

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**RATLARDA GLİSERİL TRİNİTRAT İLE OLUŞTURULAN
MİGREN MODELİNDE RİBOFLAVİN/E VİTAMİNİNİN
BEYİN KALSİYUM, Ca^{+2} ATPAZ VE NMDA
RESEPTÖRLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Ayşe BÜTÜN

**NÖROLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Serpil DEMİRCİ**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
1595-TU-07 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

ISPARTA – 2009

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamın tüm aşamalarında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, literatürde çok fazla araştırılmamış bu özgün konuyu seçerek, çalışmam için bana veren, çalışmanın deseninin oluşturulması ve sonuçların yorumlanmasında bana yol gösteren Doç. Dr. Serpil Demirci'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca bana emeği geçen değerli hocalarım Doç. Dr. Süleyman Kutluhan, Doç. Dr. H. Rifat Koyuncuoğlu ve Yrd. Doç. Dr. V. Ali Yürekli'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Biyofizik A.D. başkanı Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu ve çalışma arkadaşlarına, Biyokimya A.D.'dan Doç. Dr. Recep Sütçü'ye, Dr. Betül Mermi'ye ve Dr. Yusuf Kara'ya teşekkür ederim.

Çalışmada kullanılan riboflavini sağlayan Eczacıbaşı İlaç A.Ş.'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince benimle her türlü zorluğu paylaşan asistan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bu süreçte bir ekip olarak çalıştığım, sevgili hemşire ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca zor zamanlarımda yanımda olan sevgili eşime ve hayatımın her anında desteklerini hep yanımda hissettiğim sevgili anne ve babama sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Migren Tanımı	3
2.2. Migrenin Epidemiyolojisi	4
2.3. Migren Tipleri	5
2.4. Migrenin Tedavisi	6
2.5. Migrenin Patofizyolojisi	7
2.5.1. Migren Patofizyolojisinde Kalsiyumun Rolü	10
2.5.2. Migren ve NMDA Reseptörleri	11
2.5.3. Migren ve Nitrik Oksit.....	13
2.6. Riboflavin	16
2.7. E Vitamini	18
2.8. Beyin Kalsiyum Homeostazı	18
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. Deney Hayvanları	20
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması	20
3.2.1. Anestezi ve Gerekli Materyaller	20
3.3. Metod	21
3.3.1. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu	21
3.3.2. SDS-PAGE Yöntemi	21
3.3.3. Western Blot Yöntemi	21
3.3.4. Mikrozoamların İzolasyonu.....	21
3.3.5. Mikrozomal Ca ²⁺ -ATPaz Aktivitesinin Ölçümü	22
3.3.6. Total Beyin Kalsiyum Düzeyinin Ölçümü	23
3.4. İstatiksel Analizler	23
4. BULGULAR.....	24

5. TARTIŞMA	28
ÖZET	33
ABSTRACT	34
KAYNAKLAR	35
EK-1	44

KISALTMALAR

AHM	: Ailesel Hemiplejik Migren
AMPA	: α -Amino-3-hidroksi-5-methylisoksazol
ATP	: Adenozin Trifosfat
5-HT	: 5-hidroksi triptamin
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
[Ca⁺²]_i	: Hücre içi Ca ⁺²
[Ca⁺²]_o	: Hücre dışı Ca ⁺²
cGMP	: Siklik guanozin monofosfatdaki
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FMN	: Flavin mononükleotid
GTN	: Gliseril trinitrat
H⁺	: Hidrojen iyonları
IHS	: Uluslararası Başağrısı Derneği
K⁺	: Potasyum iyonları
KGİP	: Kalsiyum geni ile ilişkili protein
KYD	: Kortikal yayılan depresyon
mGluRs	: Metabotropik glutamat reseptörleri
NMDA	: N-metil D-aspartat
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NSAI	: Nonsteroid antiinflamatuvarlar
NTG	: Nitrogliserin
PAG	: Periakuaduktal gri cevher
PMCA	: Plazma-membran Ca ⁺² -ATPaz
RBF	: Riboflavin
ROM	: Reaktif oksijen molekülleri
SERCA	: Sarko(endo)plazmik retikulum kalsiyum ATP az
TNK	: Trigeminal nükleus kaudalis
TVS	: Trigeminoasküler sistem
VKKK	: Voltaj kapılı kalsiyum kanalları
WDR	: Wide dynamic range

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Migren prodrom döneminde karşılaşılabilecek semptomlar	3
Tablo 2. 2003 IHS Migren Sınıflaması.....	5
Tablo 3. Migrende profilaktik tedavi	6
Tablo 4. Nitrik oksidin indüklediği serebral vazodilatasyonda olaylar zinciri.....	13
Tablo 5. Kortikal yayılan depresyonda nöronal olaylar zinciri	14
Tablo 6. Verilerin karşılaştırılması	24

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Migren başağrısının mekanizmaları	8
Şekil 2. KYD ve auralı migrendeki patofizyolojik olaylar	9
Şekil 3. Trigeminal nükleer komplekste VKKK'larının lokalizasyon ve relatif öneminin hipotetik modeli	11
Şekil 4. Glutamat reseptörlerinin şematik görüntüsü.....	12
Şekil 5. Beyin dokusunda NO yolu	14
Şekil 6. NO aracılı nörotoksitenin mekanizması.....	15
Şekil 7. NO aracılı nörodejenerasyon	15
Şekil 8. Mitokondriyal elektron transport zincirinde riboflavinin yeri.....	17
Şekil 9. Hücre içi kalsiyum sinyallerinin oluşumu	19
Şekil 10. Beyin total kalsiyum seviyeleri. Grafikte ortalama değerler ve standart sapmalar verilmiştir	24
Şekil 11. Rat beyinde PMCA seviyeleri. Grafikte ortalama değerler ve standart sapmalar verilmiştir	25
Şekil 12. Rat hipokampal NR2A seviyeleri. Grafikte ortalama değerler ve standart sapmalar verilmiştir	26
Şekil 13. Rat hipokampal NR2B seviyeleri. Grafikte ortalama değerler ve standart sapmalar verilmiştir	27

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Migren genel populasyonun %10'undan daha fazlasını etkileyen epizodik bir başağrısı hastalığıdır ve trigeminovasküler sistemin sensitizasyon ve aktivasyonuna yol açan primer beyin disfonksiyonundan kaynaklanır (1). Trigeminovasküler sistemin aktivasyonu, vazoaaktif nöropeptidlerin salınımıyla perivasküler trigeminal duyuşal afferentleri uyarır ve santral nosiseptif bilginin oluşmasıyla sonuçlanır (2).

Trigeminovasküler nöronlarda presinaptik olarak bulunan P/Q-, N- ve L-tipi kalsiyum kanallarının blokajı kalsiyum geni ile ilişkili protein (KGİP) salınımını ve dolayısıyla dural kan damarlarındaki dilatasyonu engeller. Bu bilgi P/Q-, N- ve L-tipi kalsiyum kanallarının trigeminovasküler nosisepsiyonda etkili olabileceğini düşündürmektedir (3). Klinik gözlemler ve genetik çalışmalar migren patogeneğinde yüksek eşikli voltaj kapılı kalsiyum kanallarının (VKKK) önemli rol oynadığını düşündürmektedir (4,5,6).

VKKK'ları hücre içine Ca^{+2} girişiyle indüklenen depolarizasyonda aracıdır (7). Birçok hücreşel fonksiyon serbest sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonuyla direkt ya da indirekt olarak düzenlenir (8). Hücre içi kalsiyum düzeyleri denge durumunda plazma-membran Ca^{+2} -ATPaz (PMCA) ve Na^{+}/Ca^{+} değiştiriciler ile sürdürülür. VKKK'ları aracılığıyla hücre içine kalsiyum akımının nörotransmitter salınımından sorumlu olduğu düşünülür (3). Nöronal teoriye göre kortikal yayılan depresyon (KYD) migrenöz aura ile patofizyolojik olarak koreledir (9). N-metil-D aspartat (NMDA) reseptörleri KYD'un oluşması ve yayılmasında etkilidir (10). Glial hücre kültürlerinde NMDA reseptörlerinin lokal olarak uyarılması, hücre içi Ca^{+2} artış dalgasıyla sonuçlanır ve bu dalga yayılan depresyona benzer bir hızda yayılır. KYD süresince hücre dışı K^{+} artarken, hücre dışı Cl^{-} , Na^{+} ve Ca^{+2} seviyelerinde belirgin azalma olur. Kortikal yayılan depresyonun patogeneğinde Ca^{+2} iyon dalgasının primer rol oynadığı düşünölmektedir(11).

Riboflavinin temel kullanım alanı migren başağrılarının önlenmesidir (12,13). Preklinik çalışmalarda riboflavinin farelerde ağrıyı azaltabildiğı bildirilmiştir (14). Riboflavin mitokondriyal elektron transport zincirindeki birkaç flavoproteinin koenzimi olarak görev alan, suda eriyen bir vitamindir (15). Migrendeki yararlı etkisini kompleks

I ve II aktivitesini ve mitokondriyal enerji metabolizmasını artırarak oluşturduğu düşünülür (13,16). Ancak bu nokta halen tartışmalıdır (17).

E vitamini antioksidan bir vitamin olup yapısında bulunan hidrojen iyonlarını serbest hidroksil radikallerine vererek zararsız ürünlere dönüştürmektedir. Tokoferol ve tokotrienol başlıkları altında 8 izomeri bulunmaktadır (18). Ayrıca, E vitamininin katyon kanalları ve kalsiyum metabolizması üzerinde düzenleyici etkileri bulunmaktadır (19,20). E vitamini Spinocerebellar dejenerasyon, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı gibi dejeneratif nörolojik hastalıkların patogenezinde rol almaktadır. Diyabet, kalp-damar hastalıkları gibi sistemik hastalıklarla (20) epilepsi ve depresyon gibi nörolojik hastalıklarda (19) faydalı etkilerinin olduğu iyi bilinmesine rağmen migren proflaksisi üzerindeki etkileri kesin olarak bilinmemektedir.

Literatürde migren tedavisinde riboflavin ve E Vitamininin beyin kalsiyum homeostazı üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada amaç; migren modeli oluşturulmuş ratlarda riboflavin ve E vitamininin beyin total kalsiyum düzeyi, Ca⁺²-ATPaz düzeyi ve NMDA reseptörleri üzerine etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Migren Tanımı

Migren sık görülen, nörolojik, gastrointestinal ve otonom değişikliklerin çeşitli kombinasyonlarda eşlik ettiği primer, epizodik bir başağrısı bozukluğudur. Tek bir klinik durum değildir. Çoğu zaman bulantı-kusma ve ışık hassasiyeti eşlik eder (21). Dünya Sağlık Örgütü tarafından yeti yitimine neden olan hastalıklar arasında 19. sıraya yerleştirilmiştir.

Migrende ağrı ataklar halinde gelir. Klasik bir atak dört evreden oluşur.

1. Prodrom evresi
2. Aura evresi
3. Başağrısı evresi
4. Postdrom evresi

Ağrıdan önceki saatler, hatta bazı kişilerde günler içinde yavaşça gelişen bazı semptomlar prodrom dönemini oluştururlar. Prodrom dönemi migrenli hastaların yaklaşık %40-60'ında mevcuttur.

Tablo 1. Migren prodrom döneminde karşılaşılabilecek semptomlar

Nöro-psikolojik semptomlar <ul style="list-style-type: none">• Aşırı duyarlılık-tepkisellik, depresif duygu durumu• Öfori, nadiren hiperaktivite• Durgunluk/donukluk, konsantrasyon ve dikkatte azalma• Kelime bulmada güçlük, konuşurken takılma• Artmış ışık, ses, koku duyarlılığı• Esneme, uyuma isteği
Sistemik/otonom semptomlar <ul style="list-style-type: none">• Ense sertliği• Halsizlik• Açlık, tatlı yeme isteği, iştah artışı veya iştahsızlık• Aşırı su içme, sık idrara çıkma• Karında şişlik hissi, kabızlık veya ishal hali

Aura dönemi, auralı migreni ve başağrısız aurası olan kişilerde görülmektedir. Aura dönemi genellikle, varsa prodrom döneminin sonrasında ve ağrı döneminin öncesinde ortaya çıkmaktadır. Aura döneminde kortikal veya beyin sapı disfonksiyonuyla uyumlu semptomlar görülür. Aura semptomları 5-20 dakika içinde gelişmekte ve genellikle süre 60 dakikayı geçmemektedir. Birden fazla aura semptomu varsa bu süre uzayabilmektedir. Aura görsel, duyuşsal veya motor fenomenler şeklinde olabilir ve bazen dil veya beyin sapı işlevlerini de etkileyebilir. Görsel auralar çoğunlukla hemianopik özellikte olup pozitif ve negatif semptomlar olarak değerlendirilmektedirler (22). Pozitif semptomlar basit ışık çakmaları (fotopsi), görme alanının ortasından başlayıp kenara doğru ilerleyen zigzag/kırık çizgiler (takopsiya veya fortifikasyon spektrumu) şeklindedir. Negatif semptomlar ise hemianopik görme alanı defektleri ya da skotomlar şeklindedir. Görsel aura semptomlarının oksipital lob-görme korteksinin disfonksiyonu sonucu geliştiği ve kortikal yayılan depresyonun başlangıç dönemiyle uyumlu olduğu düşünülür. Paresteziler, ikinci sıklıkta görülen aura tipleridir. "Digitolingual" veya "cherio-oral"parestezi olarak adlandırılan tipik somatosensoryel aurada tek taraflı olarak kişinin el parmaklarından başlayıp kola doğru yayılan ve çoğu zaman aynı tarafta burun ve ağız çevresini etkileyen uyuşukluk ve karıncalanma hissi ortaya çıkmaktadır. Motor semptomlar, konuşma bozuklukları, afazi, baş dönmesi ve nadir olmakla birlikte işitsel ve koku halüsinasyonları da aura semptomları arasında sayılabilir (23).

Migren başağrıları genellikle unilateral, zonklayıcı, şiddetli, fiziksel aktivite ile artan ağrılardır. Ağrı döneminde ağrıya eşlik eden başlıca belirtiler bulantı, kusma, anoreksi, fotofobi ve fonofobidir. Başağrısı genellikle sabah uyanırken başlar ve geçen süre içerisinde kademeli olarak artarak en şiddetli seviyesine ulaşır. Başağrısının ortalama süresi 4-72 saattir.

Ağrı, yorgunluk, bitkinlik, bezginlik hisleriyle birlikte kaybolurken yerini rahatlama hissi alır. Bu dönem prodrom dönemi adını alır. Prodrom dönemi genellikle kişinin kendini iyi hissettiği bir dönemdir.

2.2. Migrenin Epidemiyolojisi

Migren daha çok kadınlarda ve genç erişkinlerde görülen bir durumdur. Migrenli hastaların çoğunda bu durum 40 yaş civarında ortaya çıkmaktadır ve erkek

hastalarda kadınlardan daha önce ortaya çıkmaya eğilimlidir. Kadınların yaklaşık %18'i migrenden yakınıdır. Erkek/kadın oranı hemen hemen 1/3'dür (21).

2.3. Migren Tipleri

İlk başağrısı sınıflaması Ad-Hoc Committee tarafından 1962 yılında yapılmıştır (24). Bu sınıflamanın yetersizliği nedeniyle Olessen'in başkanlığında oluşturulan "Uluslararası Başağrısı Derneği" (IHS) 1988 yılında tüm başağrılarını içeren sınıflamayı ve tanı ölçütlerini yayınlamıştır (25). IHS 1988 sınıflamasının özellikle yeni tanımlanan bazı başağrılarını içermemesi ve yetersiz kalması nedeniyle 2003 yılında IHS yeni bir sınıflama ve tanı ölçütleri kılavuzu yayınlamıştır.

Tablo 2. 2003 IHS Migren Sınıflaması

1.1 Aurasız migren

1.2 Auralı migren

1.2.1 Tipik auralı migren

1.2.2 Tipik auralı migren dışı başağrısı

1.2.3 Başağrısız tipik aura

1.2.4 Ailesel hemiplejik migren

1.2.5 Sporadik hemiplejik migren

1.2.6 Baziller migren

1.3 Migrenin sıklıkla öncüsü olan çocukluk çağının periyodik sendromları

1.3.1 Periyodik kusma

1.3.2 Abdominal migren

1.3.3 Çocukluk çağının benign paroksizmal vertigosu

1.4 Retinal migren

1.5 Migrenin komplikasyonları

1.5.1 Kronik migren

1.5.2 Migren statusu

1.5.3 İnfarktsız persistan aura

1.5.4 Migrenöz infarkt

1.5.5 Migrenin tetiklediği nöbet

1.6 Olası Migren

1.6.1 Aurasız olası migren

1.6.2 Auralı olası migren

1.6.3 Olası kronik migren

IHS 2003 migren tanı ölçütleri kılavuzu EK 1’de sunulmuştur.

2.4. Migrenin Tedavisi

Migren tedavisi, atakları önlemek için uygulanan profilaktik tedavi ve ataktaki ağrı, bulantı ve kusmayı gidermek için uygulanan akut atak tedavisi olarak iki aşamadan oluşur.

Bir atak başladığında akut atak tedavisine mümkün olduğunca erken başlanmalıdır. Akut farmakolojik tedavide sık kullanılan ilaçlar, antiemetikler, barbitürat hipnotikler, ergot alkaloidleri ve deriveleri, nonsteroid antiinflamatuvarlar (NSAI), opioidler ve 5HT_{1B/1D} serotonin reseptör agonistleri (triptanlar)’dir.

Migren atakları ayda 2’den daha fazla ortaya çıktığında ya da daha az sıklıkta fakat uzun süreli veya engelleyici iseler profilaktik tedavi başlanmalıdır. Profilaktik tedavide kullanılan ilaç grupları tablo 3’de listelenmiştir.

Tablo 3. Migrende profilaktik tedavi

Antikonvülzanlar
Beta adrenerjik blokörler
Antidepresanlar
Kalsiyum kanal blokörleri
Serotonerjik ajanlar
Botulinum toksin tip A enjeksiyonları
Riboflavin
Magnezyum

Bozulmuş oksijen metabolizması ve mitokondriyal disfonksiyon migren patogenezinde rol alıyor olabilir. Riboflavin, flavin adenin dinükleotid (FAD) ve flavin mononükleotid (FMN)'in öncülüdür ve mitokondriyal elektron transport zincirinde flavoenzimlerin kofaktörü olarak görev alır. Göreceli olarak az sayıda hastanın katıldığı prospektif, randomize kontrollü bir çalışmada oral olarak günde 400 mg verilen riboflavinin migren profilaksisinde etkili olduğu gösterilmiştir (13). Riboflavin yüksek etkinliği, iyi tolere edilmesi ve ucuz olması nedeniyle migren profilaksisi için iyi bir seçenektir.

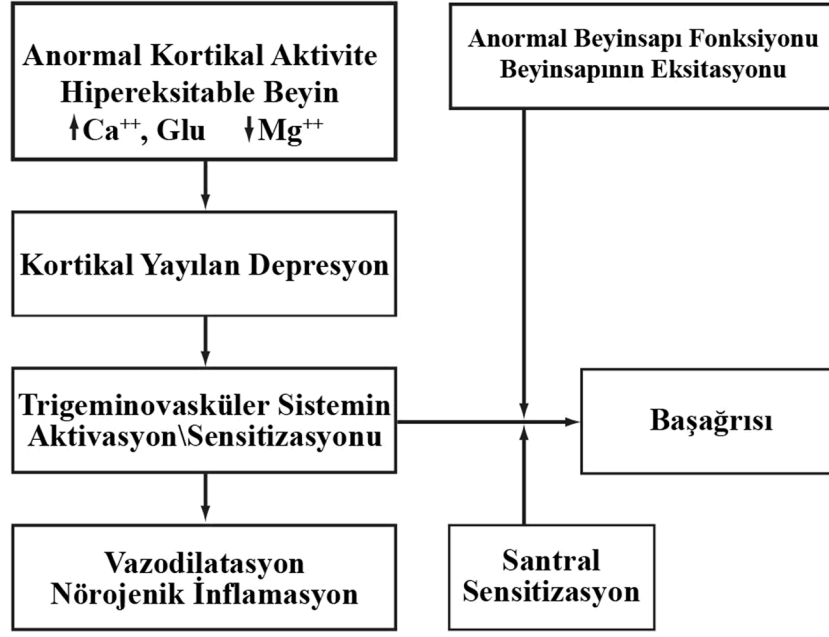
2.5. Migrenin Patofizyolojisi

Genel popülasyonda migren sıklığı yüksek olmasına rağmen bu bozukluğun patogenezi hala açık değildir (26). Wolff'un 1930 ve 1940 yıllarında geliştirdiği klasik ya da vasküler migren hipotezi, migrenin kraniyal damarlarda vazokonstriksiyon ile başlayan vazospastik bir bozukluk olduğunu öne sürer (27). Daha kompleks olan nörovasküler teoriye göre ise vasküler değişikliklerin nöronal aktivasyona sekonder olduğu düşünülmektedir (28).

Migren patogenezinin temel kavramları:

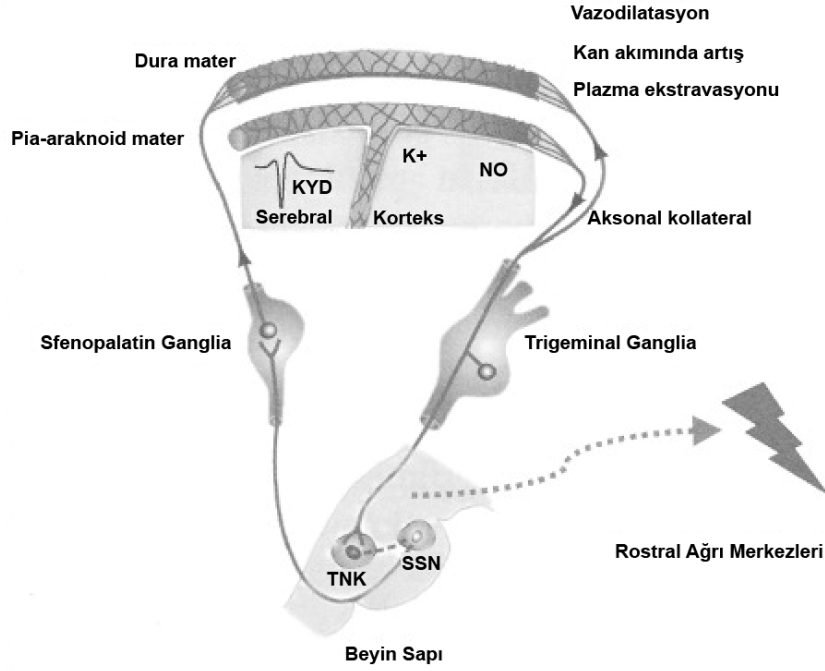
- a) İnteriktal faz boyunca nöronal hipereksitabilite,
- b) Auranın temeli olarak kortikal yayılan depresyon (KYD),
- c) Baş ağrısını açıklamada trigeminal sinirin periferik ve santral uzantılarının uyarılması,
- d) Santral sensitizasyonu ve hastalığın fenotipik yansımasındaki bazı farklılıkları açıklayabilen periakvaduktal gri cevherde progresif hasar olarak sıralanabilir (29) (Şekil 1).

Migrenli beyinlerde iktal ve interiktal hipereksitabilite olduğu bilinmektedir (30). Migrenli beyinlerdeki hipereksitabilitenin nedenleri düşük magnezyum seviyeleri, yüksek kalsiyum ve glutamat seviyeleri, mitokondriyal disfonksiyon, nitrik oksit ile ilişkili disfonksiyon ve kanalopati olarak sıralanabilir (28,30).



Şekil 1. Migren baş ağrısının mekanizmaları (Silberstein SD. Migraine pathophysiology and its clinical implications. Cephalalgia 2004;24(2):2-7).

Kafa içinde ağrı duyarlılığı primer olarak meningeal kan damarlarında sınırlıdır ve bu yapılar trigeminal sinirin oftalmik dalının nosiseptif duyuşal afferent dallarıyla innerve olur. Genel olarak migren baş ağrılarının bu afferentlerin aktivasyonuna bağı geliştiğı düşünülür (1). Bolay ve ark, KYD'un trigeminovasküler afferentleri aktive edebileceğini göstermiştir (31). KYD rat korteksinde hücre dışı sıvının bileşiminde glutamat, potasyum iyonları (K^+), hidrojen iyonları (H^+), nitrik oksit (NO), araşidonik asit ve prostaglandinlerin konsantrasyonlarında büyük artışlara neden olur. Bu maddelerin bazıları direkt olarak ya da perivasküler inflamasyon aracılığıyla indirekt olarak meningeal trigeminovasküler afferentleri aktive ve/veya sensitize eder (31). Trigeminal ganglion hücrelerinin periferik uzantıları pia, araknoid ve onların kan damarlarına ve dura matere projekte olurken, santral uzantılar beyin sapında, trigeminal nükleus kaudalis (TNK)'deki ikinci sıra nöronlarla sinaps yapar (28). Trigeminal duyuşal liflerin aktivasyonu substans P ve KGİP gibi vazoaktif peptidlerin salgılanması aracılığıyla trigeminal ganglion nöronlarını uyarır. Sonuç olarak ağrı yanıtı beyin sapına ve buradan da talamus ve somatosensoryal korteks gibi yüksek merkezlere taşınır (32) (Şekil 2).



Şekil 2. KYD ve auralı migrendeki patofizyolojik olaylar (Özön Ö, Bolay H. Primer baş ağrılarında tanı ve tedavi yaklaşımları. Türk Nöroşir Derg 2003;13:97-112).

Trigeminovasküler refleks aktive olduğunda KGİP salınımıyla sonuçlanan antidromik uyarı TNK ile birlikte resiprokal C₁ ve C₂ seviyelerini de aktive eder (33). Santral sensitizasyon TNK'deki anormal nöronal eksitabilite ile birlikte. TNK'deki nosiseptif sinapsların uzun dönem potansiyelizasyonu ve/veya periaquaduktal gri cevher'i (PAG) içeren endojen santral ağrı modülasyon yollarındaki değişiklikler trigeminovasküler sistemin (TVS) santral sensitizasyonu için olası kuramsal mekanizmalardır. MRI çalışmaları PAG'ın ağrı modülasyonunda yer aldığını göstermektedir. Weiller ve arkadaşları beyin sapındaki aminojenik nükleusların (lokus sereleus ve rafe nükleusu) migren süresince oluşan trigeminal ağrıyı değiştirdiğini göstermiştir (34). Ağrının santral kontrolünde görevli beyin sapı nükleus nosiseptörleri migrenlilerde disfonksiyonel olabilir ve bu da trigeminal nöronal hipereksitabilite için duyarlılığı artırabilir (35). Periferik sensitizasyon ve nörojenik inflamasyonu takiben 5-hidroksi triptamin (5-HT), glutamat, substans P, KGİP, NO ve protonların konsantrasyonlarındaki artış trigeminal nükleus kaudalisteki 'wide dynamic range' (WDR) nöronlarına C lifleriyle gelen inputları artırır ve normal şartlarda WDR nöronlarına Aβ liflerinden gelen ağrısız inputlar, allodini sürecinde ağrı yanıtının oluşmasıyla sonuçlanır (Santral sensitizasyon) (28).

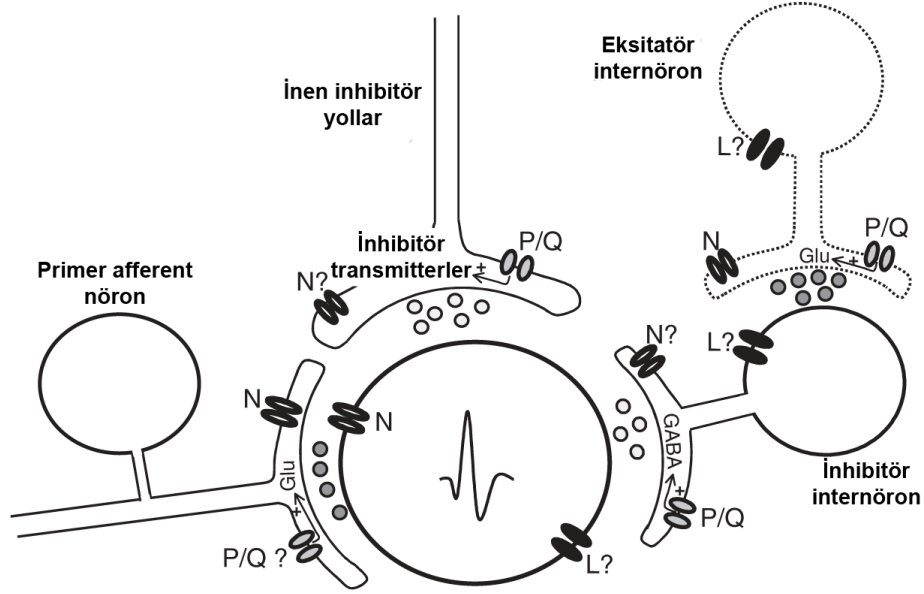
2.5.1. Migren Patofizyolojisinde Kalsiyumun Rolü

Hücre içi kalsiyum seviyelerindeki dalgalanmalar nöronlardaki fizyolojik, kimyasal ve biyolojik süreçleri etkiler (36). Ca^{+2} çok önemli bir hücre içi sinyal molekülüdür. Birçok hücrel fonksiyon serbest sitozolik kalsiyum iyonu derişimiyle direkt ya da indirekt olarak düzenlenir (8). Bunlar impuls üretimi ve yayılması, duyuşal süreçler, kas kontraksiyonu, hormon ve nörotransmitterlerin sekresyonu, hücre farklılaşması ve gen ekspresyonu olarak sıralanabilir (37). NMDA reseptörleri ve voltaj kapılı kalsiyum kanalları aracılığıyla hücre içine giren kalsiyum ve hücre içi kalsiyum depolarından serbestlenen kalsiyum hücre içi kalsiyum derişimini oluşturur (35).

Magnezyum, kalsiyum homeostazında NMDA reseptörlerine bağlanarak etki oluşturur. Düşük magnezyum düzeyleri, kalsiyum kanallarının açılması, hücre içi kalsiyumda artma, aspartat ve glutamat salınmasıyla sonuçlanır (30). Ailesel hemiplejik migren hastalarında voltaj bağımlı P/Q tipi kalsiyum kanallarının $\alpha 1A$ subunitini kodlayan CACNA1A geninde missense bir mutasyon bulunmuştur (38). VKKK'ları hücre membranının depolarizasyonu ile sonuçlanan, hücre içine kalsiyum akımına aracılık eder (39). Birkaç çalışmada KYD'nun başlangıcı ve yayılmasında kalsiyumun rolü olduğunu öne sürmektedir. KYD hücre içi kalsiyumda artma, hücre dışı kalsiyumda azalma ile birlikte (40). Hücre içi kalsiyum artış dalgaları astrositlerde yavaşça yayılan astrositik kalsiyum sinyallerini ortaya çıkarır (41). KYD ve astrositik kalsiyum dalgaları yayılım hızı, stimulasyon ve inhibisyon şekli ve migrasyon özelliklerinde benzerlikler gösterir (42).

Migren sürecinde periferal sensitizasyona santral sensitizasyon eşlik eder (Örneğin trigeminal nükleus ve olası diğer bölgelerdeki nosiseptif nöronlarda hipereksitabilite gelişmesi gibi) (43). Somatik inflamatuvar ağrıda santral sensitizasyon, primer afferentlerin tekrarlayan aktivasyonu sonucunda dorsal horn nöronlarında gelişen olaylar zincirinin sonucudur. Santral sensitizasyonda NMDA reseptörlerinin aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} da artış, hücre içi protein kinaz ve fosfatazların aktivasyonu, nitrik oksit sentaz (NOS), fosfolipaz A2 gibi enzimlerin aktivasyonu anahtar rol oynar (44). Trigeminoasküler sistemin sensitizasyonunun moleküler mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir (1). Santral sensitizasyon trigeminal nükleus kaudalinde anormal nöronal eksitabilite ile birlikte (45). Düşük magnezyum seviyeleri, artmış kalsiyum ve

glutamat seviyeleri NMDA reseptörleri aracılığıyla oluşan nöronal eksitabiliteye neden olur (45). Ebersberger ve ark trigeminovasküler sensitizasyonda inhibitör sistemdeki anormal P/Q tipi kalsiyum kanallarının, meninkslerden gelen inputların santral işlemlenmesinde değişikliğe yol açtığını önermektedir (46) (Şekil 3).

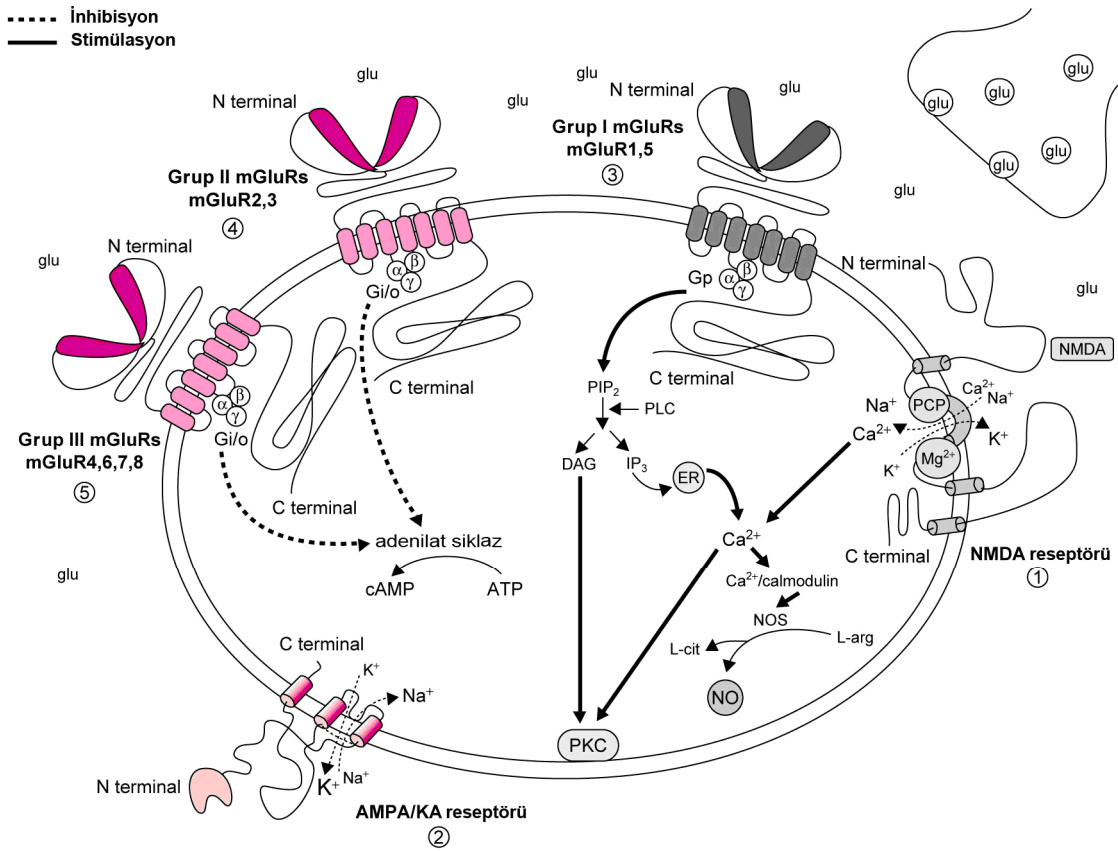


Şekil 3. Trigeminal nükleer komplekste VKKK'larının lokalizasyon ve relatif öneminin hipotetik modeli (Ebersberger A, Portz S, Meissner W et al. Effects of N-,P/Q- and L-type calcium channel blockers on nociceptive neurones of the trigeminal nucleus with input from the dura. *Cephalalgia* 2004;24(4):250-261)

2.5.2. Migren ve NMDA Reseptörleri

Glutamat medulla spinalisteki nöronlardan, spinal sinapslardan, trigeminal nükleusun subnükleus kaudalisinden, dorsal horn intrinsik nöronları ve projeksiyon nöronlarından salınır (47). Glutamat iki tip reseptörü etkiler, iyonotropik (direkt olarak iyon kanallarına bağlı) ve metabotropik (direkt olarak hücre içi ikincil habercilere bağlı). NMDA, α -Amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4-propiyonik asid (AMPA) ve kainat iyonotropik reseptörleri seçici olarak aktive eder (Şekil 4). Glutamat reseptörlerinin aktivasyonu bazı beyin bölgelerinde pronosiseptif iken (örn. talamus ve trigeminal nükleus), diğer bazı beyin bölgelerinde antinosiseptif etki gösterir (örn. periakvaduktal gri cevher, ventrolateral medulla) (48). NMDA reseptörleri NR₁, NR_{2A}-NR_{2D} alt gruplarından oluşmaktadır (49). NR₁ subuniti santral sinir sisteminde yaygın olarak bulunur. NR_{2A} ve NR_{2B} subünitleri talamusta dağılmıştır ancak NR_{2A} subüniti

lateral talamik nukleusta ve ventrobazal komplekste daha baskındır. NR_{2C} seviyeleri serebellumda daha yüksektir. NR_{2D} ise erken gelişim evrelerinde baskın olan subünittir (50). NMDA reseptörleri katyon geçirgen iyon kanallarıdır ve aktive olduklarında, hücre içi kalsiyum düzeyleri, NO sentezi ve salınımı artar (51). NMDA reseptör aktivasyonu depolarizan etkili güçlü bir stimulustur ve KYD başlangıcı ve yayılımını stimüle ettiği düşünülür (30). NMDA direkt olarak hipokampus, serebral korteks ve serebelluma uygulandığında KYD'a neden olur (52). Lauritzen ve Hansen'in yaptığı bir çalışmada NMDA blokajının KYD'ı önlediği, buna rağmen non-NMDA blokajının KYD üzerine etkili olmadığı gösterilmiştir (53).



Şekil 4. Glutamat reseptörlerinin şematik görüntüsü (Fundytus ME. Glutamate receptors and nociception. CNS Drugs 2001;15(1):29-58). Glutamat reseptörlerinin farklı tipleri figürde gösterilmektedir. (1) NMDA reseptörleri Na⁺, K⁺ ve Ca²⁺ geçirgen bir iyon kanalına direkt olarak bağlıdır. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu hücre içine kalsiyum akımıyla sonuçlanır. (2) AMPA ve kainat reseptörleri Na⁺ ve K⁺ geçirgen bir iyon kanalına direkt olarak bağlıdır. (3) Metabotropik glutamat reseptörleri (mGluRs) sinyal mekanizmaları ve reseptör farmakolojisi açısından üç gruba ayrılabilir. Grup I mGluRs, fosfolipaz C aktivitesini düzenler. Grup II ve III mGluRs, adenilat siklazı negatif olarak bağlıdır ve bu reseptörlerin aktivasyonu siklik adenosin monofosfat (cAMP) oluşumunu inhibe eder.

2.5.3. Migren ve Nitrik Oksit

NO, L-argininin terminal guanido nitrojeninden üretilir. Nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesi endotelyum, beyin, periferel sinirler, vasküler düz kas, miyokard, makrofajlar, nötrofiller ve mikrogliaıı içeren birkaç dokuda bulunur (54).

NO endotelyumda üretilen en önemli vazodilatatör etkili substanslardan biridir. Bu hücre içi ve hücreler arası haberci, çok kısa yarı ömürlü (5-15 saniye) ve yüksek reaktif bir serbest radikaldır ve hızlıca kararlı metabolitler, nitritler ve nitratlara dönüşür(55).

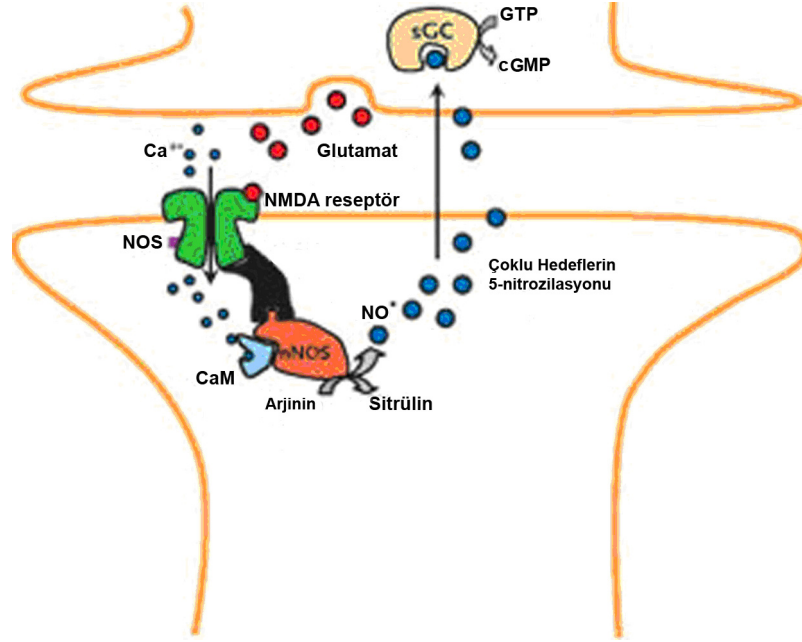
NO'in çoğu fizyolojik etkileri guanilat siklazın aktivasyonu ve takiben siklik guanozin monofosfatdaki (cGMP) artış aracılığıyladır, sonuç olarak hedef hücrelerde hücre içi kalsiyum miktarlarında artmaya yol açar (56,57). Böylece NO endotel bağımlı vazodilatasyona neden olur ve serebrovasküler regülasyonu sağlar (58,59,60).

Tablo 4. Nitrik oksidin indüklediğı serebral vazodilatasyonda olaylar zinciri (Myers DE. Potential neurogenic and vascular roles of nitric oxide in migraine headache and aura. *Headache* 1999;39(2):118-124).

1- NO salınımı
a-NOerjik nöronlardan sinaptik salınım
b-Vasküler endotelyumda NO sentezi
c-Sitokinler ve diğere inflamatuvar araçılarla indüklenebilir NOS indüksiyonu
d-Nitritler ve nitratlatdan enzimatik ve nonenzimatik dönüşüm
2- Vasküler düz kasta guanilat siklazın stimülasyonu
3- Guanilat siklaz aracılığıyla GTP'nin CGMP'e dönüşümü
4- İkincil habercilerin fosforilasyonu
5- Kalsiyum bağımlı ve ATP bağımlı K ⁺ kanallarının açılması
6- Vazodilatasyon

Yapılan çalışmalarda, beyin dokusunda aktif olarak çalışan bir arginin-NO yolunun varlığı ispat edilmiştir (61). NO'in glutamat tarafından indüklenen sinirsel ileti

işleminde bir nörotransmitter olarak rol oynadığı kesin olarak gösterilmiştir (62,63) (Şekil 5).

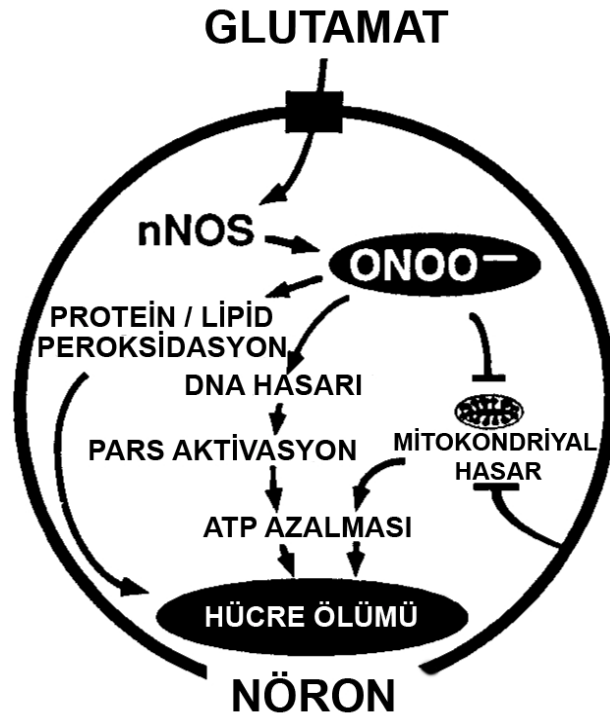


Şekil 5. Beyin dokusunda NO yolu

Tablo 5. Kortikal yayılan depresyonda nöronal olaylar zinciri (Myers DE. Potential neurogenic and vascular roles of nitric oxide in migraine headache and aura. *Headache* 1999;39(2):118-124).

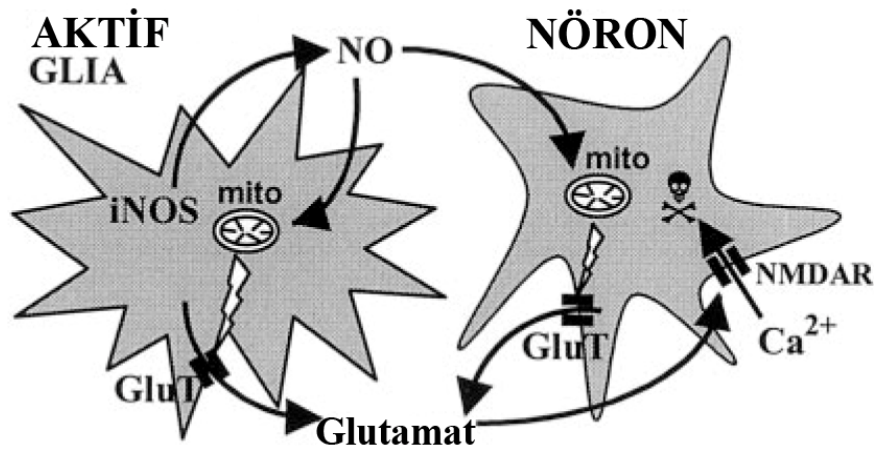
1. NMDA reseptörlerinin stimülasyonu
2. Nöronal NO sentezi ve salınımı
3. Nöronlarda guanilat siklazın stimülasyonu
4. GTP'nin cGMP'e dönüşümü
5. İkincil habercilerin fosforilasyonu
6. Glutamatın sinaptik aralığa salınması
7. Glutamat aracılığıyla postsinaptik NMDA reseptörlerinin uyarılması

Glutamatın neden olduğu nörotoksisite kısmen NO aracılığıyla oluşur (64) (Şekil 6).



Şekil 6. NO aracılı nörotoksitenin mekanizması (Bolanos JP, Almedia A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, Heales SJ. Nitric oxide-mediate mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 1997;68(6):2227-2240).

NO aracılı glutamat nörotoksitesiden kısmen mitokondriyal disfonksiyon ve bozulmuş antioksidan durum sorumludur (65). Mikroglia ya da astrosit kaynaklı NO, nörodejenerasyon sürecinde çevre nöronlarda mitokondriyal solunumu baskılar, özellikle astrositlerden glutamat taşıyıcıları aracılığıyla glutamat salınımına ve NMDA reseptörlerinin stimülasyonuna neden olur. NMDA reseptörlerinin glutamat aracılığıyla aktivasyonu nöronlara kalsiyum akımıyla sonuçlanır (66) (Şekil 7).



Şekil 7. NO aracılı nörodejenerasyon (Bal-Price A and Brown GC. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *Journal Neurosci* 2001;21(17):6480-6491).

KYD süresince NO seviyesi artar, ancak KYD’de NO’in rolü tam olarak bilinmemektedir (67). Ulmer ve ark NO donörlerinin retinal preparatlarda KYD’nin hızını artırdığını gösterdiler (68). Nitrogliserin (NTG) verildikten 4-6 saat sonra migrenli kişilerde, normalde migreni olmayan bireylere göre daha sık gözlenen, tipik baş ağrısı geliştiği için bir NO donörü olan nitrogliserinin etkisi birçok deneysel çalışma ile değerlendirilmiştir (69,70). NTG yüksek oranda lipofiliktir ve kan beyin bariyerini kolayca geçer. Beyinde birikimiyle ilgili deneysel kanıtlar mevcuttur (71). Bu organik nitratin sistemik olarak verilmesi nörovegetatif, nöroendokrin, davranışsal ve nosiseptif sistemlerdeki nükleusların nöronal aktivasyonunu indükler (26).

Hayvan çalışmalarında, Ca^{+2} -bağımlı NO sentazın (örneğin nöronal NOS ve endotelial NOS gibi) aktivasyonunu takiben oluşan NO’in hiperaljeziye aracılık ettiği gösterilmiştir (72,73).

NTG-kökenli ekzojen NO, vasküler ve nöronal yapıları direkt olarak etkileyebildiği gibi indirekt olarak da NOS ve belki de siklooksijenaz sentezini kapsayan birçok yol aracılığıyla nörovasküler cevapları uyarır (74). NTG kedi serebral kan damarlarını innerve eden trigeminal liflerden nöropeptid salınımını uyarır ve vazodilatasyonu artırır (75).

Serebral kan damarlarında 5-HT_{2B} reseptörlerinin aktivasyonu ile NO üretilir ve 5-HT_{2B} reseptör blokörleri migren profilaksisinde kullanılır. Ayrıca NOS inhibitörlerinin uygulanması akut atak boyunca hastaların 2/3’ünde semptomları önemli ölçüde düzeltmektedir (76).

Beyin NO konsantrasyonundaki artışın migren baş ağrısının başlaması ve sürdürülmesine aracı olduğu düşünülmektedir (77). Bu durum Olesen ve arkadaşları tarafından klinik olarak modellenmiştir (69,78).

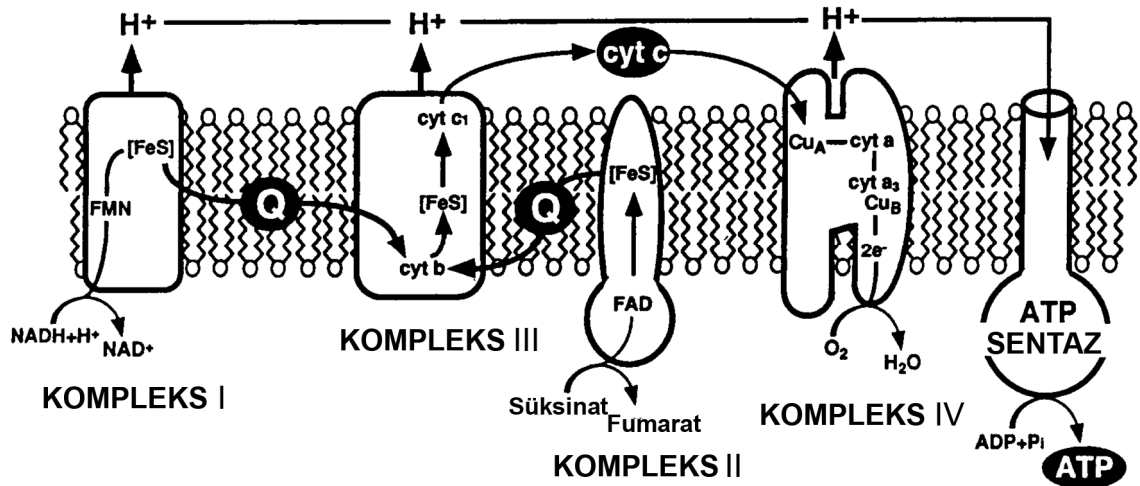
2.6. Riboflavin

Riboflavin (7,8-dimetil-10-ribityl-isoalloxazine) birçok yiyecekte bulunan suda eriyen bir vitamindir (79). Riboflavin bütün organellerdeki enzimler için kofaktör olan flavin mononükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotid (FAD)’ın öncülüdür. Mitokondriyal elektron transportu, fotosentez, yağ asidi oksidasyonu ve B6, B12 ve folat vitaminlerinin metabolizması bu iki flavinin önemli olduğu vital süreçlerdir.

İnsanlar riboflavinden FMN ve FAD sentezleyebilir ama riboflavin de novo olarak sentezlenemez, bu yüzden bu vitaminin diyetle alınması gereklidir (80).

Proteinlere bağlı riboflavin ve flavoproteinlerdeki FMN ve FAD, mide asidi ve gastrik/intestinal proteazlarla serbestlenir. Riboflavin vücutta çoğunlukla FAD şeklinde karaciğerde depolanır. Dolaşan plazma %50 riboflavin, %40 FAD, %10 FMN olarak 0.03 μ M riboflavin içerir (81).

Serbest riboflavin plazmada albumin ve bazı immunoglobulinlere bağlı olarak taşınır (82). Dokulardaki riboflavinin hemen hemen tümü enzimlere bağlıdır. Örneğin FAD'ın süksinik dehidrogenaza kovalent bağlanması gibi (83). Bağlı olmayan riboflavinler görece labildir ve hızla serbest riboflavine hidrolize olarak vücuttan atılır (79). Yapılan çalışmalar ratlarda riboflavinin antinosiseptif, antiinflamatuvar etkileri olduğunu göstermektedir (14,17,73). Granados ve ark'nın yaptıkları bir çalışmada, NOS inhibitörü olan L-NAME uygulaması ile formalinin indüklediği nosisepsiyon önemli ölçüde gerilemiştir. Bu veri riboflavinin NOS inhibisyonu üzerinden antinosiseptif etkiler oluşturabileceği iddiasını desteklemektedir (84). Riboflavin mitokondrideki elektron transport zincirinde yer alan FMN ve FAD için koenzim görevi yapar. Migrendeki yararlı etkilerinin kompleks I ve kompleks II aktivitesinde ve mitokondriyal enerji metabolizmasındaki artış ile oluştuğu iddia edilmektedir (13,16,17). (Şekil 8)

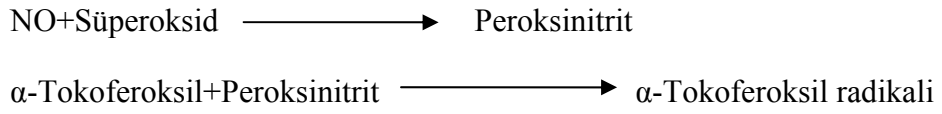


Şekil 8. Mitokondriyal elektron transport zincirinde riboflavinin yeri (Bolanos JP, Almedia A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, Heales SJ. Nitric oxide-mediate mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 1997;68(6):2227-2240).

2.7. E Vitamini

Vitamin E, alfa tokoferol biyolojik aktivitesi sergileyen tokoferoller ve tokotrienollerin genel adıdır ve nöroprotektif etkilere sahiptir. Vitamin E'nin temel antioksidan etkilerinden biri hücre içi sinyal kaskadlarının modülasyonudur. Vitamin E ROM (reaktif oksijen molekülleri) inhibisyonuyla glutamat yolunda düzenleyici bir role sahiptir (20).

Tokoferol, NO ve superoksidden oluşan peroksinitritin okidasyonunu sağlar ve mitokondriyal hasarı önler (85).

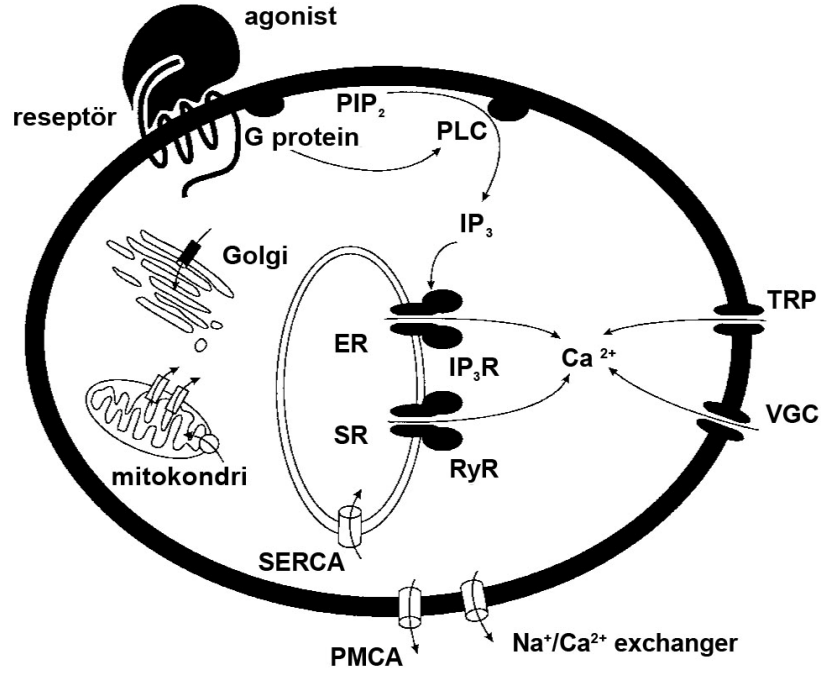


Reaktif oksijen molekülleri (ROM)'nin nöropatik ve inflamatuvar ağrıyı kapsayan çeşitli ağırlı durumlarda önemli bir yeri vardır. Doğadaki en güçlü antioksidan olarak bilinen Vitamin E'nin analjezik etkisi ve etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca bu alanda yapılan çalışmalar da sınırlıdır. Yapılan bir çalışmada Vitamin E'nin NMDA reseptör fosforilasyonunu artırarak santral sensitizasyonun azalttığı öne sürülmüştür (86). Ancak Vitamin E'nin analjezide oluşturduğu hücreyel olaylar hala net değildir.

2.8. Beyin Kalsiyum Homeostazı

Hücre içi kalsiyum seviyeleri nöron içindeki ve nöronlar arasındaki normal ve patolojik sinyallerde temel rol oynar. Temel hücre içi kalsiyum kaynaklarını NMDA reseptörleri ya da VKKK'ları aracılığıyla hücre içine giren ve hücre içi kalsiyum depolarından salınan kalsiyum oluşturur (38).

Plazma membran kalsiyum ATPaz (PMCA) sitozolden hücre dışına kalsiyum taşınmasından sorumlu primer kalsiyum uzaklaştırma sistemidir (87,88). PMCA, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değiştirici ve sarko(endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz (SERCA) ile birlikte serbest hücre içi kalsiyum seviyelerinin sürdürülmesinden sorumludur (89) (Şekil 9).



Şekil 9. Hücre içi kalsiyum sinyallarının oluşumu (Missiaen L, Robberecht W, Bosch LVD et al. Abnormal intracellular Ca²⁺ homeostasis and disease. Cell Calcium 28(1):1-21, 2000).

PMCA aktivitesi kalsiyum, kalmodulin, asidik fosfolipidler, yağ asitleri ve protein kinaz aracılı fosforilasyondan oluşan birkaç mekanizma ile düzenlenir (90). PMCA'lar hücre dışına Ca²⁺ iyonu taşırken ATP'yi hidrolize ederek enerji kullanan P tipi pompalardır (91).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada 8-12 haftalık ve ağırlıkları 200-250 gram arasında olan 60 adet Wistar-Albino cinsi dişi ratlar kullanıldı. Deney hayvanlarının bilimsel amaçla kullanılması için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu onayı alındı.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Ratlar her bir grupta 15 fare olacak şekilde rastgele olarak dört gruba ayrıldı. Tüm ratlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12saat karanlık) ve ısı koşullarında (~25° C) bulunduruldu. Her biri ayrı kafeslere konulan ratlara yeteri kadar içme suyu ve standart rat pellet yemi verildi. Grup 1; Kontrol grubunu, Grup 2; GTN (Gliseril trinitrat) grubunu, Grup 3; GTN+RBF (Riboflavin) grubunu, Grup 4; GTN+RBF+ E Vit grubunu oluşturdu. Çalışma süresince 10 gün boyunca grup 1 (kontrol grubu) ve grup 2'ye (GTN grubu) ilaç uygulaması yapılmadı. Grup 3'e riboflavin 100 mg/kg/gün oral uygulandı. Grup 4'e riboflavin (Eczabaşı İlaç A.Ş.) 100 mg/kg/gün oral ve E vitamini (Evigen ampul 300 mg/2 ml, Eras) 100 mg/kg/günaşırı intraperitoneal (i.p.) uygulandı. Son ilaç uygulamasından 24 saat sonra grup 2, grup 3 ve grup 4'e gliseril trinitrat 10 mg/kg i.p. 3 saat boyunca infüze edilerek deneysel başağrısı modeli oluşturuldu. GTN infüzyonundan ortalama 1 saat sonra ratların hareketlerinde yavaşlama ve kuyruk çekme testine verdikleri tepkide azalma gözlemlendi. Grup 1'e aynı hacimde serum fizyolojik (SF) i.p. uygulanarak kontrol grubu oluşturuldu.

3.2.1. Anestezi ve Gerekli Materyaller

Bir gece önceden beslenmesi kesilen hayvanlara 3 saatlik GTN infüzyonundan bir saat sonra ketamin hidroklorür (50 mg/kg) ve kslazin (5 mg/kg) karışımı i.p. olarak uygulandı. Daha sonra bütün ratlar sakrifiye edilerek beyin korteksi çıkarıldı. Çıkarılan beyin korteks dokusu iki kez soğuk SF ile yıkandı. Cam şişelerde derin dondurucuda (-30 °C) belli süre (maksimum on saat) bekletildi.

Daha sonra korteks örneği buz üzerinde küçük parçalara ayrıldı. Teflon homogenizer kullanılarak soğuk-buz Tris-HCl tamponla (50 mM, pH 7.4) 2 dakika

5000 rpm de homojenize edildi. Kalan beyin korteks örneğinden ultrasantrifüj kullanılarak mikrozomlar izole edildi. Bütün preparatlar 4 °C’de saklandı.

3.3. Metod

3.3.1. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu

Hipokampusler tartılıp, SDS-PAGE ve Western Blot işlemi uygulanmak üzere ayrıldı. Aynı gruptaki farklı sıçanlara ait hipokampus örnekleri tartıldıktan sonra 4’erli gruplar halinde birleştirildi ve ardından 1/5 oranında homojenizasyon tamponu ile karıştırılarak homojenize edildi. İlk adımda buz üzerinde teflon-cam homojenizatör ile 18-20 darbeye homojenizasyon yapıldı. Homojenize edilen örnekler 10000 g’de +4°C’de soğutmalı santrifüjde 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlarda SDS-PAGE ve Western Blot çalışıldı.

3.3.2. SDS-PAGE Yöntemi

Laemmle’nin yöntemi esas alınarak çalışıldı (92). % 7.5’lik lower jel ve % 4’lük upper jel hazırlanıp, kuyucuk başına son konsantrasyonu 50 µgr protein olacak şekilde, doku homojenatı sample buffer’la 1/1 oranında karıştırılarak uygulandı.

3.3.3. Western Blot Yöntemi

SDS-PAGE işlemi ile örnekler jel üzerinde proteinlerine ayrıldı ve daha sonra polyvinylidene difluorid (PVDF) membrana (immobilon-P) transfer edilmek üzere transfer tankına alındı. Transfer işlemi sonrası anti NR_{2A} ve anti NR_{2B} içeren solüsyonlarda bir gece boyunca bekletildi. Daha sonra sekonder antikorla 1 saat süre ile inkübe edilen membranlar, kemilüminesans çalışma solüsyonunda 3 dakika bekletildi. Oluşan bantlar Kodak Image Station 2000 MM, USA cihazı kullanılarak tarandı. Elde edilen bant yoğunlukları her bir reseptör subüniti için kendi arasında karşılaştırıldı.

3.3.4. Mikrozomların İzolasyonu

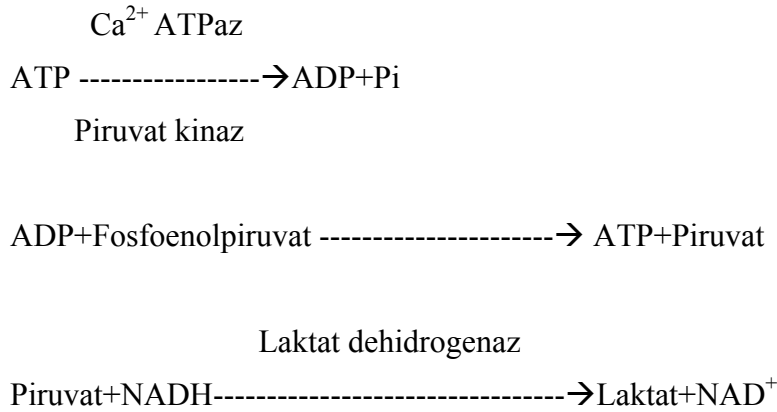
Dokular temizlenip küçük parçalara ayrıldıktan sonra 1/6 oranında 0,3 mol/l sükröz, 10mmol/l (Hepes- HCl pH 7.4) ve 2 mmol/l dithiothreitol den hazırlanan ‘Buffer A’ solüsyonunda homojenize edildi. Beyin dokusu cam homojenizatörlerle parçalandı.

Homojenat 75 dakika boyunca 85000 g'de santrifüj edildi (MSE, MS 80, Sanyo Inc) (Sorvall, TeknolabAŞ, Ankara, Turkey). Süpernatant çıkarıldı. Çökelti 0,6 molar KCl içeren 'Buffer A' solüsyonu ile tekrar homojenize edildi ve 75 dakika boyunca 85000 g'de santrifüj edildi. Sonra kalan çökelti Buffer A solüsyonu ile tekrar aynı işlemlerden geçirildi. Bu işlemler sonrasında süpernatanttan sonra kalan kısmın protein konsantrasyonu 2-7 mg/ml olarak ayarlandı. Örnekler -60°C de saklandı ve izolasyon işlemi +4°C'de gerçekleştirildi ve taşındı (91).

3.3.5. Mikrozomal Ca²⁺-ATPaz Aktivitesinin Ölçümü

Ca²⁺-ATPaz aktivitesi Niggli ve ark'nın spektrofotometrik metoduna göre ölçüldü (93).

Niggli ve ark'nın spektrofotometrik metodundaki reaksiyonlar zinciri aşağıdaki gibidir:



Medium 120 mmol/l KCl, 60 mmol/l Hepes pH 7 (37°C'de), 1 mmol/l MgCl₂, 0.5 mmol/l K₂-ATP, 0.2 mmol/l NADH, 0.5 mmol/l PEPA, 1 IU piruvat kinaz, 1 IU ml/l LDH ve 500 µmol/l EGTA içermektedir. Medium dört dak 37°C inkübasyon ortamında bekletildi ve 1 ml mediuma hazırladığımız mikrozomlardan 50 µg ilave edildi. İki dakika sonrasında 600 mmol/l CaCl₂ ilavesinden sonra reaksiyon başladı. ATPaz aktivitesi 365 nm dalga boyunda okundu. Enzimler proteinlere bağlı olarak bulunduğundan, aynı örneklerde Lowry ve arkadaşlarının bildirdikleri yöntemle göre protein tayini yapılarak enzim aktivite birimleri IU/mg protein olarak belirlendi.

3.3.6. Total Beyin Kalsiyum Düzeyinin Ölçümü

Doku kalsiyum düzeyi plazma optik emisyon atomic absorpsiyon spektrofotometre (ICP-OES, Optima 4300 DV, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Inc., Waltham, Massachusetts, USA) cihazı ile nitrik asitle yaş yakma işlemine göre ölçüldü. Kalsiyum düzeyleri 422,7 nm dalga boyunda okundu.

3.4. İstatiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirmeler *SPSS 15.0 for Windows* paket programı kullanılarak yapıldı. Ca^{+2} ATPaz, total beyin kalsiyum derişimi, NR_{2A} ve NR_{2B} reseptör düzeyleri için grupların birbiri ile karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar yüzde ortalama \pm SD olarak verildi. p değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

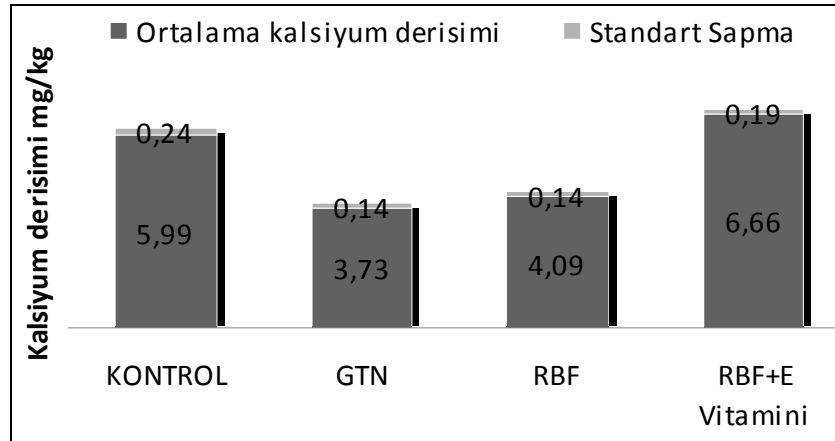
4. BULGULAR

Çalışmadan elde edilen değerler tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Gruplardan elde edilen beyin total kalsiyum, Ca⁺²-ATPaz derişimleri ve NR_{2A} ve NR_{2B} ekspresyon düzeyleri (Değerler ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir.)

	KONTROL	GTN	RBF	RBF+E Vit
Kalsiyum derişimi (mg/dl)	5.99±0.24	3.73±0.14	4.09±0.14	6.66±0.19
Ca ⁺² -ATPaz düzeyi (IU/gr)	0.14±0.01	0.06±0.01	0.09±0.01	0.12±0.01
NR _{2A} ekspresyon düzeyi (%)	100±19	435±19	218±99	88±98
NR _{2B} ekspresyon düzeyi (%)	100±38	180±20	95±30	119±16

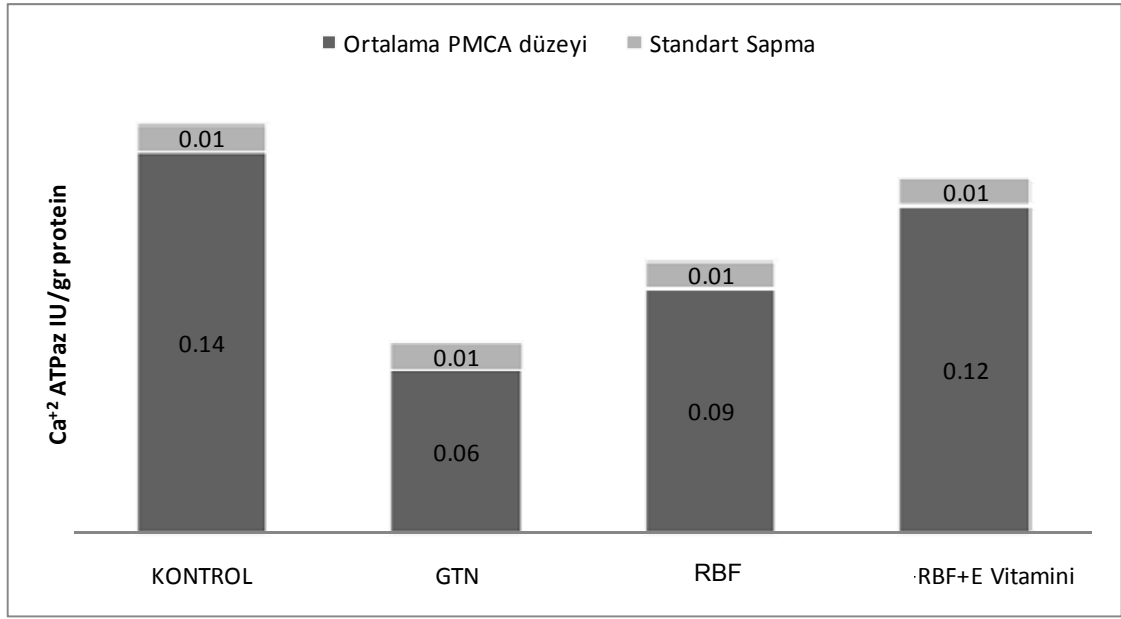
Beyin dokusunda beyin total kalsiyum düzeyleri, kontrol grubunda 5.99±0.24 mg/kg ve GTN uygulanarak deneysel başağrısı modeli oluşturulan grupta 3.73±0.14 mg/kg olarak ölçüldü ve iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıydı (p=0,002). RBF grubunda ve RBF+E Vit gruplarında beyin total kalsiyum düzeyleri GTN grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksekti (RBF:4.09±0.14 mg/kg; RBF+E Vit:6.66±0.19 mg/kg, sırasıyla p=0,002 ve p=0,002). Bununla birlikte, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında RBF grubunda total kalsiyum düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük (p=0,002) fakat RBF+E Vit grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı (p=0,003). Yine, beyin total kalsiyum düzeyleri RBF+EVit grubunda RBF grubundakinden anlamlı derecede yüksekti (p=0,002) (Şekil 10).



Şekil 10. Beyin total kalsiyum seviyeleri. Grafikte ortalama değerler ve standart sapmalar verilmiştir

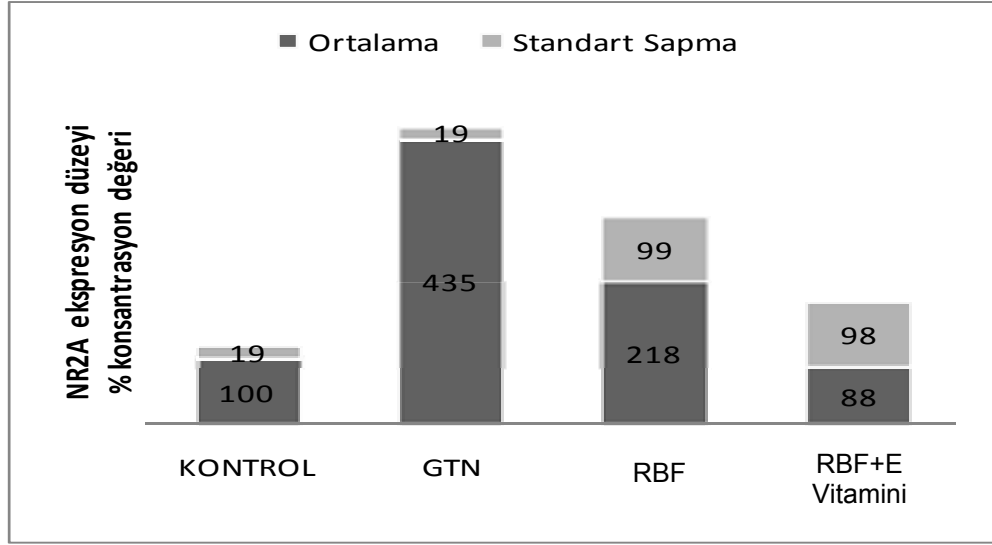
Beyin dokusunda Ca⁺²-ATPaz düzeyleri, kontrol grubunda 0.14±0.01 IU/gr protein ve GTN uygulanarak deneysel başağrısı modeli oluşturulan grupta 0.06±0.01 IU/gr protein olarak ölçüldü ve iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı

bulundu ($p=0,001$). RBF grubunda ve RBF+E Vit grubunda Ca^{+2} -ATPaz düzeyleri GTN grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksekti (RBF: $0,09\pm 0,01$ IU/gr protein; RBF+E Vit: $0,12\pm 0,01$ IU/gr protein, sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,001$). Yine, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında RBF ve RBF+E Vit grubunda Ca^{+2} -ATPaz düzeyleri anlamlı derecede düşük saptandı (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,011$). Ayrıca Ca^{+2} -ATPaz düzeyleri RBF+EVit grubunda RBF grubundakinden anlamlı derecede yüksekti ($p=0,001$).



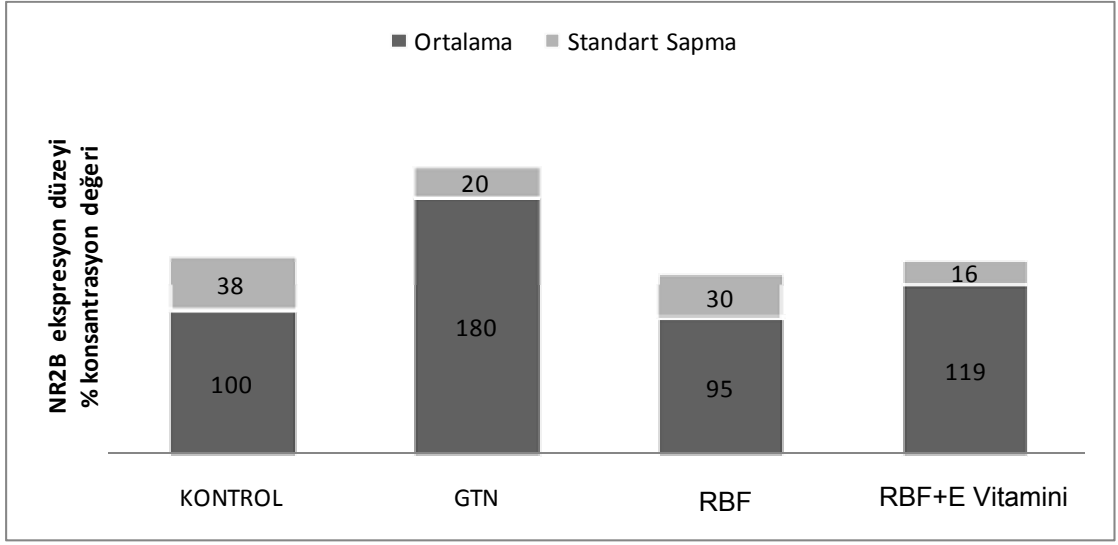
Şekil 11. Rat beyninde PMCA seviyeleri. Grafikte ortalama değerler ve standart sapmalar verilmiştir

Hipokampus NR_{2A} düzeyleri, kontrol grubunda 100 ± 19 konsantrasyon değeri ve GTN uygulanarak deneysel başağrısı modeli oluşturulan grupta 435 ± 19 konsantrasyon değeri olarak ölçüldü ve iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıydı ($p=0,05$). RBF grubunda ve RBF+E Vit grubunda hipokampus NR_{2A} düzeyleri GTN grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşüktü (RBF: 218 ± 99 konsantrasyon değeri; RBF+E Vit: 88 ± 98 konsantrasyon değeri sırasıyla $p=0,05$ ve $p=0,05$). Bununla birlikte, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında RBF grubunda hipokampus NR_{2A} düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olmayan derecede yüksek ($p=0,13$) fakat RBF+E Vit grubunda ise anlamlı olmayan derecede düşüktü ($p:0,51$). Yine, hipokampus NR_{2A} düzeyleri RBF+E Vit grubunda RBF grubundakinden anlamlı olmayan derecede düşüktü ($p=0,13$) (Şekil 12).



Şekil 12. Rat hipokampal NR2A seviyeleri. Grafikte ortalama değerler ve standart sapmalar verilmiştir

Hipokampus NR_{2B} düzeyleri, kontrol grubunda 100±38 konsantrasyon değeri ve GTN uygulanarak deneysel başağrısı modeli oluşturulan grupta 180±20 konsantrasyon değeri olarak ölçüldü ve iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıydı (p=0,05). RBF grubunda ve RBF+E Vit grubunda hipokampus NR_{2B} düzeyleri GTN grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşüktü. (RBF:95±30 konsantrasyon değeri; RBF+E Vit:119±16 konsantrasyon değeri; sırasıyla p=0,05 ve p=0,05). Bununla birlikte, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında RBF grubunda hipokampus NR_{2B} düzeyleri anlamlı olmayan derecede düşük (p=0.82) fakat RBF+E Vit grubunda ise anlamlı olmayan derecede yüksekti (p:0,27). Yine, hipokampus NR_{2B} düzeyleri RBF+E Vit grubunda RBF grubundakinden anlamlı olmayan derecede yüksekti (p=0,27) (Şekil 13).



Şekil 13. Rat hipokampal NR2B seviyeleri. Grafikte ortalama değerler ve standart sapmalar verilmiştir

5. TARTIŞMA

Hücre içi kalsiyum seviyeleri nörotransmitter salınımını etkileyerek, eksitabilite, dendritik integrasyon ve sinaptik plastisite gibi temel nörolojik olayları düzenler (91). Lokal bir stimulus uygulandığında astrositik iletişim sitozolik Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) derişim artışının hücreler arasında yayılmasıyla sağlanır. KYD lokal beyin iyon homeostazında geçici bozulma sonucunda ortaya çıkan ve serebral kortekste 2-3 mm/dakika hızında yayılan geçici nöronal aktivite supresyonudur (94). KYD süresince NO üretimi ve hücre içi Ca^{+2} seviyesi artar (95). NO mitokondriyal solunumu inhibe eder, glutamat taşıyıcıları aracılığıyla glutamat salınımına ve NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna neden olur. Peters ve ark rat neokorteksine lokal KCL uygulanmasından sonra KYD ile eş zamanlı bir astrositik Ca^{+2} artış dalgası olduğunu bildirmişlerdir (96). NMDA reseptörlerinin aktivasyonu kalsiyum-kalmodulin bağımlı NOS aktivitesini artırırken (97), NMDA reseptör antagonistleri KYD’u baskılar (98). NO mitokondriyal solunumu inhibe eder, glutamat taşıyıcıları aracılığıyla glutamat salınımına, NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna ve hücre içine kalsiyum akışına neden olur (66). Ekzojen NO eksitator nörotransmitterler aracılığıyla oluşan KYD ya da nöbetleri kolaylaştırır (60). Nöronal aktivite sırasında hücre dışı potasyum ve kalsiyum seviyelerinde de değişiklikler gözlenmektedir. Anestezi uygulanmış ratlarda stimulus zincirine ve nöbet aktivitesine yanıt olarak kortekste (99,100) ve hipokampusta (101) hücre dışı kalsiyum ($[Ca^{2+}]_o$) seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca anestezi uygulanmış ratlarda KYD süresince $[Ca^{2+}]_o$ seviyeleri düşer. KYD gerileyince $[Ca^{2+}]_o$ normal seviyelere ve hatta normalden daha yüksek değerlere ulaşır (102,103). KYD benzeri bir süreç olan hipoksik yayılan depresyon süresince 37 °C’de hücre dışı kalsiyum yaklaşık 1 mmol azalırken (104) hücre içi kalsiyum 0,2 μ mol’den daha az artar (105). Buna göre KYD süresince hücre dışı kalsiyum düzeyindeki azalma, hücre içi kalsiyum düzeyindeki artmaya göre daha fazladır. Bu durumda KYD süresince total kalsiyum düzeyinde azalma görülmesi olasıdır. Bizim çalışma sonuçlarımız bu hipotezi desteklemektedir. Çalışmamızda total beyin kalsiyum düzeyi, GTN kaynaklı ekzojen NO ile deneysel başağrısı modeli oluşturulmuş ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış olarak bulundu. Ancak elde ettiğimiz sonuç, rat beyin dokusunda total kalsiyum düzeyinin KYD’un gerilediği evrede değerlendirilmesinden de kaynaklanabilir. KYD gerileyince $[Ca^{2+}]_o$ normal seviyelere ve hatta normalden daha yüksek değerlere ulaşır (102,103). Ayrıca

çalışmamızda RBF ve RBF+E Vit gruplarında GTN grubuna göre total beyin kalsiyum düzeyinde anlamlı artış gözlemlendi. Bu sonuçlar riboflavin ve/veya E vitamininin GTN ile başağrısı oluşturulmuş ratlarda beyinde bozulmuş kalsiyum iyon dengesini düzelttiğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda oral olarak günde 400 mg verilen riboflavinin migren profilaksisinde etkili olduğu bulunmuştur (13,15). Granados-soto ve ark riboflavinin antinosiseptif ve antiinflamatuvar etkisinin NO salınımı ve ATP-bağımlı K⁺ kanallarının inhibisyonu aracılığıyla olduğunu göstermişlerdir (17). Riboflavin guanilat siklazı inhibe eder (106) ve guanilat siklaz inhibisyonu presinaptik NO salınımını dolayısıyla hücre içine NMDA aracılı kalsiyum akımını azaltır. Son olarak riboflavinin serebrokortikal sinir uçlarından glutamat salınımını büyük oranda inhibe ettiği ve VKKK'larını baskıladığı gösterilmiştir (107). Bizim çalışmamızda riboflavin uygulanan grupta GTN grubuna göre total beyin kalsiyum düzeyinde anlamlı bir artış saptandı. Bu bulgu hücre içi kalsiyum düzeyindeki artma ile uyumludur. Elde ettiğimiz bu sonuç riboflavinin guanilat siklazı inhibe etmesine ya da VKKK'larını baskılamasına bağlanabilir. Ancak riboflavinin migrende beyin kalsiyum homeostazı üzerine olan etkileri ve etki mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. Riboflavin mitokondrideki elektron transport zincirinde yer alan FMN ve FAD için koenzim görevi yapar. Migrendeki yararlı etkilerinin kompleks I ve kompleks II aktivitesi ve mitokondriyal enerji metabolizmasındaki artış ile oluştuğu iddia edilmektedir (13,16,17). Riboflavin eksikliğinde glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, aldoz redüktaz, sorbitol dehidrogenaz aktivitesi azalır, H₂O₂ seviyesi artar (81). Riboflavinin ekzojen NO ile oluşan bozulmuş beyin kalsiyum iyon dengesini düzeltmesi mitokondriyal enerji metabolizmasını düzeltmesiyle de açıklanabilir. Bu çalışmada RBF+E Vitamini grubunda RBF grubuna göre total beyin kalsiyum düzeyinde anlamlı artış gözlemlendi. Bir serbest radikal olan NO, NMDA reseptörlerinin aktivasyonunu artırır. Serbest oksijen radikalleri ile oluşan oksidatif hasar NMDA reseptörleri ile direkt ilişkilidir. Sonuç olarak E vitamini gibi antioksidanlar NMDA reseptörlerini etkileyebilirler (108). E vitamini NMDA aracılı kalsiyum akımını da etkileyebilir ancak bu konuda farklı çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir. Kasperek bir membran stabilizatörü olarak bilinen E vitamininin hücre membranında Ca⁺²u da içeren farklı iyonlara olan geçirgenliği azalttığını belirtmiştir (109). Oysa, Dyatlov ve ark α-tokoferolün enerjiden yoksun hücreler içine Ca⁺² akımını önemli ölçüde artırdığını

göstermiştir (110). Bizim çalışmamızda ise bu sonuçları destekler bir şekilde E vitamininin total beyin kalsiyum düzeyini artırdığını gördük.

Bu çalışmada ayrıca beyin PMCA düzeyleri de değerlendirilmiştir. Beyinde hücre içi Ca^{+2} seviyeleri kalsiyum bağlayıcı proteinler, ERCA, Na^{+}/Ca^{+2} değiştiriciler, PMCA'dan oluşan sistemler aracılığıyla düzenlenir (111). PMCA sitozolden hücre dışına Ca^{+2} taşınmasından sorumlu primer kalsiyum çıkarıcı sistemdir (98,99) ve ATP'ye bağımlı olarak çalışır. Ayrıca lokal Ca^{+2} sinyalleri ve Ca^{+2} dalgalarının modülasyonu gibi dinamik olayları da düzenler (102). Bizim çalışmamızda GTN uygulanarak başağrısı modeli oluşturulmuş ratlarda kontrol grubuna göre beyin PMCA düzeylerinde anlamlı derecede azalma saptandı. Bu bulgu hücre içi artmış Ca^{+2} düzeylerine bağlı olarak PMCA seviyesinin kompensatuar olarak azalması yönünde değerlendirilebilir. Pottorf II ve ark glutamatın proteazlar aracılığıyla PMCA aktivitesini azalttığını gösterdiler (112). Bizim çalışmamızda da GTN kaynaklı ekzojen NO, glutamat artışına neden olarak proteazlar aracılığıyla PMCA seviyesini azaltmış olabilir. PMCA nöronal hücrelerde Ca^{+2} aracılı sitotoksisteyi azaltır (113) ve oksidatif stres PMCA'nın inaktivasyonu ile sonuçlanır (114). NO beyin dokusunda iskemi reperfüzyon hasarında oksidatif strese aracılık eder (115). Bu çalışmada da PMCA seviyesindeki azalma nitrogliserin kaynaklı ekzojen NO'nin oluşturduğu oksidatif stres nedeniyle olabilir. Ayrıca GTN ile migren modeli oluşturulmuş ratlarda mitokondriyal bozukluğa bağlı olarak azalan ATP miktarı, ATP'ye bağımlı olarak çalışan bu sistemi olumsuz yönde etkiliyor olabilir. Riboflavin ve RBF+E vitamini uygulanan gruplar, GTN uygulanarak başağrısı modeli oluşturulmuş grup ile karşılaştırıldığında PMCA düzeyinde anlamlı artma saptandı. Bu artış RBF+E vitamini uygulanan grupta RBF uygulanan gruba göre daha belirgin olmakla birlikte her iki grupta da kontrol grubundan anlamlı derecede düşüktü. GTN grubunda kontrol grubuna kıyasla düşük olan ve PMCA'nın GTN grubunda baskılandığını düşündüren veriler RBF ve RBF+E Vit grubundaki anlamlı artışla birlikte değerlendirildiğinde riboflavin ve E vitamininin PMCA aktivitesini tam olarak normale döndüremese bile düzeltebildiği şeklinde yorumlanabilir. Nörotoksistide NO aracılığıyla oluşan peroksinitrit mitokondriyal hasar ve ATP azalmasına neden olur (116). Riboflavin ve flavin nükleotidleri kompleks I ve hücresel solunumun güçlü düzenleyicileridir. Riboflavin aerobik enerji metabolizmasında önemli bir yere sahiptir ve mitokondriyal elektron transport

zincirinde yer alan FMN ve FAD için koenzim görevi yapar (117). Bu veriler ışığında nitrogliserin kökenli ekzojen NO kullanarak oluşturduğumuz deneysel başağrısı modelinde riboflavinin ATP bağımlı PMCA aktivitesini artırması beklenen bir sonuçtur ve çalışmamızın bulguları da bunu doğrulamaktadır. Riboflavinin migrendeki yararlı etkisinin mitokondriyal disfonksiyonu düzeltilmesi ve buna bağlı olarak PMCA aktivitesindeki artış üzerinden olması olasıdır. E vitamini doğadaki en güçlü antioksidandır ve hücreleri peroksinitritin oluşturduğu oksidatif hasardan korur (118). Dolayısıyla PMCA üzerinde riboflavinin oluşturduğu etkiyi artırması olasıdır. Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgular riboflavin ve/veya E vitamini doğadaki en güçlü antioksidandır ve hücreleri peroksinitritin oluşturduğu oksidatif hasardan korur (118). Dolayısıyla PMCA üzerinde riboflavinin oluşturduğu etkiyi artırması olasıdır. Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgular riboflavin ve/veya E vitamini doğadaki en güçlü antioksidandır ve hücreleri peroksinitritin oluşturduğu oksidatif hasardan korur (118). Dolayısıyla PMCA üzerinde riboflavinin oluşturduğu etkiyi artırması olasıdır. Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgular riboflavin ve/veya E vitamini doğadaki en güçlü antioksidandır ve hücreleri peroksinitritin oluşturduğu oksidatif hasardan korur (118).

Çalışmamızda total beyin kalsiyum ve beyin PMCA seviyelerine ek olarak hipokampustaki NMDA reseptörlerinin NR_{2A} ve NR_{2B} subtiplerindeki değişiklikler de incelendi. Glutamat santral sinir sistemindeki temel eksisatör nörotransmitterdir (119). Glutamat reseptörlerinden NMDA sodyum ve kalsiyum iyonlarını hücre içine, potasyum iyonlarını hücre dışına taşır ve eksisatör nörotransmisyonu düzenler (120). Glutamat reseptörlerinin aktivasyonu bazı beyin bölgelerinde (örneğin talamus, trigeminal nükleus) pronosiseptif iken, diğer beyin bölgelerinde (örneğin periaquaduktal gri cevher, ventrolateral medulla) antinosiseptif özellik gösterir. NMDA antagonistleri rat beyninde noksiyöz termal stimülasyon ile indüklenen nosiseptif yanıtları inhibe eder (48). Ayrıca NMDA reseptör antagonistleri trigeminal subnükleus kaudalinde nöronal aktiviteyi ve hipersensitiviteyi zayıflatır. Nelligard ve ark tarafından yapılan bir çalışmada NMDA reseptörlerinin aktivasyonunun KYD oluşumunda temel faktör olduğu öne sürülmüştür (121). *In vivo* (122) ve *in vitro* (123) çalışmalarda KYD'un amigdalyaya yayılımının oldukça fazla olduğu ancak hipokampusa yayılımının olmadığı gösterildi. KYD'un hipokampal yayılımındaki bu yetersizliğin nedeni doku birim volümündeki membran alanında azalma olabilir (124). Bizim çalışmamızda NR_{2A} ve NR_{2B} düzeyleri, GTN ile migren modeli oluşturulmuş ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış olarak bulundu. Bu bulgu KYD'un hipokampusa yayılmadığını öne süren çalışmalardan farklı olarak başağrısı modelinde hipokampal NMDA reseptörlerinin de aktive olduğunu göstermektedir. Ancak çalışmanın bir kısıtlılığı

olarak farklı beyin bölgelerinde farklı fizyolojik etkilerle sonuçlanan NMDA reseptör aktivasyonunu karşılaştırabileceğimiz farklı bölgeleri değerlendiremediğimiz ve çalışma bir in vitro, postmortem çalışma olduğu için, hipokampal NMDA aktivitesindeki artışın pronosiseptif ya da antinosiseptif etkiye mi neden olacağını kestirmek güçtür. NO, NMDA reseptörlerinin artmış aktivitesi sonucunda oluşan eksitotoksositeye aracılık eder. Ayrıca NO sitokrom oksidaz seviyesinde mitokondriyal solunumu inhibe eder (125) ve glutamat salınımına neden olur (126). Dolayısıyla bizim çalışmamızda görüldüğü gibi GTN kaynaklı ekzojen NO'nun NMDA reseptör subtiplerini artırması beklenen bir sonuçtur. Glutamat, NO ve superoksit oluşumunu stimüle eder ve nöronlarda peroksinitrit oluşumunu artırır (127). NO ve NMDA reseptör aktivasyonu glutamat aracılı peroksinitrit üretimiyle sonuçlanır. NMDA reseptör antagonistleri glutamat aracılı peroksinitrit oluşumunu azaltır (128). RBF ve RBF+E vitamini uygulanan gruplar, GTN uygulanarak başağrısı modeli oluşturulmuş grup ile karşılaştırıldığında NR_{2A} ve NR_{2B} düzeylerinde anlamlı derecede azalma saptandı. Bu sonuçlar riboflavin ve E vitaminin NO aracılı eksitotoksitede glutamat reseptörlerinin ekspresyonunu azalttığı görüşünü desteklemektedir. Migren patogenezinde hipokampusun önemi tam olarak bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda GTN ile oluşturulmuş başağrısı modelinde hipokampal NMDA reseptörlerinin arttığı görülmüştür. Ayrıca RBF ve/veya E vitamininin GTN kaynaklı ekzojen NO'nun neden olduğu NMDA reseptör aktivasyonunu azalttığı da gösterilmiştir.

Çalışmamızın sonuçları GTN kökenli ekzojen NO'nun ratlarda total beyin kalsiyum ve PMCA seviyelerini azalttığını göstermektedir. RBF ve/veya E vitamini NO'nun neden olduğu bozuk kalsiyum iyon dengesini ve PMCA aktivitesini düzeltmektedir. Çalışmamızda NO'nun rat hipokampusunda NR_{2A} ve NR_{2B} seviyelerini artırdığı da gösterilmiştir. RBF ve/veya E vitamini NO'un NMDA reseptörleri üzerindeki bu etkisini de düzeltmektedir.

ÖZET

RATLARDA GLİSERİL TRİNİTRAT İLE OLUŞTURULAN MİGREN MODELİNDE RİBOFLAVİN/E VİTAMİNİNİN BEYİN KALSİYUM, CA⁺²ATPAZ VE NMDA RESEPTÖRLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Migren toplumda sık görülmesine rağmen, patogenezi hala açık değildir. Riboflavinin temel kullanım alanı migren baş ağrılarının önlenmesidir. Migrendeki etkilerinin mitokondriyal enerji metabolizmasındaki artış ile oluştuğu düşünülmektedir. Ancak etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. E vitamini doğadaki en güçlü antioksidandır ve analjezik etkisi tam olarak bilinmemektedir. Çalışmanın amacı

1) GTN kaynaklı ekzojen NO'nun total beyin kalsiyum düzeyi, PMCA düzeyi ve NMDA reseptörleri üzerine olan etkisini araştırmak,

2) GTN kaynaklı ekzojen NO aracılığıyla oluşturulan baş ağrısı modelinde RBF ve/veya E vitamininin total beyin kalsiyum ve PMCA düzeyleri ve NMDA reseptörleri üzerine olan etkisini araştırmaktır.

Ratlar her grupta 15 fare olacak şekilde ayrıldı. Grup 1; Kontrol grubunu, Grup 2; GTN grubunu, Grup 3; RBF+GTN grubunu, Grup 4; RBF+GTN+E Vit grubunu oluşturdu. Çalışmada 10 gün boyunca grup 1 ve grup 2'ye ilaç uygulanmadı. Grup 3'e riboflavin 100 mg/kg/gün oral, Grup 4'e riboflavin 100 mg/kg/gün oral ve E vitamini 100 mg/kg/günaşırı i.p. uygulandı. Deneyin 11. gününde grup 2, grup 3 ve grup 4'e GTN 10 mg/kg i.p. 3 saat infüze edildi. Grup 1'e SF uygulandı. GTN uygulandıktan bir saat sonra ratlar sakrifiye edildi. Beyin dokusunda total kalsiyum ve PMCA seviyeleri ve hipokampusta NR_{2A}, NR_{2B} seviyesi değerlendirildi. GTN grubunda kontrol grubuna göre total kalsiyum ve PMCA seviyeleri düşük, NR_{2A} ve NR_{2B} düzeyleri anlamlı düzeyde yüksek bulundu. RBF ve RBF+E Vitamini gruplarında total kalsiyum ve PMCA seviyeleri anlamlı derecede yüksek, NR_{2A} ve NR_{2B} düzeyleri anlamlı derecede düşük saptandı.

Sonuçlarımız RBF ve/veya E Vitamininin nitrogliserinin neden olduğu bozulmuş beyin kalsiyum iyon dengesini ve PMCA'ı düzelttiğini, azalmış NR_{2A} ve NR_{2B} seviyelerini artırdığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Migren, Kalsiyum, Riboflavin, E Vitamini

ABSTRACT

EFFECTS OF RIBOFLAVIN AND VITAMIN-E ON BRAIN CALCIUM, Ca^{2+} ATPase AND NMDA RECEPTORS IN EXPERIMENTAL MIGRAINE MODEL DEVELOPED WITH GLYCERIL TRINITRATE IN RATS

Although migraine incidence is highly common in general population, the pathogenesis of this disease is still unclear. The main use of riboflavin is to prevent migraine headaches. The effect of riboflavin on migraine is thought to be mediated by an increase in mitochondrial energy metabolism. However, the mechanism of its action is still unclear. Vitamin E is the most potent antioxidant in nature and its potential analgesic effect is still unclear. The purpose of this study is;

1- to study the effect of GTN-derived exogenous NO-mediated headache on levels of total brain calcium, levels of PMCA and NMDA receptors,

2- to study the effect of RBF and/or Vitamin E on the levels of total brain calcium, levels of PMCA and NMDA receptors in a GTN-derived exogenous NO-mediated headache model.

Rats were assigned into four groups with 15 rats in each group: Group 1; Control group, Group 2; GTN group, Group 3; RBF + GTN group, Group 4; RBF + GTN + Vitamin E group. Group 1 and Group 2 had no medications for the first 10 days of the study. Group 3 received RBF 100 mg/kg/day per orally and group 4 RBF 100 mg/kg/day orally and Vitamin E 100 mg/kg/on alternate day intraperitoneally. On the 11th day of the experiment, GTN 10 mg/kg intraperitoneal infusion was applied to Group 2, Group 3, Group 4 for 3 hours. Group 1 was also applied intraperitoneal SF infusion. Rats were sacrificed after one hour from the infusion of GTN. Levels of total calcium and PMCA in brain and levels of NR_{2A} , NR_{2B} in hippocampus were evaluated. In GTN group, levels of total calcium and PMCA were lower and levels of NR_{2A} , NR_{2B} were significantly higher in comparison to control group. Total levels of calcium and PMCA were significantly higher and levels of NR_{2A} , NR_{2B} were significantly lower in RBF and RBF + Vitamin E groups.

Our results revealed that; RBF and/or Vitamin E improves levels of PMCA and the impaired brain calcium ion balance mediated by nitroglycerine, and increases the diminished levels of NR_{2A} , NR_{2B} .

Keywords: Migraine, Calcium, Riboflavin, Vitamin E

KAYNAKLAR

1. Pietrobon D. Migraine: New molecular mechanisms. *Neuroscientist* 2005;11(4):373-386
2. Tepper SJ, Rapoport A, Sheftell F. The pathophysiology of migraine. *Neurologist* 2001; 7(5):279-286
3. Akerman S, Williamson DJ, Goadsby PJ. Voltage-dependent calcium channels are involved in neurogenic dural vasodilatation via a presynaptic transmitter release mechanism. *Br J Pharmacol* 2003;140(3):558-566
4. Shields KG, Storer RJ, Akerman S and Goadsby PJ. Calcium channels modulate nociceptive transmission in the trigeminal nucleus of the cat. *Neuroscience* 2005;135(1):203-212
5. Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM et al. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type 2 are caused by mutations in the (Ca²⁺) channel gene CACNL1A4. *Cell* 1996;87(3):543-552
6. Ayata C, Shimizu-Sasamata M, Lo EH, Noebels JL, Moskowitz MA. Impaired neurotransmitter release and elevated threshold for cortical spreading depression in mice with mutations in the alpha1A subunit of P/Q type calcium channels. *Neuroscience* 2000; 95(3):639-645
7. Pietrobon D. Function and dysfunction of synaptic calcium channels: insights from mouse models. *Curr Opin Neurobiol* 2005;15(3):257-265
8. Missiaen L, Robberecht W, van den Bosch L, Callewaert G, Parys JB, Wuytack F et al. H. Abnormal intracellular Ca²⁺ homeostasis and disease. *Cell Calcium* 2000;28(1):1-21
9. Dreier JP, Kleeberg J, Petzold G, Priller J, Windmüller O, Orzechowski HD, et al. Endothelin-1 potently induces Leao's Cortical Spreading Depression in vivo in the rat a model for an endothelial trigger of migrainous aura. *Brain* 2002;125(1):102-112
10. Lauritzen M. Pathophysiology of migraine aura: The spreading depression theory. *Brain* 1994;117(1):199-210
11. Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev* 2001;81(4):1065-1096
12. Schoenen J, Lenearts M, Bastings E. High dose riboflavin as a prophylactic treatment of migraine: results of an open pilot study. *Cephalalgia* 1994;14(5):328-329
13. Schoenen J, Jacquy J, Lenaerts M. Effectiveness of high-dose riboflavin in migraine prophylaxis: a randomized controlled trial. *Neurology* 1998; 50(2):466-470
14. França DS, Souza AL, Almeida KR, Dolabella SS, Martinelli C, Coelho MM. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. *Eur J Pharmacol* 2001;421(3):157-164
15. Boehnke C, Reuter U, Flach U, Schuh-Hofer S, Einhaupl KM, Arnold G. High-dose riboflavin treatment is efficacious in migraine prophylaxis: an open study in tertiary care centre. *Eur J Neurol* 2004;11(7):475-477

16. Scholte HR, Busch HF, Bakker HD, Bogaard JM, Luyt- Houwen IE, Kuyt LP. Riboflavin-responsive complex I deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271(1):75-83
17. Granados-Soto V, Terán- Rosales F, Rocha-González HI, Reyes-García G, Medina-Santillán R, Rodríguez-Silverio J, Flores Murrietta FJ. Riboflavin reduces hyperalgesia and inflammation but not tactile allodynia in the rat. *Eur J Pharmacol* 2004;492(1):35-40
18. Tucker JM, Townsend DM. Alpha-Tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomed Pharmacother* 2005;59(7):380-387
19. Zingg JM, Azzi A. Non-antioxidant activities of vitamin E. *Curr Med Chem* 2004;11(9):1113-1133
20. Nazıroğlu M. Molecular Mechanisms of Vitamin E on Intracellular Signalling Pathways in Brain. In: Goth L, editor. Press: Kerala, India. 2007;239-256
21. Graves BW. Management of migraine headaches. *J Midwifery Women's Health* 2006;51(3):174-184
22. Siva A. Migren. Baş Boyun ve Bel Ağrıları. Siva A, Hancı M editörler. 30, İstanbul 2002:39-50
23. Özön Ö, Bolay H. Primer Baş ağrılarında Tanı ve Tedavi Yaklaşımları. *Türk Nöroşir Derg* 2003;13:97-112
24. The Ad Hoc Committee on Classification of Headache. *Arch Neurol* 1962;6(3):173-176
25. International Headache Society. Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgia and facial pain. *Cephalalgia* 1988;8(7):1-96
26. Buzzi MG, Moskowitz MA. The Pathophysiology of migraine: year 2005. *JHeadache Pain* 2005; 6(3):105-111
27. Graham JR, Wolff HG. Mechanism of migraine headache and action of ergotamine tartrate. *Arch Neurol Psychiatr* 1938;39:737-763
28. Silberstein SD. Migraine pathophysiology and its clinical implications. *Cephalalgia* 2004;24:(2):2-7
29. Welch KMA. Concepts of migraine headache pathogenesis: insights into mechanisms of chronicity and new drug targets. *Neurol Sci* 2003;24(2):149-153
30. Shibata K, Osawa M, Iwata M. Pattern reversal visual evoked potentials in migraine with aura and migraine aura without headache. *Cephalalgia* 1998; 18: 319-23
31. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boast DA, Moskowitz MA Intrinsic brain activity triggers terminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 2002;8(2):136-142
32. Borsook D, Burstein R, Moulton E, Becerra L. Functional imaging of migraine and the trigeminal system. *Headache* 2006;46(1):32-38
33. Edvinsson L, Uddman R. Neurobiology in primary headache. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;48(3)438-456

34. Weiller C, May A, Limmroth V, Jüptner M, Kaube H, Schayck RV et al. Brain stem activation in spontaneous migraine attacks. *Nat Med* 1995;1(7):658-660
35. Pietrobon D, Striessing J. Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(5):386-398
36. Foster CT. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell* 2007;6(3):319-325
37. Berridge MJ. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 1997;499(2):291-306
38. Friend KL, Crimmins D, Phan TG, Sue CM, Colley A, Fung VS et al. Detection of a novel missense mutation and second recurrent mutation in the CACNA1A gene in individuals with EA-2 and FHM. *Hum Genet* 1999;105(3):261-265
39. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca⁺² channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:521-555
40. Nicholson C. Modulation of extracellular calcium and its functional implications. *Fed Proc* 1980;39(5):1519-1523
41. Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 1990; 247(4 941):470-473
42. Martins-Ferreira H, Nedergaard M, Nicholson C. Perspectives on spreading depression. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;32(1):215-234
43. Burstein R, Yamamura H, Malik A, Strassman AM. Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brainstem trigeminal neurons. *J Neurophysiol* 1988;79(2):964-982
44. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2000;288(5472):1765-1769
45. Dodick D, Silberstein S. Central sensitization theory of migraine: clinical implications *Hedacache* 2006;46(4):182-191
46. Ebersberger A, Portz S, Meissner W. Effects of N-,P/Q- and L-type calcium channel blockers on nociceptive neurones of the trigeminal nucleus with input from the dura. *Cephalalgia* 2004;24(4):250-261
47. Weinberg RJ, Conti F, Van Eyck SL. Glutamate immunoreactivity in superficial laminae of rat dorsal horn and spinal trigeminal nucleus. In Hicks TP, Lodge D, McLennan H Editors, New York, 1987;173-176
48. Fundytus ME. Glutamate receptors and nociception. *CNS Drugs* 2001;15(1):29-58
49. Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 1992;258(5082):597-603
50. Vikelis M, Mitsikostas DD. The role of glutamate and its receptors in migraine. *CNS Neuro Disord Drug Targets* 2007;6(4):251-257

51. Gartwaite J, Chaeles SL, and Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggest role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988;336:(6197)385-388
52. Ayata C, Moskowitz MA. Cortical spreading depression confounds concentration-dependent pial arteriolar dilation during N-methyl-D-aspartate superfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290(5):1837-1841
53. Lauritzen M, Hansen AJ. The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992;12(2):223-229
54. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298(2):249-258
55. Sarchielli P, Alberti A, Russo S, Codini M, Panico R, Floridi A et al. Nitric oxide pathways, Ca⁺² and serotonin contents in platelets from patients suffering from chronic daily headache. *Cephalalgia* 1999;19:810-816
56. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43(2):109-142
57. Mayer B. Regulation of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase. *Cell Biochem Funct* 1994;12(3):167-177
58. Toda N, Ayajiki K, Okumura T. Inhibition of nitroxidergic nerve function by neurogenic acetylcholine in monkey cerebral arteries. *J Physiol* 1997;498(2):453-461
59. Toda N, Okumura T. Reciprocal regulation by putatively nitroxidergic and adrenergic nerves of monkey and dog temporal arterial tone. *Am J Physiol* 1991;261(2)1740-1745
60. Myers DE. Potential neurogenic and vascular roles of nitric oxide in migraine headache and aura. *Headache* 1999;39(2):118-124
61. Türköz Y, Özerol E. Nitrik oksidin etkileri ve patolojik rolleri. *Journal of Turgut Özal Medical Center* 1997;4(4):453-461
62. Dawson VL. Nitric oxide: role neurotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;122(4):305-308
63. Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995;57:683-706
64. Bolanos JP, Almedia A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB et al. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 1997;68(6):2227-2240
65. Almeida A, Heales SJR, Bolanos JP, Medina JM. Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Research* 1998;790(1-2):209-216

66. Bal-Price A and Brown GC. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *Journal Neurosci* 2001;21(17):6480–6491
67. Viggiano E, Ferrara D, Izzo G, Viggiano A, Minucci S, Monda M et al. Cortical spreading depression induces the expression of iNOS, HIF-1 α , and LDH-A. *Neuroscience* 2008;153(1):182-188
68. Ulmer HJ, de Lima VM, Hanke W. Effects of nitric oxide on the retinal spreading depression. *Brain Res* 1995;691(1-2):523-535
69. Iversen IK, Olesen J, Tfelt-Hansen P. Intravenous nitroglycerin as an experimental model of vascular headache. Basic characteristics. *Pain* 1989;38(1):17-24
70. Olesen J, Thomsen LL, Lassen LH, Olesen IJ Nitric oxide hypothesis of migraine and other vascular headache. *Cephalalgia* 1995;15(2):94-100
71. Torfgard K, Ahlner J, Axelsson KL, Norlander B, Bertler A. Tissue levels of glyceryl trinitrate and CGMP after in vivo administration in rat, and the effect of tolerance development. *Can J Physiol Pharmacol* 1991;69(9):1257-1261
72. Aley KO, McCarter G, Levine JD. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci* 1998;18(17):7008-7014
73. Ferreira J, Santos AR, Calixto JB. The role of systemic spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide- c GMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intratechal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacology* 1999;38(6):835-842
74. Tassorelli C, Joseph SA, Nappi G. Neurochemical mechanisms of nitroglycerin induced neuronal activation in rat brain: a pharmacological investigation. *Neuropharmacology* 1997 36(10):1417-1424
75. Wei EP, Moskowitz MA, Boccalini P, Kontos HA. Calcitonin gene related peptide mediates nitroglycerine and sodium nitroprusside induced vasodilation in feline cerebral arterioles. *Circ Res* 1992;70(6):1313-1319
76. Reuter U, Chiarugi A, Bolay H, Moskowitz MA. Nuclear factor- κ B as a molecular target for migraine therapy. *Ann Neurol* 2002;51(4):507-516
77. Lassen LH, Ashina M, Christiansen I. NO synthase inhibition in migraine. *Lancet* 1997;349(9049):401-402
78. Iversen IK, Olesen J. Nitroglycerin-induced headache is not dependent on histamine release: support for a direct nociceptive action of NO. *Cephalalgia* 1994;14(6):437-442
79. Powers HJ. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am J Clin Nutr* 2003;77(6):1352-1360
80. Roje S. Vitamin B biosynthesis in plants. *Phytochemistry* 2007;68(14):1904-1921
81. Depeint F, Bruce WB, Shangari N. Mitochondrial function and toxicity: Role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. *Chem Biol Interact* 2006;163(1-2):94-112

82. Innis WS, McCormick DB, Merrill AH. Variations in riboflavin binding by human plasma: identification of immunoglobulins as the major proteins responsible. *Biochem Med* 1985;34(2):151-165
83. Singer TP, Kenney WC. Biochemistry of covalently-bound flavins. *Vitam Horm* 1974; 32:1-45
84. Bertollo CM, Oliveira ACP, Rocha LT, Costa CA, Nascimento EB Jr, Coelho MM. Characterization of antinociceptive and anti-inflammatory activities of riboflavin in different experimental models. *Eur J Pharmacol* 2006;547(1-3):184-191
85. Vatassery GV, Lai JCK, DeMaster EG, Smith WE, Quach HT. Oxidation of vitamin E and vitamin C and inhibition of brain mitochondrial oxidative phosphorylation by peroxynitrite. *Journal Neurosci Res* 2004;75(6):845-853
86. Kim HK, Kim JH, Gao X, Zhou JL, Lee I, Chung K, Chung JM. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain* 2006;122(1-2):53-62
87. Carafoli E. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol Rev* 1991;71(1):129-153
88. Garcia ML, Strehler EE. Plasma membrane calcium ATPases as critical regulators of calcium homeostasis during neuronal cell function. *Front Biosci* 1999;4:869-892
89. Jiang L, Fernandes D, Mehta N, Bean JL, Michaelis ML, Zaidi A. Partitioning of the plasma membrane Ca^{+2} ATPase into lipid rafts in primary neurons: effects of cholesterol depletion. *J Neurochem* 2007;102(2):378-388
90. Pekiner BD, Evcimen ND, Nebioğlu S. Diabetes induced decrease in rat microsomal Ca^{+2} ATPase. *Cell Biochem Funct* 2005;23:239-243
91. Burette A, Rockwood JM, Strehler EE, Weinberg RJ. Isoform-specific distribution of the PMCA in the rat brain. *J Comp Neurol* 2003;467(4):464-476
92. Williams TI, Combs JC, Thakur AP, Strobel HJ, Lynn BC. A novel Bis-Tris running buffer system for doubled sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis* 2006;27(14):2984-95
93. Niggli V, Adunyah ES, Penniston JT, Carafoli E. Purified $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ of the erythrocyte membrane. Reconstitution and effect of calmodulin and phospholipids. *J Biol Chem* 256(1):395-401,1981
94. Martins-Ferreira H, Nedergaard M, Nicholson C. Perspectives on spreading depression. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;32(1):215-234
95. Peters O, Schipke CG, Hashimoto Y, Kettenmann H. Different mechanisms promote astrocyte Ca^{+2} waves and spreading depression in the mouse neocortex. *J Neurosci* 2003;23(30):9888-9899
96. Hansen AJ, Zeuthen T. Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol Scand* 1981;113(4):437-445

97. Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signalling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995;57:683-706
98. Obrenovitch TP, Zilkha E. Inhibition of cortical spreading depression by L-701,324, a novel antagonist at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Br J Pharmacol* 1996;117(5):931-937
99. Heinemann U, Lux HD, Gutnick MJ. Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in cerebral cortex of the cat. *Exp Brain Res* 1977;27(3-4):237-243
100. Heinemann U, Louvel J. Changes in $(Ca^{+2})_o$ and $(K^+)_o$ during repetitive electrical stimulation and during pentetrazol induced seizure activity in the sensorimotor cortex of cats. *Pflugers Arch* 1983;398(4):310-317
101. Somjen GG, Giacchino JL. Potassium and calcium concentrations in interstitial fluid of hippocampal formation during paroxysmal responses. *J Neurophysiol* 1985;53(4):1098-1108
102. Krnjevic K, Morris ME, Reiffenstein RJ, Ropert N. Depth distribution and mechanism of changes in extracellular K^+ and Ca^{+2} in the hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol* 1982;60(12):1658-1671
103. Lian XY, Stringer JL. Astrocytes contribute to regulation of extracellular calcium and potassium in the rat cerebral cortex during spreading depression. *Brain Res* 2004;1012(1-2): 177-184
104. Jing J, Aitken PG, Somjen GG. Role of calcium channels in spreading depression in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1993;604(1-2):251-259
105. Wang J, Chambers G, Cottrell JE, Kass IS. Differential fall in ATP accounts for effects of temperature on hypoxic damage in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 2001;83(6):3462-3471
106. Galagan ME, Mordvintcev PI, Vanin AF. Effect of riboflavin on hypotensive activity of dinitrosyl iron complex with thiosulphate. *Eur J Pharmacol* 1991;203(2):325-326
107. Wang SJ, Wu WM, Yang FL. Vitamin B2 inhibits glutamate release from rat cerebrocortical nerve terminals. *Neuroreport* 2008;19(13):1335-1338
108. Villayandre BM, Paniagua MA, Lopez AF. Effect of vitamin E treatment on NMDA receptor at different ages in the rat brain. *Brain Res* 2004;1028(2):148-155
109. Kasperek, S. Chemistry of tocopherols and tocotrienols In: Machlin, L. J. editor. New York. 1980;7-65
110. Dyatlov VA, Makovetskaia VV, Leonhardt R, Lawrence DA, Carpenter DO. Vitamin E enhances Ca^{+2} -mediated vulnerability of immature cerebellar granule cells to ischemia. *Free Radic Biol Med* 1998;25(7):793-802
111. Zaidi A, Michaelis ML. Effects of reactive oxygen species on brain synaptic PMCA. *Free Radic Biol Med* 1999;27(7-8):810-821

112. Pottorf II WJ, Johans TM, Derrington SM, Strehler EE, Enyedi A, Thayer SA. Glutamate-induced protease-mediated loss of plasma membrane Ca^{+2} pump activity in rat hippocampal neurons. *Journal of Neurochem* 2006;98(5):1646-1656
113. Garcia ML, Usachev YM, Tayer SA, Strehler EE, Windebank AJ. Plasma membrane calcium ATPase plays a role in reducing Ca^{+2} -mediated cytotoxicity in PC12 cells. *J Neurosci Res* 2001;64(6):661-669
114. Zaidi A, Barfon L, Sharov VS, Schöneich C, Michaelis EK, Michaelis ML. Oxidative inactivation of purified PMCA hydrogen peroxide and protection by calmodulin. *Biochemistry* 2003;42(41):12001-12010
115. Zinchuk VV, Dorokhina LV. Blood oxygen transport in rats under hypothermia combined with modification of the L-arginin- NO pathway. *Nitric Oxide* 2002;6(1):29-34
116. Bolaños JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, Heales SJ. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 1997;68(6):2227-2240
117. Mazzi EA, Soliman KFA. Effects of enhancing mitochondrial oxidative phosphorylation with reducing equivalents and ubiquinone on 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity and complex I-IV damage in neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 2004;67(6):1167-1184
118. Vatassery GT, Smith WE and Quach HT. α -Tocopherol in rat brain subcellular fractions is oxidized rapidly during incubations with low concentrations of peroxynitrite. *J Nutr* 1998;128(2):152-157
119. Greenamyre JT, Porter RH. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology* 1994; 44(11): 7-13
120. Husi H. Labmeeting citation: NMDA receptors, neural pathways, and protein interaction databases. *Int rev neurobiol* 2004;61:49-77
121. Nellgard B, Wioloch T. NMDA-receptor blockers but not NBQX, an AMPA-receptor antagonist, inhibit spreading depression in the rat brain. *Acta Physiol Scand* 1992;146(4):497-503
122. Fifkova E, Syka J. Relationships between cortical and striatal spreading depression in rat. *Exp Neurol* 1964;9:355-366
123. Buchheim K, Weissinger F, Siegmund H, Holtkamp M, Schuchmann S, Meierkord H. Intrinsic optical imaging reveals regionally different manifestation of spreading depression in hippocampal and entorhinal structures in vitro. *Exp Neurol* 2002;175(1):76-86
124. Bures J, Buresova O, Fifkova E. The mechanisms and applications of Leao's Spreading Depression of electroencephalographic activity. Academic Press, New York, 1974
125. Parathath SR, Parathath S, Tsirka SE. Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain barrier in tPA dependent excitotoxic injury in mice. *J Cell Sci* 2006;119(2):339-349

126. McNaught KSP, Brown GC, Nitric oxide causes glutamate release from brain synaptosomes. *J Neurochem* 1998;70(4),1541-1546
127. Gunasekar P.G. Kanthasamy A.G. Borowitz J.L. Isom G.E. Nitric oxide causes glutamate release from brain synaptosomes *J Neurochem* 1995;65:2016-2021
128. Scotta GS, Bowmana SR, Smithb T, Flower RJ, Bolton J. Glutamate-stimulated peroxynitrite production in a brain-derived endothelial cell line is dependent on N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor activation. *Biochem Pharmacol* 2007;73(2):228-236

EK-1

1.1. Aurasız Migren

Tanım: 4-72 saat süren ataklarla görülen yineleyici başağrısı bozukluğudur. Başağrısının tipik özellikleri tek taraflı yerleşme, zonklayıcı nitelikte olma, orta veya şiddetli derecede olma, rutin fiziksel aktivite ile alevlenme ve mide bulantısı ve/veya fotofobi ve fonofobi ile ilişkili değildir.

Tanı Ölçütleri

- A.** B-D ölçütlerini karşılayan en az 5 atak
- B.** 4-72 saat süren başağrısı atakları (tedavi edilmemiş ya da başarısızca tedavi edilmiş)
- C.** Aşağıdaki en az iki özelliği içeren başağrısı
 - 1. Tek taraflı yerleşme
 - 2. Zonklayıcı karakterde
 - 3. Orta veya şiddetli ağrı
 - 4. Rutin fiziksel aktivite ile ağrının şiddetlenmesi ve aktivitelerden kaçınma (yürüme veya merdiven çıkma gibi)
- D.** Ağrıya aşağıdaki semptomlardan en az birinin eşlik etmesi
 - 1. Bulantı ve/veya kusma
 - 2. Fotofobi ve fonofobi
 - 3. Başka bir bozukluğa bağlı olmama

1.2. Auralı Migren (Klasik Migren, Oftalmik, Hemiparestezik, Hemiplejik ya da Afazik Migren)

Tanımı: Geri dönüşümlü fokal nörolojik belirtilerin, 5-20 dakikadan fazla ve 60 dakikadan az sürdüğü, tekrarlayıcı ataklarla karakterize baş ağrısı hastalığıdır. Aura belirtilerini genellikle migren tipi başağrısı izler.

Tanı Ölçütleri

A. B ölçütlerini dolduran en az 2 atak olmalı

B. Aşağıda belirtilen 4 özellikten en az 3 tanesi olmalı:

1. Bir ya da daha fazla sayıda, tümüyle geri dönüşümlü olan ve fokal serebral kortikal ve/veya beyin sapı fonksiyon bozukluğuna işaret eden aura belirtilerinin olması

2. Dört dakikadan daha uzun sürede yavaş yavaş gelişen en az bir aura belirtisi ya da 2 veya daha fazla sayıda birbiri ardı sıra gelişen belirtiler

3. Aura belirtileri 60 dakikadan uzun sürmemeli

4. Baş ağrısı, aurayı takiben 60 dakika içinde gelişmeli (baş ağrısı aura olmadan önce veya aura ile birlikte başlamış olabilir)

C. Organik hastalık işareti olmamalı

1.2.1. Tipik Auralı Migren

Tanımı: Tipik aura, görsel, duysal ve konuşma ile ilgili belirtilerden oluşur.

Tanı Ölçütleri

A. B-D ölçütlerini tamamen dolduran en az iki atak olmalı

B. Kas gücü kaybı olmaksızın aura aşağıdaki özelliklerden en az birini taşımalı:

1. Tamamen geri dönüşümlü pozitif özellikleri (ışık titremeleri, noktalar ya da çizgiler) veya negatif özellikleri (görme kaybı) içeren görsel belirtiler

2. Tamamen geri dönüşümlü pozitif özellikleri (toplu iğne ve iğne) veya negatif özellikleri (uyuşukluk) içeren duysal belirtiler

3. Tamamen geri dönüşümlü disfazik konuşma bozukluğu

C. Aşağıdakilerden en az iki tanesi olmalı:

1. Homonim görsel belirtiler veya tek yanlı duysal belirtiler

2. Beş dakika veya daha fazla sürede gelişen en az bir aura belirtisi veya daha fazla sürede ard arda gelişen farklı aura belirtileri

3. Her belirti 5-60 dakika sürmeli

D. Aura sırasında veya aurayı izleyen 60 dakika içinde aurasız migren için olan tüm B-D ölçütlerini taşıyan başağrısı

E. Başka bir organik hastalık işareti olmamalı

1.2.2. Tipik Auralı Migren Dışı Baş Ağrısı

Tanımı: Tipik aura, görsel, duysal ve konuşma ile ilgili belirtilerden oluşur. Başağrısı aurasız migren tanı ölçütlerini taşımaz.

Tanı Ölçütleri

A. B-D ölçütlerini tamamen dolduran en az iki atak olmalı

B. Kas gücü kaybı olmaksızın aura aşağıdaki özelliklerden en az birini taşımalı:

1. Tamamen geri dönüşümlü pozitif özellikleri (ışık titremeleri, noktalar ya da çizgiler) veya negatif özellikleri (görme kaybı) içeren görsel belirtiler

2. Tamamen geri dönüşümlü pozitif özellikleri (toplu iğne ve iğne) veya negatif özellikleri (uyuşukluk) içeren duysal belirtiler

3. Tamamen geri dönüşümlü disfazik konuşma bozukluğu

C. Aşağıdakilerden en az iki tanesi olmalı:

1. Homonim görsel belirtiler veya tek yanlı duysal belirtiler

2. Beş dakika veya daha fazla sürede gelişen en az bir aura belirtisi, 5 dakika veya daha fazla sürede ard arda gelişen farklı aura belirtileri

3. Her belirti 5-60 dakika sürmeli

D. Aura sırasında veya aurayı izleyen 60 dakika içinde aurasız migren için olan tüm B-D ölçütlerini taşımayan başağrısı

E. Başka bir organik hastalık işareti olmamalı

1.2.3. Baş Ağrısız Tipik Aura

Tanım: Burada başağrısı hiç gelişmez ya da auradan sonraki 60 dakika içinde başlamaz. 40 yaşından sonra başlaması, negatif görsel belirtilerin olması, çok uzun veya çok kısa sürmesi öncelikle diğer nedenlerin araştırılmasını gerektirir.

1.2.4. Ailesel Hemiplejik Migren (AHM)

Tanım: Kas gücü kaybı şeklinde aurası olan migren baş ağrısıdır. En az bir tane birinci veya ikinci derece yakınında motor güçsüzlük şeklinde aurası olan migren baş ağrısının bulunması bu tanıyı düşündürmelidir. AHM’de ataklarda bilinç bozukluğu, konfüzyon, ateş, BOS’da pleositoz bulunabilir. Hafif bir kafa travmasıyla tetiklenebilir. % 50’ sinde süregelen ilerleyici serebellar ataksi migren ataklarından bağımsız olarak görülebilir.

Tanı Ölçütleri

A. B-C’ yi karşılayan en az 2 atak

B. Aura olarak tamamen düzelen motor güçsüzlüğün ve aşağıdakilerden en az birinin olması

1. Tamamen geri dönüşümlü görsel belirtiler

2. Tamamen geri dönüşümlü duysal belirtiler

3. Tamamen geri dönüşümlü disfazik konuşma bozukluğu

C. Aşağıdakilerden en az 2’si:

1. En az bir aura belirtisinin 5 dakikadan uzun sürede gelişmesi ve/veya farklı aura belirtilerinin 5 dakikada gelişmesi

2. Her bir aura belirtisi 5 dakika ile 24 saat içinde sonlanır.

3. Aurasız migren ölçütlerini karşılayan baş ağrısının aura sırasında ya da auradan sonraki 60 dakika içinde başlaması

D. 1. veya 2. derece yakınlarında en az bir tane hemiplejik migren hastasının olması

E. Diğer bir hastalıkla ilişkili olmaması

Not: AHM sıklıkla baziler tipte belirti verir.

1.2.5. Sporadik Hemiplejik Migren

Tanım: Hastada kas gücü kaybı ile birlikte olan auralı migren atağı görülürken; birinci derece ya da ikinci derece akrabalarında kas gücü kaybıyla giden auralı migren hikayesi bulunmamalıdır.

Tanı Ölçütleri

A. B-C ölçütlerini tamamen dolduran en az iki atak olmalı

B. Aura, tamamen geri dönüşümlü kas gücü kaybı ile aşağıdaki özelliklerden en az birini taşımalı:

1. Tamamen geri dönüşümlü pozitif özellikleri (ışık titremeleri, noktalar ya da çizgiler) veya negatif özellikleri(görme kaybı) içeren görsel belirtiler

2. Tamamen geri dönüşümlü pozitif özellikleri (toplu iğne ve iğne) veya negatif özellikleri (uyuşukluk) içeren duysal belirtiler

3. Tamamen geri dönüşümlü disfazik konuşma bozukluğu

C. Aşağıdakilerden en az iki tanesi olmalı:

1. Beş dakika veya daha fazla sürede gelişen en az bir aura belirtisi veya 5 dakika veya daha fazla sürede ard arda gelişen farklı aura belirtileri

2. Her belirti 5 dakikadan uzun, 24 saatten kısa sürmeli

3. Aura sırasında veya aurayı izleyen 60 dakika içinde aurasız migren için olan tüm B-D ölçütlerini taşıyan baş ağrısı

D. Birinci ya da ikinci derece akrabalarda A-E ölçütlerinin tamamını taşıyan ataklar olmamalı

E. Başka bir organik hastalık işareti olmamalı

1.2.6. Baziler-Tip Migren (Baziler Arter Migreni, Baziler Migren)

Tanımı: Baziller migren diyebilmek için, motor zaaf olmaksızın her iki oksipital hemisferden ve/veya beyin sapından kaynaklanan aura belirtilerini içeren migren atağı olmalıdır.

Tanı Ölçütleri

A. B-D ölçütlerini tamamen dolduran en az iki atak olmalı

B. Kas gücü kaybı olmaksızın aura aşağıdaki tamamen geri dönüşümlü belirtilerin en az iki tanesini içermeli:

1. Dizartri

2. Vertigo
3. Tinnitus
4. İşitme kaybı
5. Diplopi
6. Her iki gözde temporal ve nazal görme alanlarını içeren görsel belirtiler
7. Ataksi
8. Bilinç düzeyinde bozulma
9. Eş zamanlı iki yanlı paresteziler

C. Aşağıdakilerden en az bir tanesi olmalı:

1. Beş dakika veya daha fazla sürede gelişen en az bir aura belirtisi veya 5 dakika veya daha fazla sürede ard arda gelişen farklı aura belirtileri

2. Her belirti 5-60 dakika sürmeli

D. Aura sırasında veya aurayı izleyen 60 dakika içinde aurasız migren için olan tüm B-D ölçütlerini taşıyan baş ağrısı

E. Başka bir organik hastalık işareti olmamalı

1.3. Migrenin Sıklıkla Öncüsü Olan Çocukluk Çağının Periyodik Sendromları

1.3.1. Periyodik Kusmalar

Tanım: Tekrarlayan bulantı ve kusma atakları vardır ve bu ataklar birbirinin aynısıdır. Atak sırasında halsizlik ve solukluk vardır. Çocuk ataklar arasında normaldir. Tespit edilebilen herhangi bir gastrointestinal sistem hastalığı yoktur.

Tanı Ölçütleri

- A. B ve D' ye uyan en az 5 atak,
- B. Tekrarlayan ataklar, yoğun bulantı ve kusma 1 saat – 5 gün devam eder,
- C. Ataklardaki kusma en az saatte 4 kez olur ve 1 saat sürer,
- D. Ataksız dönemde normaldir,
- E. Başka bir hastalığa bağlı değildir.

1.3.2 Abdominal Migren

Tanım: İdiyopatik tekrarlayan bir bozukluktur.1-72 saat süren karın ağrısı vardır. Ağrı orta-ağır şiddettedir ve vazomotor belirtilerle, bulantı ve kusma ile ilişkilidir. Gastrointestinal sistem hastalığı veya renal hastalık öyküsü yoktur.

Tanı Ölçütleri

- A. B-D'yi karşılayan en az 5 atak olmalı,
- B. 1-72 saat süren karın ağrısı,
- C. Karın ağrısı aşağıdaki özelliklerden tümünü karşılamalı:
 - 1. Orta hatta, göbek etrafında yerleşim,
 - 2. Künt vasıflı,
 - 3. Orta-ağır şiddetli,
- D. Ağrı sırasında aşağıdakilerden en az 2'sinin olması:
 - 1. İştahsızlık,
 - 2. Bulantı,
 - 3. Kusma,
 - 4. Solukluk,
- E. Başka bir hastalığa bağlı olmamalı.

1.3.2. Çocukluk Çağının Benign Paroksizmal Vertigosu

Tanım: Kısa süreli baş dönmesi atakları olur. Uyarıcı belirtiler yoktur. Kendiliğinden geçer. Bazı ataklarda başağrısı ile birlikte ilişkili olarak nistagmus veya kusma görülebilir

Tanı Ölçütleri

- A. B-D'yi karşılayan en az 5 atak
- B. Dakikalar veya saatler içinde kendiliğinden geçen çoklu ağır baş dönmesi atakları,

C. Nörolojik muayene, odyometrik testler ve vestibüler fonksiyonlar ataklar arasında normaldir,

D. EEG normaldir.

1.4. Retinal Migren

Tanım: Tekrarlayan ataklar şeklinde monooküler görsel bozukluk (skotom, körlük) ve eşlik eden migren baş ağrısı vardır.

Tanı Ölçütleri

A. B ve D' yi karşılayan en az iki atak,

B. Atak sırasında tamamen geri dönüşümlü olan monooküler görsel olayların (sintilasyonlar, skotomlar, körlük vb) olması (muayene veya hastanın atak sırasında mevcut durumu çizmesi ile doğrulanan),

C. 1.1. Aurasız migren ölçütlerini karşılayan baş ağrısının aura sırasında ya da 60 dakika içinde başlaması,

D. Normal oftalmolojik muayene,

E. Başka bir hastalığa bağlı değildir.

1.5. Migren Komplikasyonları

1.5.1. Kronik Migren

Tanım: İlaç aşırı kullanımının bulunmadığı, ayda 15 ya da daha fazla gün olan, toplam 3 aydan fazla olan migren baş ağrısı.

Tanı Ölçütleri

Son 3 ay için ayda 15 gün veya daha fazla süre için 1.1 aurasız migren ölçütlerinden C ve D'nin karşılanması, başka bir hastalığa bağlı olmaması .

1.5.2. Migren Statusu

Tanım: 72 saatten uzun süren ve işten düşüren migren atağının olması.

Tanı Ölçütleri

A. Hastadaki mevcut baş ağrısı atağı 1.1 aurasız migren ölçütlerini süre haricinde karşılar.

B. Baş ağrısında aşağıdakilerden ikisinin olması:

1. 72 saatten uzun sürmesi.

2. Ağır şiddette olması.

C. Başka bir hastalığa bağlı değildir.

1.5.3. İnfarktsız Persistan Aura

Tanım: Aura belirtileri bir haftadan uzun süre devam eder.

1.5.4. Migrenöz İnfarkt

Tanım: Bir ya da daha fazla migren aurası iskemik beyin lezyonu ile ilişkilidir.

Görüntülemeye ilgili bölgede infarkt alanı tespit edilir. 60 dakikanın üzerinde seyreden auralı tek atak dışında tüm ağrıları auralı migrene uyar.

1.5.5. Migrenin Tetiklediği Nöbet

Tanım: Migren aurası tarafından tetiklenen epileptik nöbetlerdir. Burada migren aurası sırasında ya da sonraki 1 saat içinde nöbet vardır.

1.6. Olası Migren (Migrenöz Bozukluk)

Tanım: Baş ağrısı ve/veya atağı migren tanı ölçütlerinden biri dışında diğerlerini karşılıyorsa olası migren adı verilir.

1.6.1. Olası Aurasız Migren

Tanı Ölçütleri:

A. 1.1. Aurasız migren için A-D tanı ölçütlerinden biri dışında tümünü karşılayan ataklar

B. Başka bir organik bozuklukla ilişkili olmamalı

1.6.2. Olası Auralı Migren

Tanı Ölçütleri:

A. 1.2. Auralı migren veya onun herhangi bir alt formu için A-D tanı ölçütlerinden biri dışında tümünü karşılayan ataklar

B. Başka bir organik bozuklukla ilişkili olmamalı.