial progenitör hücre çoğalmasında rolü olduğunu göstermektedir [133, 153]. Reaktif astrositlerden salınan HMGB1'in beyaz cevher hasarı, iskemi ve intraserebral

kanamadan iki hafta sonra RAGE üzerinden MAPK'yı etkinleştirdiği, BDNF düzeyinde artışa yola açarak nörojeneze ve endotelial progenitor hücre çoğalmasına katkıda bulunduğu iddia edilmektedir [117, 133, 153] (Şekil 5.1). RAGE etkinliğinin benzer ikincil mesajcı araçlarla farklı cevaplar oluşturmalarının açıklamalarından biri RAGE etkinliğinin şiddeti ve süresindeki farklılıklardır. Öyle ki düşük RAGE etkinliğinin ve düşük HMGB1 konsantrasyonunun sırasıyla hücrelerin hayatta kalımını ve çoğalmasını destekleyen etkileri olduğu gösterilmiştir [133, 136]. RAGE etkinliğinin doğrultusunun belirlenmesinde reaktif oksijen türlerini dengeleyecek glutasyon gibi antioksidan moleküllerin önemli rol oynadığı düşünülmektedir [218]. HMGB1'in hücre dışındaki ikili rolü de mikroçevrenin genel durumu ile açıklanmaktadır. Nitekim HMGB1'in birbirinden farklı rolleri olan redox izoformlarının değişen koşullara hızla cevap verdiği bilinmektedir [111]. Bununla beraber HMGB1'in etkisinin bağlandığı reseptörlere ve o reseptörlere birlikte bağlandığı sitokin, fosfolipid gibi moleküllere göre değiştiği hatta saf rekombinan HMGB1'in proinflatuvar etkisi olmadığı öne sürülmektedir [219]. Çalışmalardan elde edilen bu bulgular, status epileptikustaki gibi dokunun kaynaklarını tüketecek kadar uzun uyarılar sonucunda, serebrovasküler olaylardaki gibi vasküler desteğin aksaması ile doku homeostazının ciddi derecede bozulduğu durumlarda veya günler süren kronik stres durumunda neden HMGB1 ve diğer proinflatuvar moleküllerin homeostatik dengenin ibresini doku hasarı yönünde kaydırabildiğini açıklayabilir. Dokunun tükenen vasküler ve antioksidan kaynakları inflamatuvar yanıtın durdurulması için yeterli olmayabilir. Özellikle insanda epileptik dokuda ve kemirgenlerde nöbet modelleri ile EKN'den sonra görülen değişikliklerdeki ortaklık çarpıcıdır. İnsanda epileptik dokuda ve farede kainik asit ile indüklenmiş nöbetlerden sonra HMGB1 düzeylerinin arttığı ve doku hasarında rolü olduğu gösterilmiştir [118, 156] Ayrıca kemirgenlerdeki birçok nöbet modelinin BDNF düzeyini ve ifadesini arttırdığı [220] ve BDNF'nin nöbetlerin oluşumunda ve nöbet sonrası doku hasarında rolü olduğu gösterilmiştir [221]. Bu konuda literatürdeki çalışmalar yaygın olmasa da ifade edilen transkriptlerin farklı olabileceği düşünülmektedir. Örneğin EKN'den sonra ekzon 1, 2 ve 4 mRNA ifadesi daha yüksek tespit edilmişken [222], kainik asit

sonrasında ekzon 1, 2, 3 ve 4 mRNA ifadesi artmıştır [223]. Literatürdeki bütün bu bulguların sonucunda aslında fizyolojik şartlarda da hücreler arası iletişimde görevli ve nörojeniz, öğrenme gibi süreçlere aracılık eden proinflatuvar moleküllerin, doku hasarına neden olabilecek bazı koşullar birleştiğinde, örneğin eksitasyon eşiği düşmüş bir dokuda vasküler veya anti-oksidan kaynaklar yetersiz kaldığında, çeşitli hücrelerden hızlıca ve yüksek miktarda salındığı anlaşılmaktadır. Bu durumdaki, hasarlı veya yetersiz kalmış dokunun ise proinflatuvar sitokinlerin hatta nörotrofik faktörlerin etkinliğini sınırlandırmakta güçlük çektiği ve böylece artan konsantrasyonlarda, daha uzun süre hücre dışı ortamda bulunan bu moleküller ile etkinleştirdikleri ve çağırdıkları hücrelerin, ayrı ayrı ve birbirlerini tetikleyerek gittikçe büyüyen bir inflamatuvar yanıt ve nihayetinde doku hasarına neden olabileceği öne sürülebilir. Sitokinlerin bağışıklık sistemi hücrelerinden BDNF salınımına [224], BDNF'nin de tekrar sitokin salınımına neden olduğunu bildiren çalışmalar [225] tek yönlü doğrusal açıklamaların bu sistemi anlamakta yetersiz kalacağına işaret eder. Nitekim inflamasyon ve depresyon arasındaki ilişki temel alınarak desenlenen çalışmalarda anti-inflatuvar ilaçların antidepresan etkiyi güçlendirmek bir yana zayıflatığı hem insanda hem de kemirgenlerde gösterilmiştir [226, 227].

Bu çalışmada tespit edilen HMGB1 salınımı ve BDNF düzeyindeki artış, EKN'nin tedavi edici etkisi ile ilişkili olabileceği kadar, EKT'nin bilinen yan etkileri olan amnezi ve baş ağrısı ile de ilişkili olabilir. Erken dönemde gördüğümüz bu inflamatuvar cevabı her iki doğrultuya da uzanan yolları etkinleştirebilmesi muhtemeldir, bu nedenle bu inflamatuvar yanıt aynı anda hem etki hem de yan etki ile ilişkili olabilir. Karataş ve arkadaşlarının çalışmasında HMGB1 salınımının baş ağrısına benzer davranışa neden olduğu gösterilmiştir [11]. Bu bilgi EKN'nin bu yolk üzerinden baş ağrısına yol açabileceğini düşündürse de, KYD'den sonra tespit edilen HMGB1 etkinliğinin EKN'ye göre daha şiddetli olduğu ve baş ağrısı benzeri davranışın tekrarlayan KYD'lerden sonra ortaya çıktığı göz önünde bulundurulduğunda EKN'nin baş ağrısını sadece bu yolk üzerinden tetiklemiyor olabileceği akla gelir. Bu çalışmanın devamında HMGB1'in baş ağrısı benzeri



Şekil 5.1. HMGB1'in iskemiden sonra oynadığı ikili rol. İskemiden sonra hücre dışında hızla HMGB1 artar, saatler içinde sitokinlerin ifadesi artar, beyine nötrofil ve makrofaj infiltrasyonu olur. Bütün bunlar HMGB1 düzeyinin daha da yükselmesine neden olur ve HMGB1 ortamdaki DNA, lipid ve IL-1b gibi moleküllerle kompleksler oluşturur. Bağışıklık cevabı büyür. Haftalar içinde reaktif astrositler HMGB1 salınımı ile BDNF düzeylerinde artışa, nörogenez ve endotelial hücre progenitörlerinde çoğalmaya neden olur (Hayakawa ve arkadaşlarının 2010 yılındaki makalesinden uyarlanmıştır.) [133].

davranış üzerindeki etkisi shRNA'lar aracılığı ile HMGB1'in susturulması ve farelerde mimik ölçeği kullanılarak baş ağrısı benzeri davranışın değerlendirilmesi ile açıklığa kavuşturulabilir. EKT'nin bir diğer sık görülen yan etkisi olan amnezinin de inflamatuvar yanıtla ilişkili olduğunu düşünen yazarlar vardır [228, 229]. Bu ilişkiye örnek olarak COX-2 inhibitörü olan celecoxibin ve indometazin EKN'lerden sonra görülen retrograd amneziyi önleyici etkileri verilebilir [230, 231]. Ayrıca Zhu ve arkadaşları kronik strese maruz kalmış sıçanlar ile yaptıkları çalışmada, tekrarlayan EKN'lerden sonra hipokampusta artan Il-1b ve TNF-a miktarı

ve hafıza bozukluğunun ketamin ile kontrol düzeyine indiğini göstermişlerdir [232]. Bu sonuçlar HMGB1 ve amnezi arasındaki ilişkinin incelenmesinin değerli olabileceğini düşündürür. İlerleyen dönemde, HMGB1'in susturulmasının EKN'den sonra retrograd amnezinin değerlendirildiği pasif kaçınma veya Morris'in su tankı testlerinde yarattığı etki incelenebilir.

Özetle, bu çalışma tek EKN'den sonra hipokampus, medial prefrontal korteks, anterior singulat ve retrosplenial kortekslerde HMGB1'in hücre dışına salındığını ortaya koymaktadır. Epilepsi, iskemi ve KYD gibi patolojik durumlarda bildirilen HMGB1'in hücre dışına çıkışının, antidepresan etkinliği olan EKN tarafından tetikleniyor olması ilk bakışta mantıklı görünmese de; EKN ile tetiklenen inflamatuvar yanıtın antidepresan etki ve yan etkinin altında yatan süreçlerin başlangıcı olduğu öne sürülebilir. EKN'den sonra tespit edilen HMGB1 salınımının artan BDNF düzeyleri ile ilişkisi için HMGB1'in susturulduğu yeni deneyler planlanmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Tek EKN hipokampus ve korteksin mediyalinde HMGB1 salınımını tetiklemiştir.
2. Tek EKN sonrasında BOS'ta HMGB1 seviyesi yükselmiştir.
3. Tek EKN uygulanmasından itibaren ilk altı saatlik zaman diliminde fare hipokampusunda ve prefrontal korteksinde BDNF miktarında artış olmuştur
4. Tek EKN sonrası kuyruktan asma testi ve sükröz tercih testleri ile antidepresan benzeri davranış görülmemiştir.
5. Tek EKN'den sonra HMGB1'in salındığı hücre tipleri tespit edilmelidir.
6. Tek EKN'den sonra hipokampusta ve PFK'da hücre dışına çıkan HMGB1 ile hipokampus ve PFK'da tespit edilen BDNF protein ifadesindeki artış arasındaki ilişkinin araştırılması için HMGB1 ifadesinin susturulduğu yöntemlerle deneyler tekrarlanmalıdır.
7. Tek EKN'den sonra Panx1 aktivitesinin araştırılması amacı ile Panx1 etkinliğini baskılayacak i.p. yolla uygulanabilen ajanlar kullanılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Kessler, R.C., et al., Co-morbid major depression and generalized anxiety disorders in the National Comorbidity Survey follow-up. *Psychol Med*, 2008. **38**(3): p. 365-74.
2. Keitner, G.I., C.E. Ryan, and D.A. Solomon, Realistic expectations and a disease management model for depressed patients with persistent symptoms. *J Clin Psychiatry*, 2006. **67**(9): p. 1412-21.
3. Kho, K.H., et al., A meta-analysis of electroconvulsive therapy efficacy in depression. *J ECT*, 2003. **19**(3): p. 139-47.
4. Machado-Vieira, R., et al., Brain-derived neurotrophic factor and initial antidepressant response to an N-methyl-D-aspartate antagonist. *J Clin Psychiatry*, 2009. **70**(12): p. 1662-6.
5. Kho, K.H., et al., A study into predictors for the speed of response to electroconvulsive therapy. *J ECT*, 2004. **20**(3): p. 154-9.
6. Scott, A.I., Electroconvulsive therapy, practice and evidence. *Br J Psychiatry*, 2010. **196**(3): p. 171-2.
7. Gibney, S.M., et al., Poly I:C-induced activation of the immune response is accompanied by depression and anxiety-like behaviours, kynurenine pathway activation and reduced BDNF expression. *Brain Behav Immun*, 2013. **28**: p. 170-81.
8. Hestad, K.A., et al., Raised plasma levels of tumor necrosis factor alpha in patients with depression: normalization during electroconvulsive therapy. *J ECT*, 2003. **19**(4): p. 183-8.
9. Fluitman, S.B., et al., Electroconvulsive therapy has acute immunological and neuroendocrine effects in patients with major depressive disorder. *J Affect Disord*, 2011. **131**(1-3): p. 388-92.
10. MacVicar, B.A. and R.J. Thompson, Non-junction functions of pannexin-1 channels. *Trends Neurosci*, 2010. **33**(2): p. 93-102.
11. Karatas, H., et al., Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science*, 2013. **339**(6123): p. 1092-5.
12. Sadek, A.R., G.E. Knight, and G. Burnstock, Electroconvulsive therapy: a novel hypothesis for the involvement of purinergic signalling. *Purinergic Signal*, 2011. **7**(4): p. 447-52.
13. Baghai, T.C. and H.J. Moller, Electroconvulsive therapy and its different indications. *Dialogues Clin Neurosci*, 2008. **10**(1): p. 105-17.
14. Fink, M., What was learned: studies by the consortium for research in ECT (CORE) 1997-2011. *Acta Psychiatr Scand*, 2014. **129**(6): p. 417-26.
15. Fink, M., The seizure, not electricity, is essential in convulsive therapy: the flurothyl experience. *J ECT*, 2014. **30**(2): p. 91-3.
16. Ende, G., et al., The hippocampus in patients treated with electroconvulsive therapy: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. *Arch Gen Psychiatry*, 2000. **57**(10): p. 937-43.
17. Zachrisson, O.C., et al., No evident neuronal damage after electroconvulsive therapy. *Psychiatry Res*, 2000. **96**(2): p. 157-65.
18. McClintock, S.M. and M.M. Husain, Electroconvulsive therapy does not damage the brain. *J Am Psychiatr Nurses Assoc*, 2011. **17**(3): p. 212-3.
19. Peterchev, A.V., et al., Electroconvulsive therapy stimulus parameters: rethinking dosage. *J ECT*, 2010. **26**(3): p. 159-74.

20. McCall, W.V., C. Andrade, and P. Sienaert, Searching for the mechanism(s) of ECT's therapeutic effect. *J ECT*, 2014. **30**(2): p. 87-9.
21. Kellner, C.H., et al., ECT in treatment-resistant depression. *Am J Psychiatry*, 2012. **169**(12): p. 1238-44.
22. Heninger, G.R., P.L. Delgado, and D.S. Charney, The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry*, 1996. **29**(1): p. 2-11.
23. Esel, E., et al., Effects of electroconvulsive therapy on hypothalamic-pituitary-thyroid axis activity in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2002. **26**(6): p. 1171-5.
24. Pfleiderer, B., et al., Effective electroconvulsive therapy reverses glutamate/glutamine deficit in the left anterior cingulum of unipolar depressed patients. *Psychiatry Res*, 2003. **122**(3): p. 185-92.
25. Taylor, M.A. and M. Fink, Restoring melancholia in the classification of mood disorders. *J Affect Disord*, 2008. **105**(1-3): p. 1-14.
26. Sackeim, H.A., The anticonvulsant hypothesis of the mechanisms of action of ECT: current status. *J ECT*, 1999. **15**(1): p. 5-26.
27. Henningsen, K., D.P. Woldbye, and O. Wiborg, Electroconvulsive stimulation reverses anhedonia and cognitive impairments in rats exposed to chronic mild stress. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2013. **23**(12): p. 1789-94.
28. Dyrvig, M., et al., Temporal gene expression profile after acute electroconvulsive stimulation in the rat. *Gene*, 2014. **539**(1): p. 8-14.
29. Zetterstrom, T.S., Q. Pei, and D.G. Grahame-Smith, Repeated electroconvulsive shock extends the duration of enhanced gene expression for BDNF in rat brain compared with a single administration. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998. **57**(1): p. 106-10.
30. Nibuya, M., S. Morinobu, and R.S. Duman, Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*, 1995. **15**(11): p. 7539-47.
31. Altar, C.A., et al., Effects of electroconvulsive seizures and antidepressant drugs on brain-derived neurotrophic factor protein in rat brain. *Biol Psychiatry*, 2003. **54**(7): p. 703-9.
32. Segawa, M., et al., Electroconvulsive seizure, but not imipramine, rapidly up-regulates pro-BDNF and t-PA, leading to mature BDNF production, in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2013. **16**(2): p. 339-50.
33. Balu, D.T., et al., Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and non-antidepressant drug treatments. *Brain Res*, 2008. **1211**: p. 37-43.
34. Russo-Neustadt, A.A., et al., Physical activity and antidepressant treatment potentiate the expression of specific brain-derived neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 2000. **101**(2): p. 305-12.
35. Duman, R.S. and L.M. Monteggia, A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*, 2006. **59**(12): p. 1116-27.
36. Krishnan, V. and E.J. Nestler, The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 2008. **455**(7215): p. 894-902.
37. Taliaz, D., et al., Altered brain-derived neurotrophic factor expression in the ventral tegmental area, but not in the hippocampus, is essential for antidepressant-like effects of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry*, 2013. **74**(4): p. 305-12.

38. De Foubert, G., et al., Fluoxetine-induced change in rat brain expression of brain-derived neurotrophic factor varies depending on length of treatment. *Neuroscience*, 2004. **128**(3): p. 597-604.
39. Nordgren, M., et al., Orchestrated regulation of Nogo receptors, LOTUS, AMPA receptors and BDNF in an ECT model suggests opening and closure of a window of synaptic plasticity. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e78778.
40. Hayakawa, H., et al., Single or repeated treatment with electroconvulsive shock increases number of serotonin uptake binding sites in the frontal cortex. *Neuropsychobiology*, 1995. **31**(1): p. 1-5.
41. Marano, C.M., et al., Increased plasma concentration of brain-derived neurotrophic factor with electroconvulsive therapy: a pilot study in patients with major depression. *J Clin Psychiatry*, 2007. **68**(4): p. 512-7.
42. Okamoto, T., et al., Efficacy of electroconvulsive therapy is associated with changing blood levels of homovanillic acid and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in refractory depressed patients: a pilot study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2008. **32**(5): p. 1185-90.
43. Fernandes, B., et al., Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is not associated with response to electroconvulsive therapy (ECT): a pilot study in drug resistant depressed patients. *Neurosci Lett*, 2009. **453**(3): p. 195-8.
44. Gronli, O., et al., Neurotrophic factors in serum following ECT: a pilot study. *World J Biol Psychiatry*, 2009. **10**(4): p. 295-301.
45. Lin, C.H., et al., Electroconvulsive therapy improves clinical manifestation with plasma BDNF levels unchanged in treatment-resistant depression patients. *Neuropsychobiology*, 2013. **68**(2): p. 110-5.
46. Newton, S.S., et al., Gene profile of electroconvulsive seizures: induction of neurotrophic and angiogenic factors. *J Neurosci*, 2003. **23**(34): p. 10841-51.
47. Segi-Nishida, E., J.L. Warner-Schmidt, and R.S. Duman, Electroconvulsive seizure and VEGF increase the proliferation of neural stem-like cells in rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(32): p. 11352-7.
48. Segi-Nishida, E., Exploration of new molecular mechanisms for antidepressant actions of electroconvulsive seizure. *Biol Pharm Bull*, 2011. **34**(7): p. 939-44.
49. Ito, M., et al., Effects of repeated electroconvulsive seizure on cell proliferation in the rat hippocampus. *Synapse*, 2010. **64**(11): p. 814-21.
50. Wennstrom, M., et al., Electroconvulsive seizures induce proliferation of NG2-expressing glial cells in adult rat hippocampus. *Biol Psychiatry*, 2003. **54**(10): p. 1015-24.
51. Newton, S.S., et al., Electroconvulsive seizure increases adult hippocampal angiogenesis in rats. *Eur J Neurosci*, 2006. **24**(3): p. 819-28.
52. Jorgensen, O.S. and T.G. Bolwig, Synaptic proteins after electroconvulsive stimulation. *Science*, 1979. **205**(4407): p. 705-7.
53. Chen, F., et al., Repeated electroconvulsive seizures increase the total number of synapses in adult male rat hippocampus. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2009. **19**(5): p. 329-38.
54. Vaidya, V.A., et al., Hippocampal mossy fiber sprouting induced by chronic electroconvulsive seizures. *Neuroscience*, 1999. **89**(1): p. 157-66.
55. Madsen, T.M., et al., Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry*, 2000. **47**(12): p. 1043-9.
56. Howren, M.B., D.M. Lamkin, and J. Suls, Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med*, 2009. **71**(2): p. 171-86.

57. Zhao, C., et al., Electroconvulsive seizure promotes spine maturation in newborn dentate granule cells in adult rat. *Dev Neurobiol*, 2012. **72**(6): p. 937-42.
58. Gibney, S.M. and H.A. Drexhage, Evidence for a dysregulated immune system in the etiology of psychiatric disorders. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013. **8**(4): p. 900-20.
59. Bufalino, C., et al., The role of immune genes in the association between depression and inflammation: a review of recent clinical studies. *Brain Behav Immun*, 2013. **31**: p. 31-47.
60. Wium-Andersen, M.K., et al., Elevated C-reactive protein levels, psychological distress, and depression in 73, 131 individuals. *JAMA Psychiatry*, 2013. **70**(2): p. 176-84.
61. Dowlati, Y., et al., A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*, 2010. **67**(5): p. 446-57.
62. Owen, B.M., et al., Raised levels of plasma interleukin-1beta in major and postviral depression. *Acta Psychiatr Scand*, 2001. **103**(3): p. 226-8.
63. Shelton, R.C., et al., Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression. *Mol Psychiatry*, 2011. **16**(7): p. 751-62.
64. Kenis, G., et al., Depressive symptoms following interferon-alpha therapy: mediated by immune-induced reductions in brain-derived neurotrophic factor? *Int J Neuropsychopharmacol*, 2011. **14**(2): p. 247-53.
65. Vinay Kumar, Abul K. Abbas, and N. Fausto, Robbins and Cotran pathologic basis of disease, Volume 1. Elsevier Saunders. Vol. Seventh Edition. 2005.
66. DiSabato, D.J., N. Quan, and J.P. Godbout, *Neuroinflammation: the devil is in the details*. *J Neurochem*, 2016. **139 Suppl 2**: p. 136-153.
67. Sochocka, M., B.S. Diniz, and J. Leszek, Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol*, 2016.
68. Norden, D.M. and J.P. Godbout, Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2013. **39**(1): p. 19-34.
69. Lawrence, T. and D.W. Gilroy, Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int J Exp Pathol*, 2007. **88**(2): p. 85-94.
70. Hannestad, J., et al., Citalopram reduces endotoxin-induced fatigue. *Brain Behav Immun*, 2011. **25**(2): p. 256-9.
71. Raison, C.L. and A.H. Miller, Role of inflammation in depression: implications for phenomenology, pathophysiology and treatment. *Mod Trends Pharmacopsychiatri*, 2013. **28**: p. 33-48.
72. Hannestad, J., N. DellaGioia, and M. Bloch, The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology*, 2011. **36**(12): p. 2452-9.
73. Hiles, S.A., et al., Interleukin-6, C-reactive protein and interleukin-10 after antidepressant treatment in people with depression: a meta-analysis. *Psychol Med*, 2012. **42**(10): p. 2015-26.
74. Lehtimäki, K., et al., Increase in plasma proinflammatory cytokines after electroconvulsive therapy in patients with depressive disorder. *J ECT*, 2008. **24**(1): p. 88-91.
75. Rotter, A., et al., Changes of cytokine profiles during electroconvulsive therapy in patients with major depression. *J ECT*, 2013. **29**(3): p. 162-9.
76. Zorrilla, E.P., et al., The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behav Immun*, 2001. **15**(3): p. 199-226.

77. Albrecht, J., et al., A controlled study of cellular immune function in affective disorders before and during somatic therapy. *Psychiatry Res*, 1985. **15**(3): p. 185-93.
78. Fischler, B., et al., Immune changes induced by electroconvulsive therapy (ECT). *Ann N Y Acad Sci*, 1992. **650**: p. 326-30.
79. van Buel, E.M., et al., Immune and neurotrophin stimulation by electroconvulsive therapy: is some inflammation needed after all? *Transl Psychiatry*, 2015. **5**: p. e609.
80. Roman, A., D. Nawrat, and I. Nalepa, Chronic treatment with electroconvulsive shock may modulate the immune function of macrophages. *J ECT*, 2008. **24**(4): p. 260-7.
81. Jansson, L., K. Orre, and A. Tingstrom, Repeated electroconvulsive seizures increase the number of vessel-associated macrophages in rat hippocampus. *J ECT*, 2012. **28**(3): p. 174-9.
82. Wennstrom, M., et al., Corticosterone-induced inhibition of gliogenesis in rat hippocampus is counteracted by electroconvulsive seizures. *Biol Psychiatry*, 2006. **59**(2): p. 178-86.
83. Jansson, L., et al., Glial cell activation in response to electroconvulsive seizures. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009. **33**(7): p. 1119-28.
84. Jinno, S. and T. Kosaka, Reduction of Iba1-expressing microglial process density in the hippocampus following electroconvulsive shock. *Exp Neurol*, 2008. **212**(2): p. 440-7.
85. Miller, A.H. and C.L. Raison, The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol*, 2016. **16**(1): p. 22-34.
86. Nguyen, K.T., et al., Exposure to acute stress induces brain interleukin-1beta protein in the rat. *J Neurosci*, 1998. **18**(6): p. 2239-46.
87. Johnson, J.D., et al., Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience*, 2005. **135**(4): p. 1295-307.
88. Koo, J.W. and R.S. Duman, IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(2): p. 751-6.
89. Goshen, I., et al., Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry*, 2008. **13**(7): p. 717-28.
90. Barrientos, R.M., et al., Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neuroscience*, 2003. **121**(4): p. 847-53.
91. Murray, E.A. and M. Mishkin, Object recognition and location memory in monkeys with excitotoxic lesions of the amygdala and hippocampus. *J Neurosci*, 1998. **18**(16): p. 6568-82.
92. Pugh, C.R., et al., Role of interleukin-1 beta in impairment of contextual fear conditioning caused by social isolation. *Behav Brain Res*, 1999. **106**(1-2): p. 109-18.
93. Koo, J.W., et al., Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(6): p. 2669-74.
94. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, 2002. **10**(2): p. 417-26.

95. Leemans, J.C., S.L. Cassel, and F.S. Sutterwala, *Sensing damage by the NLRP3 inflammasome*. Immunol Rev, 2011. **243**(1): p. 152-62.
96. Silverman, W.R., et al., The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. J Biol Chem, 2009. **284**(27): p. 18143-51.
97. Kanneganti, T.D., et al., Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. Immunity, 2007. **26**(4): p. 433-43.
98. Iwata, M., K.T. Ota, and R.S. Duman, The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. Brain Behav Immun, 2013. **31**: p. 105-14.
99. Wu, T.Y., et al., High-mobility group box-1 was released actively and involved in LPS induced depressive-like behavior. J Psychiatr Res, 2015. **64**: p. 99-106.
100. Weber, M.D., et al., Stress induces the danger-associated molecular pattern HMGB-1 in the hippocampus of male Sprague Dawley rats: a priming stimulus of microglia and the NLRP3 inflammasome. J Neurosci, 2015. **35**(1): p. 316-24.
101. Iwata, M., et al., Psychological Stress Activates the Inflammasome via Release of Adenosine Triphosphate and Stimulation of the Purinergic Type 2X7 Receptor. Biol Psychiatry, 2016. **80**(1): p. 12-22.
102. Alcocer-Gomez, E. and M.D. Cordero, NLRP3 inflammasome: a new target in major depressive disorder. CNS Neurosci Ther, 2014. **20**(3): p. 294-5.
103. Goshen, I., et al., A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. Psychoneuroendocrinology, 2007. **32**(8-10): p. 1106-15.
104. Fridmacher, V., et al., Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. J Neurosci, 2003. **23**(28): p. 9403-8.
105. Mattson, M.P. and M.K. Meffert, Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 852-60.
106. Camandola, S. and M.P. Mattson, NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. Expert Opin Ther Targets, 2007. **11**(2): p. 123-32.
107. Boersma, M.C., et al., A requirement for nuclear factor-kappaB in developmental and plasticity-associated synaptogenesis. J Neurosci, 2011. **31**(14): p. 5414-25.
108. Zhang, Y., et al., Nuclear factor kappa B signaling initiates early differentiation of neural stem cells. Stem Cells, 2012. **30**(3): p. 510-24.
109. Kohman, R.A. and J.S. Rhodes, Neurogenesis, inflammation and behavior. Brain Behav Immun, 2013. **27**(1): p. 22-32.
110. Goodwin, G.H. and E.W. Johns, Isolation and characterisation of two calf-thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids. Eur J Biochem, 1973. **40**(1): p. 215-9.
111. Andersson, U., D.J. Antoine, and K.J. Tracey, The functions of HMGB1 depend on molecular localization and post-translational modifications. J Intern Med, 2014. **276**(5): p. 420-4.
112. Calogero, S., et al., The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. Nat Genet, 1999. **22**(3): p. 276-80.
113. Scarpioni, R., M. Ricardi, and V. Albertazzi, Secondary amyloidosis in autoinflammatory diseases and the role of inflammation in renal damage. World J Nephrol, 2016. **5**(1): p. 66-75.

114. Castiglioni, A., et al., High-mobility group box 1 (HMGB1) as a master regulator of innate immunity. *Cell Tissue Res*, 2011. **343**(1): p. 189-99.
115. Kim, J.B., et al., HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *J Neurosci*, 2006. **26**(24): p. 6413-21.
116. Klune, J.R., T.R. Billiar, and A. Tsung, HMGB1 preconditioning: therapeutic application for a danger signal? *J Leukoc Biol*, 2008. **83**(3): p. 558-63.
117. Hayakawa, K., J. Qiu, and E.H. Lo, Biphasic actions of HMGB1 signaling in inflammation and recovery after stroke. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1207**: p. 50-7.
118. Maroso, M., et al., Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med*, 2010. **16**(4): p. 413-9.
119. Okuma, Y., et al., Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. *Ann Neurol*, 2012. **72**(3): p. 373-84.
120. Erlandsson Harris, H. and U. Andersson, Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(6): p. 1503-12.
121. Li, J., et al., Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol Med*, 2003. **9**(1-2): p. 37-45.
122. Antoine, D.J., et al., A systematic nomenclature for the redox states of high mobility group box (HMGB) proteins. *Mol Med*, 2014. **20**: p. 135-7.
123. Schiraldi, M., et al., HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med*, 2012. **209**(3): p. 551-63.
124. Yang, L., et al., Reactive oxygen species regulate the differentiation of acute promyelocytic leukemia cells through HMGB1-mediated autophagy. *Am J Cancer Res*, 2015. **5**(2): p. 714-25.
125. Frank, M.G., et al., Stress sounds the alarmin: The role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming. *Brain Behav Immun*, 2015. **48**: p. 1-7.
126. Lotze, M.T. and K.J. Tracey, High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(4): p. 331-42.
127. Lu, G.Z., J.J. Wang, and H. Sun, [The progress of HMGB1 research in viral diseases]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, 2014. **45**(4): p. 311-3.
128. Lu, B., et al., Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature*, 2012. **488**(7413): p. 670-4.
129. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 2002. **418**(6894): p. 191-5.
130. Kono, H. and K.L. Rock, How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(4): p. 279-89.
131. Klune, J.R., et al., HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med*, 2008. **14**(7-8): p. 476-84.
132. Yang, H., et al., The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol*, 2005. **78**(1): p. 1-8.
133. Hayakawa, K., et al., Astrocytic high-mobility group box 1 promotes endothelial progenitor cell-mediated neurovascular remodeling during stroke recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(19): p. 7505-10.
134. Li, M., et al., High-mobility group box 1 released from astrocytes promotes the proliferation of cultured neural stem/progenitor cells. *Int J Mol Med*, 2014. **34**(3): p. 705-14.

135. Muller, S., et al., New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J*, 2001. **20**(16): p. 4337-40.
136. Huttunen, H.J., et al., Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem*, 2000. **275**(51): p. 40096-105.
137. Agnello, D., et al., HMGB-1, a DNA-binding protein with cytokine activity, induces brain TNF and IL-6 production, and mediates anorexia and taste aversion. *Cytokine*, 2002. **18**(4): p. 231-6.
138. Goldstein, R.S., et al., Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia. *Shock*, 2006. **25**(6): p. 571-4.
139. Kim, J.B., et al., Induction and subcellular localization of high-mobility group box-1 (HMGB1) in the postischemic rat brain. *J Neurosci Res*, 2008. **86**(5): p. 1125-31.
140. Liu, F., et al., [High mobility group box-1 protein induces apoptosis in mouse peritoneal macrophages]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2007. **29**(4): p. 488-92.
141. Choy, M., et al., A novel, noninvasive, predictive epilepsy biomarker with clinical potential. *J Neurosci*, 2014. **34**(26): p. 8672-84.
142. Maroso, M., et al., Interleukin-1 type 1 receptor/Toll-like receptor signalling in epilepsy: the importance of IL-1beta and high-mobility group box 1. *J Intern Med*, 2011. **270**(4): p. 319-26.
143. Emanuele, E., et al., Increased serum levels of high mobility group box 1 protein in patients with autistic disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2010. **34**(4): p. 681-3.
144. Yasuhara, D., et al., High mobility group box 1 and refeeding-resistance in anorexia nervosa. *Mol Psychiatry*, 2007. **12**(11): p. 976-7.
145. Crews, F.T., et al., High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence. *Biol Psychiatry*, 2013. **73**(7): p. 602-12.
146. Blednov, Y.A., et al., Loss of ethanol conditioned taste aversion and motor stimulation in knockin mice with ethanol-insensitive alpha2-containing GABA(A) receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. **336**(1): p. 145-54.
147. Zou, J.Y. and F.T. Crews, Release of neuronal HMGB1 by ethanol through decreased HDAC activity activates brain neuroimmune signaling. *PLoS One*, 2014. **9**(2): p. e87915.
148. Zou, J. and F.T. Crews, Inflammasome-IL-1beta Signaling Mediates Ethanol Inhibition of Hippocampal Neurogenesis. *Front Neurosci*, 2012. **6**: p. 77.
149. Treutiger, C.J., et al., High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium. *J Intern Med*, 2003. **254**(4): p. 375-85.
150. Biscetti, F., et al., High-mobility group box-1 protein promotes angiogenesis after peripheral ischemia in diabetic mice through a VEGF-dependent mechanism. *Diabetes*, 2010. **59**(6): p. 1496-505.
151. Germani, A., F. Limana, and M.C. Capogrossi, Pivotal advances: high-mobility group box 1 protein--a cytokine with a role in cardiac repair. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(1): p. 41-5.
152. Hayakawa, K., et al., High-mobility group box 1 from reactive astrocytes enhances the accumulation of endothelial progenitor cells in damaged white matter. *J Neurochem*, 2013. **125**(2): p. 273-80.
153. Lei, C., et al., HMGB1 may act via RAGE to promote angiogenesis in the later phase after intracerebral hemorrhage. *Neuroscience*, 2015. **295**: p. 39-47.

154. Hayakawa, S., T. Tsujinaka, and A. Fujihara, Dissociation mechanisms of excited CH₃X (X = Cl, Br, and I) formed via high-energy electron transfer using alkali metal targets. *J Chem Phys*, 2012. **137**(18): p. 184308.
155. Faraco, G., et al., High mobility group box 1 protein is released by neural cells upon different stresses and worsens ischemic neurodegeneration in vitro and in vivo. *J Neurochem*, 2007. **103**(2): p. 590-603.
156. Luo, L., et al., Glycyrrhizin suppresses HMGB1 inductions in the hippocampus and subsequent accumulation in serum of a kainic acid-induced seizure mouse model. *Cell Mol Neurobiol*, 2014. **34**(7): p. 987-97.
157. Takizawa, T., et al., Temporal profiles of high-mobility group box 1 expression levels after cortical spreading depression in mice. *Cephalalgia*, 2016. **36**(1): p. 44-52.
158. Panchin, Y., et al., A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol*, 2000. **10**(13): p. R473-4.
159. Baranova, A., et al., The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*, 2004. **83**(4): p. 706-16.
160. Boassa, D., et al., Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. *J Biol Chem*, 2007. **282**(43): p. 31733-43.
161. Sandilos, J.K. and D.A. Bayliss, Physiological mechanisms for the modulation of pannexin 1 channel activity. *J Physiol*, 2012. **590**(24): p. 6257-66.
162. Bond, S.R. and C.C. Naus, The pannexins: past and present. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 58.
163. Ray, A., et al., Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system. *Eur J Neurosci*, 2005. **21**(12): p. 3277-90.
164. Zappala, A., et al., Expression of pannexin1 in the CNS of adult mouse: cellular localization and effect of 4-aminopyridine-induced seizures. *Neuroscience*, 2006. **141**(1): p. 167-78.
165. Zoidl, G., et al., Localization of the pannexin1 protein at postsynaptic sites in the cerebral cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 2007. **146**(1): p. 9-16.
166. Rigato, C., et al., Microglia proliferation is controlled by P2X7 receptors in a Pannexin-1-independent manner during early embryonic spinal cord invasion. *J Neurosci*, 2012. **32**(34): p. 11559-73.
167. Cone, A.C., et al., A comparative antibody analysis of pannexin1 expression in four rat brain regions reveals varying subcellular localizations. *Front Pharmacol*, 2013. **4**: p. 6.
168. Prochnow, N., et al., Pannexin1 stabilizes synaptic plasticity and is needed for learning. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e51767.
169. Bhalla-Gehi, R., et al., Pannexin1 and pannexin3 delivery, cell surface dynamics, and cytoskeletal interactions. *J Biol Chem*, 2010. **285**(12): p. 9147-60.
170. Bruzzone, R., et al., Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(23): p. 13644-9.
171. Chekeni, F.B., et al., Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*, 2010. **467**(7317): p. 863-7.
172. Locovei, S., L. Bao, and G. Dahl, Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(20): p. 7655-9.
173. Orellana, J.A., A.D. Martinez, and M.A. Retamal, Gap junction channels and hemichannels in the CNS: regulation by signaling molecules. *Neuropharmacology*, 2013. **75**: p. 567-82.

174. Zhang, M., et al., P2Y2 receptor activation opens pannexin-1 channels in rat carotid body type II cells: potential role in amplifying the neurotransmitter ATP. *J Physiol*, 2012. **590**(17): p. 4335-50.
175. Pelegrin, P. and A. Surprenant, Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J*, 2006. **25**(21): p. 5071-82.
176. Iglesias, R., et al., P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. **295**(3): p. C752-60.
177. Qiu, F. and G. Dahl, A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **296**(2): p. C250-5.
178. Wang, J., et al., Modulation of membrane channel currents by gap junction protein mimetic peptides: size matters. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **293**(3): p. C1112-9.
179. Barbe, M.T., H. Monyer, and R. Bruzzone, Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology (Bethesda)*, 2006. **21**: p. 103-14.
180. Billaud, M., et al., Pannexin1 regulates α 1-adrenergic receptor- mediated vasoconstriction. *Circ Res*, 2011. **109**(1): p. 80-5.
181. Seminario-Vidal, L., et al., Rho signaling regulates pannexin 1-mediated ATP release from airway epithelia. *J Biol Chem*, 2011. **286**(30): p. 26277-86.
182. Lai, C.P., et al., Tumor-suppressive effects of pannexin 1 in C6 glioma cells. *Cancer Res*, 2007. **67**(4): p. 1545-54.
183. Thompson, R.J., N. Zhou, and B.A. MacVicar, Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science*, 2006. **312**(5775): p. 924-7.
184. Santiago, M.F., et al., Targeting pannexin1 improves seizure outcome. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e25178.
185. Domercq, M., et al., P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes. *Glia*, 2010. **58**(6): p. 730-40.
186. Bargiotas, P., et al., Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(51): p. 20772-7.
187. Dvorianchikova, G., et al., Genetic ablation of Pannexin1 protects retinal neurons from ischemic injury. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e31991.
188. Jiang, T., et al., Effects of transcranial direct current stimulation on hemichannel pannexin-1 and neural plasticity in rat model of cerebral infarction. *Neuroscience*, 2012. **226**: p. 421-6.
189. Weiling, N.L., P.L. Tang, and R.J. Thompson, Anoxia-induced NMDA receptor activation opens pannexin channels via Src family kinases. *J Neurosci*, 2012. **32**(36): p. 12579-88.
190. Makarenkova, H.P. and V.I. Shestopalov, The role of pannexin hemichannels in inflammation and regeneration. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 63.
191. Ardiles, A.O., et al., Pannexin 1 regulates bidirectional hippocampal synaptic plasticity in adult mice. *Front Cell Neurosci*, 2014. **8**: p. 326.
192. Vroman, R., et al., Extracellular ATP hydrolysis inhibits synaptic transmission by increasing pH buffering in the synaptic cleft. *PLoS Biol*, 2014. **12**(5): p. e1001864.
193. Lecoeur, H., Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. *Exp Cell Res*, 2002. **277**(1): p. 1-14.
194. Steru, L., et al., The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985. **85**(3): p. 367-70.

195. Porsolt, R.D., et al., Use of the automated tail suspension test for the primary screening of psychotropic agents. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1987. **288**(1): p. 11-30.
196. Can, A., et al., *The tail suspension test*. *J Vis Exp*, 2012(59): p. e3769.
197. Willner, P., et al., Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987. **93**(3): p. 358-64.
198. Papp, M., P. Willner, and R. Muscat, An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology (Berl)*, 1991. **104**(2): p. 255-9.
199. Morawska, M.M. and M. Fendt, The effects of muscimol and AMN082 injections into the medial prefrontal cortex on the expression and extinction of conditioned fear in mice. *The Journal of Experimental Biology*, 2012. **215**(8): p. 1394-1398.
200. Penuela, S., R. Gehi, and D.W. Laird, The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1828**(1): p. 15-22.
201. Wolfson, R.K., B. Mapes, and J.G. Garcia, Excessive mechanical stress increases HMGB1 expression in human lung microvascular endothelial cells via STAT3. *Microvasc Res*, 2014. **92**: p. 50-5.
202. O'Donovan, S., et al., Effects of brief pulse and ultrabrief pulse electroconvulsive stimulation on rodent brain and behaviour in the corticosterone model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2014. **17**(9): p. 1477-86.
203. Sartorius, A., et al., Correlations and discrepancies between serum and brain tissue levels of neurotrophins after electroconvulsive treatment in rats. *Pharmacopsychiatry*, 2009. **42**(6): p. 270-6.
204. Browning, R.A. and D.K. Nelson, Variation in threshold and pattern of electroshock-induced seizures in rats depending on site of stimulation. *Life Sci*, 1985. **37**(23): p. 2205-11.
205. Lanz, T.A., et al., Robust changes in expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein across the brain do not translate to detectable changes in BDNF levels in CSF or plasma. *Biomarkers*, 2012. **17**(6): p. 524-31.
206. Wohleb, E.S., et al., Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. *Nat Rev Neurosci*, 2016. **17**(8): p. 497-511.
207. Castren, E. and T. Rantamaki, The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol*, 2010. **70**(5): p. 289-97.
208. Kahl, S.E., F.C. Martin, and A. Handforth, Vagus nerve stimulation inhibits harmaline-induced tremor. *Brain Res*, 2004. **1011**(1): p. 135-8.
209. Li, B., et al., Repeated electroconvulsive stimuli have long-lasting effects on hippocampal BDNF and decrease immobility time in the rat forced swim test. *Life Sci*, 2007. **80**(16): p. 1539-43.
210. O'Donovan, S., et al., A comparison of brief pulse and ultrabrief pulse electroconvulsive stimulation on rodent brain and behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2012. **37**(1): p. 147-52.
211. Kawashima, K., et al., Amygdaloid catecholaminergic mechanisms involved in suppressive effects of electroconvulsive shock on duration of immobility in rats forced to swim. *Eur J Pharmacol*, 1987. **141**(1): p. 1-6.

212. Christiansen, S.H. and D.P. Woldbye, Regulation of the galanin system by repeated electroconvulsive seizures in mice. *J Neurosci Res*, 2010. **88**(16): p. 3635-43.
213. Luo, J., et al., Propofol interacts with stimulus intensities of electroconvulsive shock to regulate behavior and hippocampal BDNF in a rat model of depression. *Psychiatry Res*, 2012. **198**(2): p. 300-6.
214. Luo, J., et al., Behavioral and molecular responses to electroconvulsive shock differ between genetic and environmental rat models of depression. *Psychiatry Res*, 2015. **226**(2-3): p. 451-60.
215. van Buel, E.M., et al., Electroconvulsive seizures (ECS) do not prevent LPS-induced behavioral alterations and microglial activation. *J Neuroinflammation*, 2015. **12**: p. 232.
216. Polyakova, M., et al., Brain-Derived Neurotrophic Factor and Antidepressive Effect of Electroconvulsive Therapy: Systematic Review and Meta-Analyses of the Preclinical and Clinical Literature. *PLoS One*, 2015. **10**(11): p. e0141564.
217. Eyre, H. and B.T. Baune, Neuroplastic changes in depression: a role for the immune system. *Psychoneuroendocrinology*, 2012. **37**(9): p. 1397-416.
218. Piras, S., et al., RAGE Expression and ROS Generation in Neurons: Differentiation versus Damage. *Oxid Med Cell Longev*, 2016. **2016**: p. 9348651.
219. Bianchi, M.E. and A.A. Manfredi, High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, 2007. **220**: p. 35-46.
220. Zhang, H.N. and M.C. Ko, Seizure activity involved in the up-regulation of BDNF mRNA expression by activation of central mu opioid receptors. *Neuroscience*, 2009. **161**(1): p. 301-10.
221. Binder, D.K., et al., BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci*, 2001. **24**(1): p. 47-53.
222. Sathanoori, M., et al., Differential regulation of multiple brain-derived neurotrophic factor transcripts in the postnatal and adult rat hippocampus during development, and in response to kainate administration. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004. **130**(1-2): p. 170-7.
223. Dias, B.G., et al., Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology*, 2003. **45**(4): p. 553-63.
224. Schulte-Herbruggen, O., et al., Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. *J Neuroimmunol*, 2005. **160**(1-2): p. 204-9.
225. Bayas, A., et al., Modulation of cytokine mRNA expression by brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in human immune cells. *Neurosci Lett*, 2003. **335**(3): p. 155-8.
226. Warner-Schmidt, J.L., et al., Antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are attenuated by antiinflammatory drugs in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(22): p. 9262-7.
227. Gallagher, P.J., et al., Antidepressant response in patients with major depression exposed to NSAIDs: a pharmacovigilance study. *Am J Psychiatry*, 2012. **169**(10): p. 1065-72.
228. Guloksuz, S., et al., The immune system and electroconvulsive therapy for depression. *J ECT*, 2014. **30**(2): p. 132-7.
229. McClintock, S.M., et al., Multifactorial determinants of the neurocognitive effects of electroconvulsive therapy. *J ECT*, 2014. **30**(2): p. 165-76.

- 230. Rao, S.K., et al., Memory protective effect of indomethacin against electroconvulsive shock-induced retrograde amnesia in rats. *Biol Psychiatry*, 2002. **51**(9): p. 770-3.
- 231. Andrade, C., et al., Celecoxib as an in vivo probe of cyclooxygenase-2 mechanisms underlying retrograde amnesia in an animal model of ECT. *J Neural Transm (Vienna)*, 2008. **115**(7): p. 1063-70.
- 232. Zhu, L., et al., HMGB1-RAGE signaling pathway in severe preeclampsia. *Placenta*, 2015. **36**(10): p. 1148-52.



8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzini



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 312 310 1090-1082 - Faks: 0 312 310 3583
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hk.html

Sayı: 52338575-130

15 Ekim 2013

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 12.11.2013 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2013/09
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2013/59
KARAR NUMARASI	: 2013/59-06
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Yrd.Doç.Dr.Emine Eren KOÇAK
HAYVAN DENEYLERİNDEN	
SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Zümrüt Duygu ŞEN, Dr. Buket DEMİR
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: *
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 270 Adet Swiss Albino Fare

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr.Emine Eren KOÇAK'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2013/59 kayıt numaralı "*Elektrokonvülsif Nöbetlerin Farelerde Pannexin Kanalları Üzerindeki Olası Etkisi ve Bu Etkinin Doğurduğu Sonuçların İncelenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.


Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

9. ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Zümrüt Duygu Şen

Doğum yeri ve yılı: Keşan, 1986

Uyruğu:Türkiye

Adres: ParkOran Sitesi A2 blok 95 Numara, Ankara

e-mail: zumrutduygusen@gmail.com

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı (2011-2017)

Hacettepe Üniveristesi Tıp Fakültesi (2004-2010)

Ankara Fen Lisesi (2001-2004)

III- Mesleki Deneyimi

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı (2011-2017)

IV- Bilimsel Faaliyetleri

Yayınları: Karatas H, Erdener SE, Gursoy-OzdemirY, Lule S,Eren-Koçak E, Sen ZD, Dalkara T Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels (2013) Science. 339:1092-5

Ayhan Y, **Sen ZD**. Neurobiology of Bipolar Affective Disorder: Recent Findings on Cell and Animal Studies (2013) **Türkiye Klinikleri J Psychiatry-Special Topics. 6(2):14-24**

Aldığı burslar/ödülleri: Türkiye Psikiyatri Derneği Araştırma Teşvik Ödülü 2016