

Kortikal Yayılan Depolarizasyon Sonrası Fare Beyninde NLRP2 İmmünoreaktivitesi

NLRP2 Immunoreactivity in Mouse Brain After Cortical Spreading Depolarization

Eda DERLE^{1,2}, Buket DÖNMEZ DEMİR², Melike SEVER BAHÇEKAPILI², Canan ÇAKIR AKTAŞ², Onur Çağın GÜRLEK², Beyza TÜRKEN², Hülya KARATAŞ KURŞUN²

¹Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü, Ankara, Türkiye

ÖZ

Giriş ve Amaç: Bu çalışmanın amacı tek kortikal yayılan depolarizasyonu (KYD) takiben NLRP2 ekspresyon özelliklerini ve değişimini göstermektir.

Yöntem: Optogenetik yolla uyarılabilen Thy1-ChR2-YFP (n=3) farelerde KYD sonrası 15. dakikada kardiyak perfüzyon yapılarak beyin dokusu elde edilmiştir. Elde edilen beyin dokusu kesitlerinde immünoifloresan işaretleme yöntemi ile NLRP2 ifadenmesi incelenmiş, kontrol grubu (n=3) ve naif fareden (n=1) elde edilen kesitlerdeki NLRP2 ifadenme özellikleri ile karşılaştırılmıştır. NeuN ve S100β ile ikili boyamalarla NLRP2'nin hücresel kaynağı gösterilmiştir.

Bulgular: Kontrol ve naif grupta NLRP2 ifadenmesi kortikal ve

subkortikal alanlarda belirgin idi. Kortikal yayılan depolarizasyon sonrası elde edilen kesitlerde ise immünoreaktivitede belirgin azalma mevcuttu. İkili boyamalarda NLRP2'nin NeuN (+) nöronal hücrelerde daha belirgin ifadelenirken, astrosit işaretleyici S100β ile daha az oranda ko-lokalize olduğu gösterildi.

Sonuç: Bu çalışmada KYD sonrası erken dönemde NLRP2 immünoreaktivitesinin azaldığı gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: İnflamasyon, inflamazom, kortikal yayılan depolarizasyon, migren, NLRP2

ABSTRACT

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

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

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

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

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

Cite this article as: Derle E, Dönmez Demir B, Sever Bahçekapılı M, Çakır Aktaş C, Gürlek OÇ, Türken B ve ark. Kortikal Yayılan Depolarizasyon Sonrası Fare Beyninde NLRP2 İmmünoreaktivitesi. Arch Neuropsychiatry 2025;62:216–219. doi: 10.29399/npa.28688

GİRİŞ

NOD benzeri reseptör (NLR) ailesi, doğal bağışıklık sisteminde patern tanıma reseptörlerinin bir üyesidir, pirin domaini içeren NLR 2 (NLRP2) de bu ailenin bir parçasıdır. NLRP2'nin immün yanıtlarda kesin rolü tam olarak anlaşılamamış olsa da, serebral iskemi, ağrı ve depresyon modelleri gibi çeşitli hastalık modellerinde astrositik inflamazom olarak immün yanıtlara katıldığını gösteren çok sayıda çalışma vardır (1,2,3). Buna karşın farklı sistemlerde nükleer faktör-κB (NF-κB) regülasyonu üstünden antiinflamatuvar etki gösterdiğine dair belirteçler vardır (2).

Buna ek olarak, daha önceki çalışmalarda NLRP2 aktivasyonunun ATP aracılığı ile astrosit üzerindeki panneksin kanalları ve pürinerjik reseptörler

üzerinden inflamatuvar kaskadı tetiklediği belirtilmiştir (1). Bu süreç iskemi, ağrı ve depresyon gibi birçok patolojik durumla ilişkilendirilmiştir (2,3). NLRP2'nin hem astrositik bir inflamazom olarak pro-inflamatuvar etkiler hem de NF-κB regülasyonu yoluyla antiinflamatuvar etkiler gösteren ikili doğası, immün yanıtlardaki karmaşıklığının ve çok yönlü rolünün altını çizmektedir (2).

Migren aurasının deneysel modeli olarak kabul edilen ve ATP aracılı astrositik uyarımın gösterildiği kortikal yayılan depolarizasyon modeli bağlamında, NLRP2'nin bu uyarımda ve ardından gelen inflamatuvar yanıtta bir aracı olarak potansiyel rolü, araştırmanın önemli bir yönü olarak

Öne Çıkan Noktalar

- İnflamasyonun migren patogenezinde anahtar rol oynayabileceği düşünülmektedir.
- NLRP2' in migren patogenezinde rolü olabilir.
- NLRP2 astrositlerin yanı sıra nöronal hücrelerde de eksprese olmaktadır.
- KYD dalgasını takiben çok erken dönemde NLRP2 immünreaktivitesi azalmaktadır.

ortaya çıkmaktadır (4,5). Bu çalışma, çok erken bir zaman noktasında optogenetik olarak indüklenen tek bir kortikal yayılan depolarizasyon (KYD) modelinde NLRP2 immünoreaktivitesindeki değişiklikleri araştırarak, NLRP2'nin nöroinflamatuvar süreçlere katılımının altında yatan karmaşık mekanizmalara değerli bilgiler katmayı amaçlamaktadır. Elde edilecek bilgilerin, nörolojik bozukluklarda NLRP2 ile ilişkili yanıtların modüle edilmesinde, terapötik hedeflerin ve stratejilerin ortaya çıkarılması için faydalı olacağı düşünülmektedir.

YÖNTEM

Deney Hayvanları

Tüm deneyler Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (2019/46). Tüm hayvanlar standart barınma koşullarında yiyecek ve suya serbest erişecek şekilde, 12 saatlik aydınlık ve karanlık döngüsünde, 22±3°C oda sıcaklığında ve %40–60 nem de barındırılmıştır.

Optogenetik indüksiyon ile KYD uyarımı minimal invaziv bir yöntem olup, işlem ilişkili inflamatuvar reaksiyonu da minimize etmektedir. Optogenetik indüksiyon için kortikal nöronlarında kanalorodopsin-2 eksprese eden ve lazer ile uyarılabilen (n=3) Thy1-ChR2-YFP fareler ve kontrol grubu olarak Thy1-ChR2-YFP negatif (littermate) (n=3) fareler kullanılmıştır. Naif grupta 12–16 haftalık, 20–25 gr ağırlığında C57BL/6J (n=1) fare kullanılmıştır. Oksijen saturasyonu, nabız ve vücut sıcaklığı oximetre (The LifeSense® VET Pulse Oximeter, Nonin Medical Inc., USA) yardımı ile işlem boyunca takip edilmiştir.

Kortikal Yayılan Depolarizasyon Dalgasının Optogenetik Olarak Uyarımı

Cerrahi ve sonrasında KYD uyarımı için yapılan deneyler sırasında indüksiyon ve idame anestezide izofluran kullanılmıştır. Cerrahi işlemler için Thy1-ChR2-YFP transgenik ve kontrol grubundaki (littermate) fareler sterotaksik çerçeveye yerleştirilmiştir, ve tüm işlemler stereomikroskop (Zeiss SV6) altında yapılmıştır. İlk olarak orta hatta deri insizyonu yapılarak bregma, frontal ve parietal kemikler ortaya konulmuştur. Elektrofizyolojik kayıtlar için parietal kemik yüksek hızlı drill ile inceltirilmiştir. İnceltme sırasında kemiği soğutmak için serum fizyolojik kullanılmıştır. İnceltilen kemik bölgesi işaretlenmiş ve bir adet Ag-AgCl₂ pellet elektrot kranium üzerine indirilmiştir. Topraklama için Ag-AgCl₂ disk elektrot ense kaslarının arasına yerleştirilmiştir. Elektrodlar Powerlab veri kazanım sistemine bağlanmıştır.

Elektrofizyolojik kayıtlar başlatılmış ve fizyolojik kayıtların kalitesi Labchart programı ile kontrol edilmiştir. Kayıt stabil olduktan sonra optogenetik uyarı frontal kemiğin üzerine yerleştirilen fiberoptik kablo ile gerçekleştirilmiştir. Dört yüz µm çapında ve 0,48 nümerik apertürüne ve 450 µm dalga boyuna sahip lazer ışığı, 4 mW ışık yoğunluğuna ayarlanmıştır. Uyarı 50 mJ yoğunlukta 10 saniye süresince uygulanmış ve KYD dalgası kayıt edilmiştir.

Kontrol grubunda lazer uyarımı dışında deney grubu ile aynı cerrahi işlemler yapılmıştır. Naif fareye ise anestezi dışında herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Kortikal yayılan depolarizasyon kaydını takiben 15. dakikada kardiyak perfüzyon yapılmıştır. Ardından tüm gruplarda beyin dokusu çıkarılarak önce %4 PFA içinde 24 saat ardından kriyoproteksiyon için %30 sukroz içinde 48 saat bekletilmiştir. Tüm beyinlerden kriomikrotomla (Leica CM 1100) 20nm kalınlıkta koronal kesitler alınmıştır.

İmmüno Floresan İşaretleme

Kesitler 80°C de 10 dakika sitrat solüsyonu (PH=6) içinde tutulmuş, ardından oda sıcaklığına kadar soğuması beklenmiştir. Yıkama solüsyonu (TBS + %0,025 triton X) ile iki kez 5'er dakika yıkanmış ve 10 dakika permeabilizasyon (TBS + %0,2 Triton X) için inkübe edilmiştir. Kesitler 75 dakika blokaj solüsyonu (0,3 M glisin ve %10 normal keçi serumu) ile ardından 48 saat boyunca +4°C'de primer antikor (1/100 NLRP2 antibody, Proteintech 15182-1-AP) ile inkübe edilmiştir. Yıkama solüsyonu ile üç kez beşer dakika yıkanmış ve sekonder antikor (1/200 Goat Anti Rabbit Alexa fluoro 488 Abcam-ab 150077) ile oda sıcaklığında bir saat daha bekletilmiştir. İkili boyama için NeuN (1/150 Milipore MAB377) ve S100β (1/150 atlas antibodies MAB03629) ile gece boyu +4°C de ve sonrasında 1 saat oda sıcaklığında sekonder antikor ile (1/200 goat anti-mouse cy3) inkübe edilmiştir. Basamaklar arasından üç kez beşer dakika yıkama yapılmıştır. Ardından Hoechst-33258 solüsyonu ile muamele edilip lamel ile kesitler kapatılmıştır.

Tüm kesitler Leica TCS SP8 konfokallaser tarama mikroskobu (Leica, Wetzlar, Germany) ile incelenmiş ve 2048×2048 piksel çözünürlükte görüntüler elde edilmiştir.

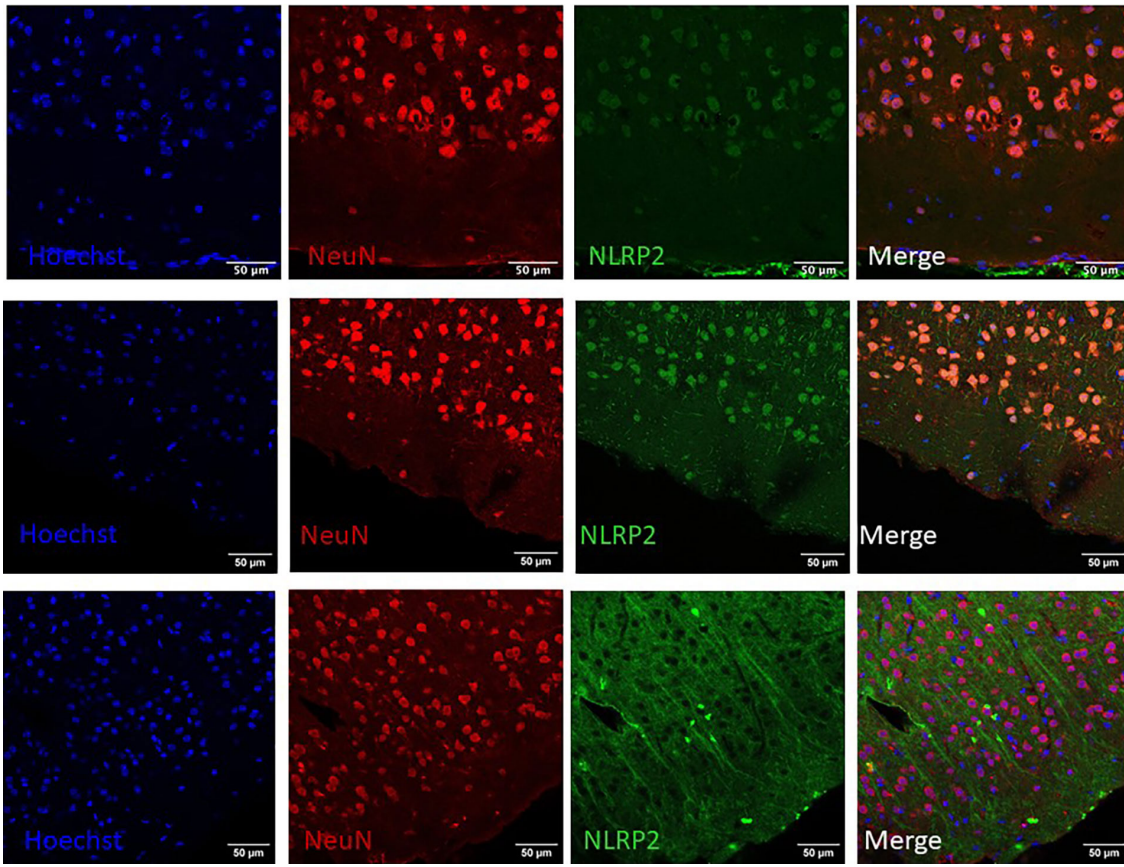
BULGULAR

Bu çalışmada, fare beyinlerinde optogenetik olarak indüklenen tek KYD'den 15 dakika sonra NLRP2'nin immünoreaktivitesini araştırdık. Başlangıçta, immüno floresan işaretleme yoluyla fare beyin kesitlerinde NLRP2'nin ekspresyon paternini inceledik. Özellikle, NLRP2'nin fark edilir düzeyde hücrel immünoreaktivitesi, kontrol ve naif grup beyinlerinin kortikal ve subkortikal bölgelerinde belirgindi. İlginç bir şekilde, bu immünoreaktivite, Şekil 1'de gösterildiği gibi, KYD ile indüklenen beyinlerde kayda değer bir azalma sergilemiştir. Daha sonra, NLRP2 ekspresyonunun hücrel kimliğini aydınlatmak için ikili immün boyama deneyleri yapılmıştır. Sonuçlar, NLRP2 eksprese eden hücrelerin çoğunluğunun bir nöronal marker olan NeuN ile kolokalizasyon sergilediğini, daha küçük bir alt kümenin ise Şekil 2'de gösterildiği gibi bir astrosit markeri olan S100β ile birleşme gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu ikili boyama yaklaşımı, optogenetik olarak indüklenen tek KYD'ye yanıt olarak NLRP2 ifade eden spesifik hücrel popülasyonlar hakkında değerli bilgiler sağlamış ve gözlemlenen immünoreaktivite değişikliklerinde hem nöronların hem de astrositlerin potansiyel katılımına ışık tutmuştur.

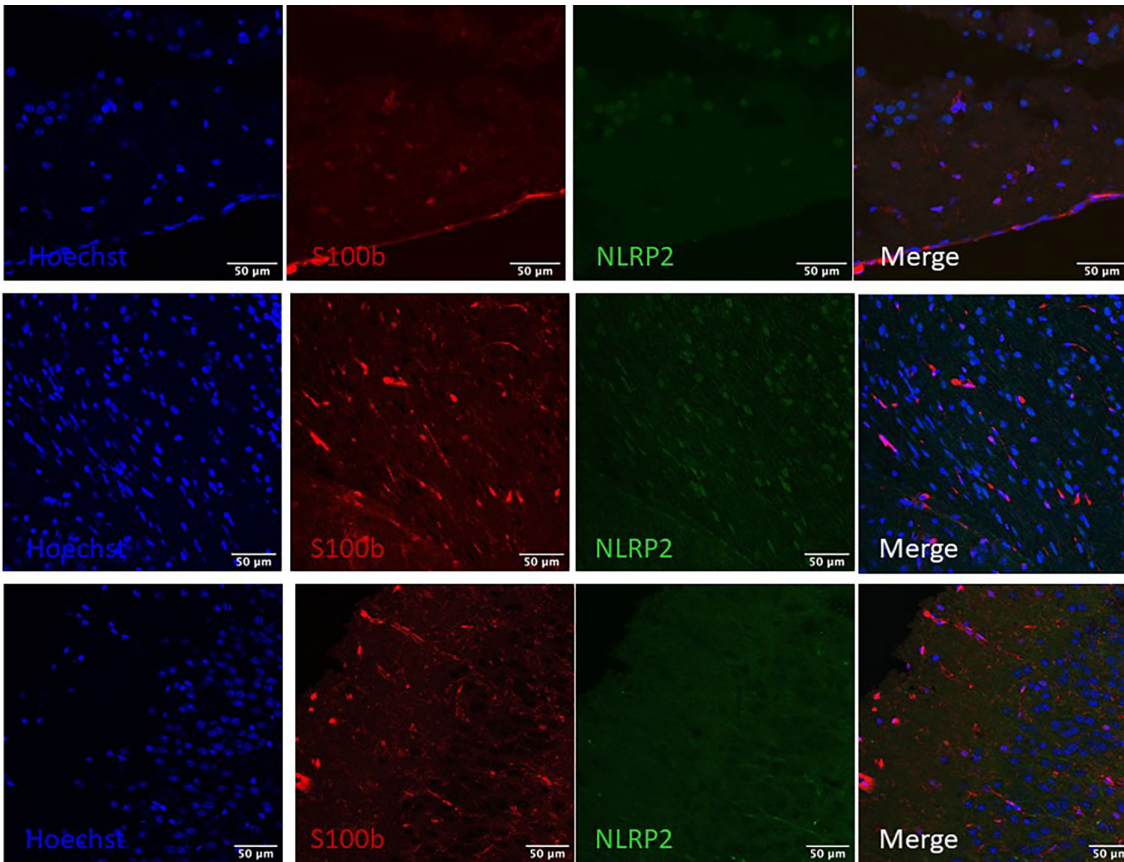
TARTIŞMA

İnflamasyon migren, ağrı, nörodejeneratif hastalıklar ve serebral iskemiyi de kapsayan çeşitli hastalıkların patogenezinde altta yatan anahtar mekanizma olarak öne sürülmektedir. Doğal bağışıklığın bir bileşeni olan inflamazomlar proinflamatuvar kaskadı aktive etmektedir. NOD benzeri reseptör ailesinin çeşitli üyeleri farklı patofizyolojik süreçlerde tanımlanmışken, NLRP2'de dâhil olmak üzere bu üyelerin hastalık süreçlerindeki rolleri henüz tam aydınlatılamamıştır (3). Diğer üyelere göre özellikle NLRP2 en az çalışılan inflamazom tiplerindendir

Bu çalışmada tek KYD sonrasında NLRP2'nin değişimini ve ekspresyon özelliklerini ortaya koymayı hedefledik. Şaşırtıcı olarak bazal seviyede NLRP2'nin nöronlarda eksprese olduğunu ve KYD sonrasında da



Şekil 1. NLRP2 immünoaktivitesinin gösterilmesi. NeuN (kırmızı) ve NLRP2 (yeşil) ile ikili boyama yapılmıştır. Nükleer boyama için Hoechst (mavi) kullanılmıştır. Naif grup (üst sıra) ve kontrol grubu (orta sıra) kesitlerinde hücreler NLRP2 işaretlenme paterni gözlenirken kortikal yayılan depolarizasyon sonrası (alt sıra) bu görüntü de belirgin azalma izlenmiştir. Birleştirilmiş görüntülerde NLRP ve nöronal belirteçlerin (NeuN) kolokalizasyonu görülmektedir.



Şekil 2. NLRP2 immünoaktivitesinin gösterilmesi. S100b (kırmızı) ve NLRP2 (yeşil) ile ikili boyama yapılmıştır. Çekirdek işaretleme için Hoechst (mavi) kullanılmıştır. S100b pozitif astrositlerde NLRP2 immünoaktivitesi çok sili izlenmektedir (birleştirilmiş görüntüler).

immünoreaktivitesinde fark edilir bir değişim olduğunu gözlemledik. Astrositlerde daha belirgin ve nöronlarda daha az eksprese olduğunu ifade eden diğer çalışmalardan farklı olarak biz özellikle naif ve kontrol grubunda NeuN (+) hücrelerde belirgin NLRP2 ekspresyonu olduğunu gösterdik (1,6–9). Kortikal yayılan depolarizasyon sonrasında ise fark edilir bir NLRP2 ekspresyonunda azalma saptadık.

Zhang, Sun, Cheon ve Minkiewicz ve ark.'nın dikkate değer çalışmalarında NLRP2'nin astrositik ekspresyonu ve ATP'nin uyardığı panneksin ve pürinerjik reseptörler üzerinden inflamazom ve proinflamuar kaskadın aktivasyonu vurgulanmıştır (1,6–9). Bu bulgular, deneysel migren modellerinde proinflatuvar özelliklerin rolünü de göz önüne aldığımızda, bizi KYD ve NLRP2 arasında olabilecek olası bir bağlantıyı araştırmaya yönlendirmiştir.

Bizim çalışmamız önceki çalışmalarda gösterilen belirgin astrositik özelliklerden farklı olarak merak uyandıracak şekilde kortikal ve subkortikal bölgelerde NLRP2'nin belirgin nöronal ekspresyonunu ortaya koymuştur. Bunun yanında bulgularımız Matsuka ve ark.'nın ağrı hipersensitivite modelinde dorsal kök ganglionlarında nöronal NLRP2 ekspresyonunu tanımlamasıyla benzerlik göstermektedir (10). Buna karşın, seramid ile uyarılmış doku inflamasyonunu takiben artmış reaktiviteyi gözleyen Matsuka ve ark.'nın gözlemlerinden farklı olarak biz uyarım sonrasında NLRP2 ekspresyonunun azaldığını ortaya koyduk (10). Ancak bu çalışmada seramid indüksiyonundan iki gün sonra NLRP2 ölçülmüştür, halbuki bizim çalışmamızda KYD indüksiyonundan sonra çok erken dönemde NLRP2 ekspresyonu incelenmiştir (10). Uyarım ile ortaya çıkan cevapları değerlendirdiğimizde, daha ileri araştırmalar NLRP2'nin ekspresyon ve aktivasyon aralıklarını ortaya çıkarabilir. NLRP2'nin farmakolojik veya genetik manipülasyonu, muhtemelen NF- κ B düzenlemesi yoluyla, inflamasyonda potansiyel bir sınırlayıcı faktör olarak rolünü anlamak için umut verici olabilir. NLRP2'nin zamansal dinamiklerini ve manipülasyonlar yoluyla ortaya çıkacak değişiklikleri araştıran gelecekteki araştırmalar, KYD ile tetiklenen inflamatuvar yanıtlardaki rolüne ilişkin değerli bilgiler sunabilir.

Etik Komite Onayı: Tüm deneyler Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (2019/46).

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir- ED, HK; Tasarım- ED, HK; Denetleme- ED, HK; Kaynaklar- ED, HK; Malzemeler- ED, HK; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- ED, HK, BDD, MSB, CÇA, OCG, BT; Analiz ve/veya Yorum-ED, HK; Literatür Taraması- ED; Yazıyı Yazan- ED, HK; Eleştirel İnceleme- ED, HK.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından finanse edilmektedir (Proje no: TSA 2020-18568).

KAYNAKLAR

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