

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI



**ESKULETİNİN İN-VİVO VE EX-VİVO SIÇAN MİGREN
MODELLERİNDE AĞRI DAVRANIŞI VE MİGREN AĞRISINDAN
SORUMLU MEKANİZMALAR ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYÇA NUR GÖNÜL

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Erkan KILINÇ

BOLU, KASIM - 2023

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ayça Nur GÖNÜL tarafından hazırlanan “Eskuletinin in-vivo ve ex-vivo sıçan migren modellerinde ağrı davranışı ve migren ağrısından sorumlu mekanizmalar üzerine etkileri” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği/ oy çokluğuyla kabul edilmiştir. 29/11/2023

Jüri Üyeleri

Danışman
Doç. Dr. Erkan KILINÇ
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

İmza

.....

Üye
Prof. Dr. Aydın HİM
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Özge BEYAZÇİÇEK
Düzce Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

Bu çalışma için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Yerel Araştırmalar Etik Kurulundan 2021/38 karar numarası (değişiklik: 28.03.2022/sayı: 13) ile etik izin alınmıştır

.....
AYÇA NUR GÖNÜL

ÖZET

**ESKULETİNİN İN-VİVO VE EX-VİVO SIÇAN MİGREN
MODELLERİNDE AĞRI DAVRANIŞI VE MİGREN AĞRISINDAN
SORUMLU MEKANİZMALAR ÜZERİNE ETKİLERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
AYÇA NUR GÖNÜL
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. ERKAN KILINÇ)

**BOLU, KASIM - 2023
XIV + 89 sayfa**

Sunulan çalışmada, kumarin türevlerinden Eskuletin isimli fitokimyasalın, sıçanlarda nitrogliserin (NTG) ile oluşturulan in-vivo ve ex-vivo migren modellerinde migren ile bağlantılı belirteçler üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

İn-vivo deneylerde Wistar erkek sıçanlar 7 gruba ayrıldı (n=7/grup). Migren modeli 10 mg/kg NTG (i.p.) uygulaması ile oluşturuldu. Migren modelinde Eskuletin'in farklı dozlarının (5, 10 ve 20 mg/kg) etkisi test edildi ve pozitif kontrol olarak migren ilacı sumatriptan uygulandı. Ayrıca Eskuletin'in tek başına etkisi de test edildi. Ex-vivo trigeminovasküler preparatlarda (n=8/grup) NTG ile indüklenen kalsitonin gen-ilişkili peptid (CGRP) salımı üzerine Eskuletin'in (100 µM) etkisi test edildi. Mekanik hiperaljezi von-Frey testi ile, in-vivo ve ex-vivo örneklerde CGRP ve beyin sapı c-Fos düzeyleri ELISA ile, meningeal mast hücreleri ise toluidine-blue boyaması ile değerlendirildi. Veriler one-way ANOVA ile analiz edildi.

İn-vivo deneylerde Eskuletin, NTG'nin yol açtığı hiperaljeziyi, plazma ve trigeminal ganglion CGRP düzeylerini, beyin sapı CGRP ve c-fos düzeylerini ve mast hücre aktivasyonunu azalttı (p<0.05). Ex-vivo trigeminal gangliyon ve beyin sapı yapılarında Eskuletin, NTG'nin uyardığı CGRP salımını azalttı (p<0.001), ancak dural preparatlarda etkisiz kaldı. Pozitif kontrol olarak sumatriptan, in-vivo ve ex-vivo deneylerde NTG'nin etkilerini tersine çevirdi (p<0.01).

Eskuletin'in in-vivo ve ex-vivo'da migren ağrısı ile ilişkili yapılardan migren mediyatörü CGRP'nin salımını azaltması ve nörojenik inflamasyonun önemli bileşeni olan meningeal mast hücre aktivasyonunu baskılaması migren tedavisinde çok hedefli yeni bir ilaç adayı olabileceğini önermektedir. İleride farklı migren modelleri ile çalışmaların ve klinik denemelerin yapılması Eskuletin'in anti-migren potansiyelinin daha fazla anlaşılmasına katkı sunacaktır.

ANAHTAR KELİMELER: Migren, eskuletin, CGRP, nörojenik inflamasyon, c-fos, mast hücreleri.

ABSTRACT

EFFECTS OF ESCULETIN ON PAIN BEHAVIOR AND MECHANISMS UNDERLYING MIGRAINE PAIN IN IN-VIVO AND EX-VIVO RAT MODELS OF MIGRAINE

MSC THESIS

AYÇA NUR GÖNÜL

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY

DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR, ERKAN KILINÇ)

BOLU, NOVEMBER 2023

XIV+89 pages

This study aimed to investigate the effects of Esculetin, one of the coumarin derivatives, on migraine-related markers in in-vivo and ex-vivo migraine models induced by nitroglycerin (NTG) in rats. In the in-vivo experiments, Wistar male rats were divided into 7 groups (n=7/group).

The migraine model was established by 10 mg/kg NTG administration. Different doses of Esculetin (5, 10, and 20 mg/kg) was tested in the migraine model and migraine drug sumatriptan was administered as a positive control group. The effect of Esculetin alone was also tested. In ex-vivo trigeminovascular preparations (n=8/group), the effect of Esculetin (100 μ M) on the release of calcitonin gene-related peptide (CGRP) induced by NTG. Mechanical hyperalgesia was assessed by von-Frey filaments and CGRP concentrations in in-vivo and ex-vivo samples and c-Fos expression in brainstem by ELISA and meningeal mast cells by toluidine-blue staining. Data were compared by one-way ANOVA.

In the in-vivo experiments, Esculetin reduced the hyperalgesia, plasma and trigeminal ganglion CGRP levels, brainstem CGRP and c-fos levels, and mast cell activation induced by NTG (p<0.05). In the ex-vivo trigeminal ganglion and brainstem preparations, Esculetin reduced CGRP release stimulated by NTG (p<0.001), but it was ineffective in dural preparations. Sumatriptan, as a positive control, reversed the effects of NTG in in-vivo and ex-vivo experiments (p<0.01).

The fact that Esculetin reduced the release of migraine mediator CGRP from migraine pain-related structures in the in-vivo and ex-vivo and suppressed meningeal mast cell activation, which is a key component of neurogenic inflammation, suggests that it may be a new multi-targeted drug candidate in the treatment of migraine. Future studies with different migraine models and clinical trials will contribute to further understanding the anti-migraine potential of Esculetin

KEYWORDS: Migraine, esculetin, CGRP, neurogenic inflammation, c-fos, mast cells.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	x
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xi
TEŞEKKÜR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1 Migren.....	6
2.1.1 Tanım.....	6
2.1.2 Evreler	7
2.2 Migren Patofizyolojisi	8
2.2.1 Vasküler Teori	8
2.2.2 Nörojenik İnflamasyon Teorisi.....	8
2.2.3 Kortikal Yayılan Depresyon.....	9
2.3 Migren’de Trigeminoasküler Sistem Teorisi.....	10
2.3.1 Trigeminoasküler Sistem Anatomisi	10
2.3.2 Asendan (Çıkan) Yolaklar	11
2.3.3 Santral Yapılar	11
2.3.4 Migrenle ilişkili sistemler ve nörotransmitterler	12
2.3.4.1 Sempatik Sinir Sistemi	12
2.3.4.2 Parasempatik Sinir sistemi.....	13
2.3.4.3 VIP ve PACAP	13
2.3.4.4 Santral Sinir Sistemi	14
2.3.4.5 Talamus.....	14
2.3.4.6 Glutamat reseptörleri	14
2.3.4.7 Hipotalamus	15
2.3.4.8 Beyin sapı	15
2.4 Nörojenik İnflamasyon	16
2.4.1 Dura Mater.....	16
2.4.2 Vazodilatasyon ve plazma protein ekstrevasyonu	17
2.4.3 Bağışıklık Hücreleri.....	17
2.5 Mast Hücreleri	18
2.5.1 Mast hücre reseptörleri	19
2.5.2 Mast hücre aracıları	20
2.6 CGRP.....	22
2.6.1 Reseptörler.....	23
2.6.2 Relaksasyon mekanizmaları	24
2.7 Trigeminal nükleus kaudalis’te c-fos ekspresyonu	25
2.7.1 Trigeminal nükleus kaudalis’te c-fos ekspresyonuna aracılık eden reseptörler.....	26
2.7.1.1 Kapsaisin Reseptörleri	26
2.7.1.2 Glutamat Reseptörleri.....	26
2.7.1.3 GABA Reseptörleri	26

2.7.1.4	NK-1 Reseptörleri.....	26
2.7.1.5	Serotonin Reseptörleri	27
2.8	Nitrogliserin ile oluşturulan akut deneysel migren modeli.....	28
2.9	Güncel migren tedavileri	29
2.10	Eskuletin.....	31
2.10.1	Anti-inflamatuar ve anti-nosiseptif rol	32
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1	Deneyde kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışları	34
3.1.1	Yapay Beyin Omurilik Sıvısı (yBOS).....	34
3.1.2	Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS) Hazırlanışı	34
3.1.3	PAF (Paraformaldehit) Hazırlanışı.....	34
3.2	Deneylerde kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri.....	35
3.3	Deneylerde kullanılan kimyasallar	36
3.4	İn vivo Deney grupları ve Deneysel Uygulamalar:	36
3.4.1	İn-vivo Deney Grupları:	37
3.4.1.1	Grup-1: Kontrol Grubu (Veh(Es)+Veh(Ntg)).....	38
3.4.1.2	Grup-2: Model Grubu(Veh(Es)+Ntg).....	38
3.4.1.3	Grup-3: Es-1+Ntg Grubu	38
3.4.1.4	Grup-4: Es-2+NTG grubu.....	38
3.4.1.5	Grup-5: Es-3+NTG grubu.....	38
3.4.1.6	Grup-6: Sum+Ntg Grubu	38
3.4.1.7	Grup-7:Es(etkin)+Veh(Ntg) Grubu	39
3.4.2	İn-vivo gruplara Von-Frey filament davranış testinin uygulanması (mekanik allodini/hiperaljezi)	39
3.4.3	Kan alınması	39
3.4.4	Perfüzyon işlemi	39
3.4.5	Dura mater, beyin sapı ve trigeminal gangliyonun çıkarılması	40
3.4.6	Beyin sapı ve trigeminal gangliyon dokularının homojenizasyonu	40
3.4.7	Dural mast hücrelerinin görüntülenmesi	41
3.5	Ex-vivo Deney Grupları ve Deneysel Uygulamalar:	42
3.5.1	Hemiskull preparatları	42
3.5.1.1	Grup-1 (n=8 (4 sıçan)):	42
3.5.1.2	Grup-2 (n=8 (4 sıçan)):	42
3.5.1.3	Grup-3 (n=8 (4 sıçan)):	42
3.5.2	İzole trigeminal gangliyon preparatları	43
3.5.2.1	Grup-1 (n=8 (4 sıçan))	43
3.5.2.2	Grup-2 (n=8 (4 sıçan))	43
3.5.2.3	Grup-3(n=8 (4 sıçan))	43
3.5.3	İzole beyin sapı preparatları	43
3.5.3.1	Grup-1 (n=4)	43
3.5.3.2	Grup-2 (n=4)	44
3.5.3.3	Grup-3 (n=4)	44
3.5.4	Ex-vivo hemiskull preparatlarının hazırlanması	44
3.5.5	Trigeminal Gangliyon Preparatı Hazırlanışı	44
3.5.6	Beyin sapı Preparatı Hazırlanışı	45
3.6	Plazma, Beyin sapı trigeminali nukleus, Trigeminal Gangliyon ve Ex-Vivo deneylerden elde edilen süperfuzat örneklerinde CGRP ve Beyin sapı trigeminalis nukleus c-fos Düzeylerinin Ölçümü	46
3.7	Verilerin Değerlendirilmesi	46

4. BULGULAR	47
4.1 Eskuletin'in in-vivo gruplarda NTG' nin yol açtığı mekanik hiperaljezi ve beyin sapı c-fos ekspresyonu üzerine etkileri.....	47
4.2 Eskuletin'in in-vivo gruplarda NTG ile uyarılan plazma, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nükleus trigeminalis'te CGRP seviyeleri üzerine etkileri	48
4.3 Eskuletin'in in-vivo gruplarda NTG ile uyarılan dural mast hücre degranülasyonu ve sayısı üzerine etkileri	49
4.4 Eskuletin'in ex-vivo hemiskull, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nükleus trigeminalis preparatlarından NTG ile indüklenmiş CGRP salımı üzerine etkileri.....	52
4.5 Ex-vivo gruplarda CGRP düzeylerine ait değerler	54
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
7. KAYNAKLAR.....	62



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Nörojenik inflamasyon teorisi	9
Şekil 2.2 Trigeminovasküler Sistem ve Migren	12
Şekil 2.3 Beyin sapı ve kontrol ettiği fizyolojik olaylar.....	16
Şekil 2.4 Mast Hücre Reseptörleri	19
Şekil 2.5 Mast Hücreleri, aktivasyon fazları ve salgılanan mediyatörler	20
Şekil 2.6 Nöronlar ve mast hücre ilişkisi.....	21
Şekil 2.7 CGRP ve migren patofizyolojisindeki rolü	22
Şekil 2.8 CGRP reseptörleri	24
Şekil 2.9 CGRP ve neden olduğu relaksasyon mekanizması	25
Şekil 2.10 Trigeminal kaudalis içindeki c-fos indüksiyonunda rol alan reseptörler	27
Şekil 2.11 Migrene spesifik ilaçlar ve olası hedefleri	31
Şekil 3.1 İn-vivo deneysel prosedür	37
Şekil 3.2 İn-vivo deneyler sırasında gerçekleştirilen von-Frey testi, kan alma ve perfüzyon işlemleri.	40
Şekil 3.3 İn-vivo deneyler sonunda kranyum, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nukleus trigeminalis dokularını çıkarma işlemleri.....	41
Şekil 3.4 İn-vivo deneylerde kranyal dura materin çıkarılması ve mast hücrelerini görüntülemek için toluidin-blue ile boyanması.	41
Şekil 3.5 Ex-vivo hemiskull preparatı hazırlanma aşamaları	44
Şekil 3.6 Ex-vivo trigeminal gangliyon preparatı hazırlanma aşamaları	45
Şekil 3.7 Ex-vivo beyin sapı nukleus trigeminalis preparatı hazırlanması.....	45
Şekil 4.1 İn-vivo gruplarda eskuletin'in mekanik hiperaljezi ve c-fos düzeyleri üzerine etkileri	47
Şekil 4.2 İn-vivo gruplarda Eskuletin'in plazma, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nukleus trigeminalis'te CGRP düzeyleri üzerine etkileri.....	48
Şekil 4.3 İn-vivo gruplarda Eskuletin'in dural mast hücreleri üzerine etkileri	50
Şekil 4.4 İn-vivo gruplara ait temsili dural mast hücre görüntüleri.....	51
Şekil 4.5 Ex-vivo hemiskull preparatlarında Eskuletin'in CGRP salımı üzerine etkileri.	52
Şekil 4.6 Ex-vivo trigeminal gangliyon preparatlarında Eskuletin'in CGRP salımı üzerine etkileri.	53
Şekil 4.7 Ex-vivo beyin sapı nukleus trigeminalis preparatlarında Eskuletin'in CGRP salımı üzerine etkiler.	54
Şekil 5.1 NTG ile oluşturulan migren modelinde Eskuletin'in etkilerinin şematik özet gösterimi.....	59

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1 Deneylerde kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri.....	35
Tablo 3.2 Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler.....	36
Tablo 3.3 İn vivo deney grupları ve enjeksiyonlar	37
Tablo 4.1 İn-vivo gruplarda ağrı eşiği, c-fos, CGRP ve mast hücre parametrelerine ait değerler	49
Tablo 4.2 Ex-vivo gruplarda CGRP düzeylerine ait değerler	54



KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

5-HT	: Serotonin
ACC	: Anterior singulat korteks
Ach	: Asetilkolin
AG	: Astroglia
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit
BOS	: Beyin-omurilik sıvısı
Ca+2	: Kalsiyum
CADM1	: Hücresel adhezyon molekülü
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
c-Fos	: Hücresel yapıdaki Fos
CGRP	: Kalsitonin gen ilişkili peptit
CLR	: Kalsitonin reseptörü benzeri reseptörden
COX	: Siklooksijenaz
CTR	: Kalsitonin reseptörü
Fos	: Finkel, osteojenik sarkom
GABA	: Gama aminobütirik asit
H	: Histamin
HO-1	: Heme oksijenaz-1
HSC	: hematopoetik kök hücreler
IEG	: Acil erken genler
IL	: İnterlökin
i.p.	: İntraperitoneal
İNS	: İnsula
K+	: Potasyum

KYD	: Kortikal yayılan depresyon
KVS	: Kardiyovasküler sistem
LC	: Locus coeruleus
LOX	: Lipoksijenaz
LT	: Lökotrien
mAb	: Monoklonal antikorlar
MC	: Mast hücreleri
MCA	: Orta serebral arter
MCP	: mast hücre öncülleri
MMA	: Orta meningeal arter
Na+	: Sodyum
NGF	: Sinir büyüme faktörü
NK1	: Nörokinin 1
NKA	: Nörokinin A
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NPY	: Nöropeptid Y
NTG	: Nitrogliserin
PACAP	: Hipofiz adenilat siklaz aktive edici peptit
PAF	: Paraformaldahit
PAG	: Periaqueductal Gri Madde
PAMP	: Patojenle ilişkili moleküler modeller
PAR-2	: Proteinazla aktive olan reseptör-2
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
RAMP1	: Reseptör aktivitesini modifiye edici protein 1

RCP	: Reseptör bileşen proteini
RVM	: Rostral ventromedial medulla
S1	: Somatosensoriyal alan 1
S2	: Somatosensoriyal alan 2
SP	: P maddesi
SPG	: Sfenopalatin gangliyon
SSN	: Superior salivatory nucleus
SSS	: Santral sinir sistemi
TCC	: Trigeminoservikal kompleks
TG	: Trigeminal gangliyon
TLR	: Toll benzeri reseptörler
TNC	: Trigeminal nukleus kaudalis
TNF-α	: Tümör nekroz faktör
TRPV-1	: Transient reseptör potansiyel vanilloid 1
V1	: Oftalmik sinir
V2	: Maksiller sinir
V3	: Mandibular sinir
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEH	: Kontrol grubu
VPM	: Ventroposteromedial çekirdek
VIP	: Vazoaktif intestinal peptit
yBOS	: Yapay beyin omurilik sıvısı

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca, akademik olarak beni yetiştiren, tezimin her aşamasında katkısı olan ve tecrübelerini aktararak yolumu aydınlatan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Erkan KILINÇ hocama saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her kısmında hiçbir yardımını esirgemeyen, teşviği ve tavsiyeleriyle birçok şey öğrenmeye katkı sağlayan Sayın Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Ethem TORUN hocama teşekkürlerimi sunarım.

Akademik olarak gelişmeye her türlü destekte bulunan Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Aydın HİM hocama saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım TÜBİTAK' ın 1002-Hızlı Destek Programı (proje no: 122S014) kapsamındaki proje ile gerçekleştirilmiş olup proje kapsamında maddi desteğinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Bana desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen ve her koşulda bana inancını yitirmeyen canım annem Ayşegül GÖNÜL ve canım babam Ercüment GÖNÜL'e sonsuz teşekkür ederim.

Bana yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve destek olan canım iş arkadaşlarıma teşekkürlerimle.

1. GİRİŞ

Migren; tipik olarak tek taraflı seyreden zonklayıcı şekilde baş ağrısı ve beraberinde mide bulantısı, ışık ve ses gibi uyaranlara aşırı duyarlılık gibi belirtiler gösteren ayrıca depresyon ve anksiyete gibi ciddi ek hastalıklarla birlikte görülebilen bir rahatsızlıktır (1). Dünya genelinde 1 milyardan fazla insanı etkilerken 15-49 yaş arasındaki popülasyonda 3. sıklıkla görülen nörolojik bir bozukluktur (2). Bu hastalık 1 ayda baş ağrısı/gün sayısına göre kronik veya epizodik migren olarak incelenirken beraberindeki semptomlara göre aural ve aurasız migren gibi alt başlıklarda incelenir (3, 4).

Patofizyolojisi çeşitli teorilerle açıklanmaya çalışılan migren baş ağrısı, ilk olarak vasküler teori üzerinde durularak serebral damarların dilatasyonundan kaynaklandığı öne sürülse de başta mast hücreleri olmak üzere inflamatuvar hücrelerin aktive olması sonucu meningeal nosiseptörlerin uyarılması ve devamında gelişen baş ağrısı ve hassasiyet nörojenik inflamasyonun patofizyolojideki rolünü göstermektedir (5, 6).

Beynin işlevsel dokusu genel olarak ağrıya duyarsız olmakla birlikte, trigeminal ganglion ve serebral arterler, dura ve pia materi innerve eden trigeminal sinirlerin aktive olması baş ağrısı ve beraberindeki semptomlara yol açtığından patofizyoloji için önemli temel anatomik yapılardır (7, 8). Hücre gövdeleri trigeminal gangliyonda yer alan trigeminal sinirler ve bunların innerve ettiği yapıların tümü birlikte trigeminovasküler sistem olarak adlandırılır ve migren ağrısından trigeminovasküler sistemin aktivasyonu sorumlu tutulmaktadır.

Dura mater, inflamasyon açısından önemli rol üstlenen mast hücrelerini barındırır ve dural damarlar orta meningeal arter (MMA) gibi trigeminal sinirler tarafından yoğun bir şekilde innerve edilmiştir (9, 10). Ayrıca servikal dorsal kök ganglionlarından gelen sinirler tarafından innerve edilmesi ve bu sinirlerin uyarımı sonucu bu bölgeler üzerinden fotofobi, mide bulantısı gibi belirtilere sebebiyet vermesi bu yapının migren açısından önemini göstermektedir (11).

Dural kan damarlarını innerve eden trigeminal sinirlerin periferik uçları ve trigeminal nukleus kaudalise (TNC) uzanan merkezi terminalleri nörojenik inflamasyonda önemli rolü olan kalsitonin gen ilişkili peptit (CGRP), hipofiz adenilat siklaz aktive edici peptit (PACAP), nörokinin A (NKA) ve P maddesi (SP) gibi nöropeptidleri içerir. Bu nöropeptidler serebral damarları ve mast hücre degranülasyonunu etkileyerek bu süreçler üzerinden patogeneze dahil olurlar (12, 13).

Güçlü bir vazodilatör olan CGRP'nin, α -CGRP ve β -CGRP olmak üzere iki tip izoformu ve reseptör aktivitesi modifiye edici protein 1 (RAMP1) ve kalsitonin benzeri reseptör (CLR) olmak üzere iki bileşenden oluşan bir reseptörü vardır (14, 15). Bu reseptör, trigeminal sistemde yaygın bir şekilde bulunur ve inflamasyon ve devamında gelişen ağrı süreci üzerinde etkilidir. Ayrıca kan- beyin bariyerini geçme konusunda kısıtlı olduklarından anti-CGRP tedavisi de periferik odaklıdır (16). CGRP, adenil siklaz aktivasyonunu tetikleyerek meningeal arterlerde güçlü bir vazodilatasyona ve inflamatuvar mediyatörlerin salınımına sebep olan vazoaktif bir maddedir (17, 18).

Migren atağı esnasında, trigeminal aktivasyonu takiben presinaptik sinir sonlanmalarından CGRP salınımı sonucu, bağışıklık hücreleri, glial hücreler ve trigeminal ganglion hücreleri uyarılır. Bu uyarım, nörojenik inflamasyona, mast hücrelerinin degranüle olması ve merkezi ve periferik hassasiyet gibi olayların meydana gelmesine sebep olur (19).

Kronik migrenli hastalarda yapılan bir çalışmada, migren atağı haricinde periferik kan örneğinde yüksek CGRP seviyeleri bulunmuş, nitekim yapılan başka çalışmalarda da, atak esnasında juguler venöz kan örneğinde yükselmiş CGRP seviyeleri ve akut migren tedavisi için kullanılan sumatriptan ve dihidroergotamin gibi ilaçların CGRP düzeylerinin önemli ölçüde düşürdüğü ve atağı hafiflettiği görülmüştür (19–21).

Dura materde bulunan ve kemik iliği öncüllerinden meydana gelen mast hücreleri; P maddesi, histamin, TNF- α , sitokin, kemokin, interlökin gibi mediyatörleri içeren granüllere sahip olduğundan granülosit olarak adlandırılırlar (22, 23). Çoğu fizyolojik durumda görev alan bu bağışıklık hücreleri, sahip olduğu çeşitli reseptörlerle uyarıldıktan sonra aktive olurlar ve degranülasyon aşaması başlar (24). Bu degranülasyon hücre dışı boşluğa inflamasyon açısından son derecede önemli kimyasalların ve enzimlerin salınmasına sebep olur (25).

Mast hücre mediyatörlerinden IL-1 β 'nin CGRP salınımını uyardığını, IL-6 ve TNF- α 'nın sıçanlar üzerinde hiperaljeziye sebebiyet verdiği, Tripsin'in proteinazla aktive olan reseptör-2 (PAR-2) yoluyla inflamasyona ve allodiniye yol açtığı, histaminin H1-H2

Reseptörleri aracılığıyla endotel bağımlı ve bağımsız vazodilatasyona neden olduğu bildirilmiştir (26–29). Tüm bu proinflamatuvar ajanların ve mast hücrelerinin, inflamasyona ve meningeal nosiseptörlerin aktivasyonuna büyük ölçüde sebep olması, bu bileşenlerin migren patogenezindeki önemini göstermektedir (30).

Acil erken genler sınıfında incelenen hücresel yapıdaki fos (c-fos), trigeminovasküler sistem aktivasyonu ve nosisepsiyon belirteci olarak beyin sapı TNC nöronlarında ifade edilir (31). AMPA, NMDA, 5-HT , NK-1 ve GABA reseptörleri bu genin aktivasyonunda rol oynar. C-fos tanımlanan ilk onkogenlerden biri olması dolayısıyla hayvanlar üzerinde yapılan ağrı modellemelerinde sıklıkla kullanılır. TNC üzerinde ağrı iletimi rolü C ve Aδ liflerinin aktive olmasından kaynaklanır. Aktivasyon sonucu nöromedyatörlerin salınmasıyla başlayan fizyolojik süreç TNC'nin lamina I ve II. bölgesinde nöronal aktivasyonun simgesi olan c-fos'un indüklenmesiyle sonuçlanır (32, 33). Kortikal yayılan depresyonun meydana gelmesi, superior sagital sinüs, orta meningeal arter ve trigeminal ganglionun çeşitli uyaranlar sonucu (elektriksel, mekanik, kimyasal) uyarılması da TNC'de c-fos ekspresyonuna sebep olacak olaylar olarak örnek verilebilir (34–37).

Bir nitrik oksit (NO) donörü olan nitrogliserin (NTG) ve serebral arter endotelinden difüze olarak oluşturduğu NO; guanil siklazı, cGMP ve kalsiyuma duyarlı K⁺ kanallarını aktive ederek intrakranial ve ekstrakranial damarlarda vazodilatasyona ve dolayısıyla baş ağrısına sebebiyet verir (38–40). NTG'nin damarlar üzerindeki bu etkisi, intravenöz olarak uygulandığı zaman, migreni olan ve olmayan hastalar tarafından bilateral olarak zonklayıcı şekilde ve hafif-orta şiddetli bir baş ağrısı olarak tanımlanmıştır (41). Bununla birlikte baş ağrısına ek olarak mide bulantısı, yorgunluk, boyun ağrısı gibi premonitör semptomlar da beraberinde izlenmiştir (42). Ayrıca migren patogenezinde önemli bir nörotransmitter olan CGRP'nin NTG enjeksiyonundan sonra plazma seviyelerinin yükselmesi, TNC'de c-fos biyomarkerının salımını artırması migren modellerde NTG'nin sıkça tercih edilmesinin ana nedenidir (43, 44).

Hayvanlarda yapılan çalışmalarda ise NTG enjeksiyonu sonrası, beyin sapı ve diensefalik alanlarda c-fos salımı, TNC'de ise nitrik oksit sentaz salımına yol açtığı migren modellerinde kanıtlanmıştır (45, 46).

1970-2020 yılları arası akut migren için içinde triptanlar, antiinflamatuvar ve anesteziik ilaçlar, ergotaminler ve gepantların arasında bulunduğu 17 farklı ilaç onaylanmıştır (47). Günümüzde migren için kullanılan ilaçlar çeşitli reseptörler üzerinden etki göstermektedir. Meninksler üzerinde nosiseptif aktiviteyi tetiklemedeki rolü agonistlerinin trigeminovasküler nöronlardan NKA, P maddesi, CGRP gibi nöromedyatörlerinin salımını

bloke etmesi gibi fizyolojik etkilerinden dolayı odaklanılan 5-HT reseptörlerini hedef alan ilaçlar triptanlar, ergotamin ve ditanlardır (48, 49). Orta meningeal arter gibi migren açısından önemli olan intrakranyal damarlarda çokça reseptörünün olması, vazodilatör etkisi ve antikorlarının kan-beyin-bariyerinden geçemeyecek büyüklükte olması ve dura mater gibi periferik kısımlara etkisi gibi nedenlerden dolayı odaklanılan CGRP reseptörüne yönelik yeni nesil spesifik migren ilaçları ise trigeminovasküler sistem üzerindeki CGRP iletimini engellemeye yönelik mekanizmaya sahip monoklonal antikorlar (mAb) ve CGRP reseptör antagonisti olan gepantlardır (16,50-52). Bu yeni nesil ilaçlardan önce kullanıma giren triptanların periferik vazokonstriktör etkisi sebebiyle başta kardiyovasküler sistem üzerinde oluşturduğu yan etkiler yeni nesil CGRP yolağını inhibe eden spesifik ilaçlarda görülmemektedir. Ancak bu yeni nesil spesifik ilaçların migren hastalarının yarısında etkili olması nedeniyle geri kalan yarısında etkili olabilecek farklı ilaç grupları ve yeni tedavi yaklaşımları üzerinde çalışmalar devam etmektedir (53, 54).

Kumarinler, organizmada birçok reseptör ve enzimlere bağlanırlar ve genellikle antioksidan, anti-inflamatuar, antikanser, antibakteriyel gibi son derece önemli özelliklere sahiptir (55). Eskuletin (6,7-dihidroksikumarin), *Fraxinus rhynchophylla*, *Artemisia capillaris* gibi Çin tıbbında kullanılan çok çeşitli bitkilerde bulunan kumarin türevi bir bileşiktir. Eskuletin, lökotrien B4'ün sentez yolağı ile ilişkili 5-lipoksijenazın güçlü bir inhibitörü olduğu için anti-inflamatuar özelliğini bu yolak üzerinden gösterdiği düşünülür (56, 57). Bununla birlikte yapılan çalışmalarda Eskuletinin nöroinflamatuvar sitokinlerin salınımını baskılaması anti-nöroinflamatuvar özelliğinin başlıca göstergesidir (58–61). Eskuletin'in nosisepsiyon üzerinde etkileri için çok çalışma yapılmamış olsa da, sıçanlarla yapılan bir çalışmada karrejen ile indüklenmiş inflamatuvar ağrı modelinde Eskuletin'in doza-bağılı olarak mekanik hiperaljeziyi azaltarak ve plazma lökotrien-B4 düzeylerini düşürerek anti-nosiseptif etkiler gösterdiği gözlenmiştir (62). Eskuletin'in aynı zamanda nöron uyarılabilirliğini ve voltaj kapılı iyon kanallarını inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Eskuletin'in nöronal uyarılmayı inhibe edici etkisinde kısmi GABAa reseptör agonisti özelliğinin de rol oynadığı kabul edilmektedir (63, 64). Bu özelliği göz önünde bulundurulduğunda, Eskuletin migren de dahil olmak üzere ekstasyon ile bağlantılı birçok hastalık için umut vadeci bir fitokimyasal olarak ortaya çıkmaktadır. Eskuletin'in kısmi GABAa aktivatörü, anti-nosiseptif, anti-nöroinflamatuvar, 5-lipoksijenaz inhibitörü gibi özellikleri birlikte değerlendirildiğinde migren modellerinde etkilerinin araştırılması bu alanda umut verici gelişmeler için bir kapı aralayabilir.

Sunulan tez çalışmasında, sıçanlarda eskületin'in farklı dozlarının NTG ile oluşturulan in-vivo ve ex-vivo migren modellerinde; mekanik hiperaljezi, beyin sapı nukleus trigeminalis'te c-fos ekspresyonu, meningeal mast hücrelerinin degranülasyonu ve sayısı üzerine etkileri ve plazma, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nukleus trigeminalis'te CGRP düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Migren

2.1.1 Tanım

Migren, yaygın, çeşitli genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıkan, tekrarlayıcı ve kişinin günlük hayatını kısıtlayan, baş ağrısı ile karakterize bir hastalıktır. 6000 yıldır bilinen bu rahatsızlığın hala kesin tedavisi bulunamamakla birlikte en eski migren tanımı medeniyetler beşiği Mezopotamya’da M.Ö 4000 yılına kadar dayanmaktadır. Ayrıca Avicenna olarak bilinen Türk filozof hekim İbn-i Sina (930–1,037) 5. Yy’da “The Canon of Medical Sciences” kitabında ağrının bazı yiyecekler ile uyarıldığını, kişinin ışığı tolere edemediği için karanlıkta yatak istirahatine ihtiyacı olduğunu yazmıştır (65).

Ataklar halinde gelen bu nörolojik rahatsızlık yetişkinlerde toplam popülasyonun yaklaşık %15’sini etkiler. Amerika’da yapılmış çalışmalara göre migren prevalansı kadınlarda yaklaşık olarak %18, erkeklerde ise %6’dır (66). Etkilenen bireylerde iş hayatındaki üretkenliklerinden hayat kalitelerine, günlük yaşantılarındaki basit eylemlere kadar birçok konuda kısıtlayıcı etki göstermektedir (67, 68).

Migren hastalarının yaklaşık %90’ı orta veya şiddetli ağrıya sahipken, dörtte üçünün baş ağrısı atakları sırasında görme yeteneği azalır, üçte biri ise atak döneminde yatak istirahati gerekecek kadar ağır bir dönem geçirirler (66).

Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) 2016 yılında dünya çapında gerçekleştirdiği “Global Burden of Disease” projesine göre migren, değerlendirilen 328 hastalık arasından, bireylerin kısıtlı hayat yaşamasına sebep olan 2. sıradaki hastalık olarak ortaya çıkmıştır. Baş ağrısına eşlik eden semptomlarla birlikte, hangi sıklıkla ve şiddetle yaşandığı kişiden kişiye göre değişken tablolar oluşturmaktadır. Kimi hastalarda herhangi bir kısıtlılık oluşturmadan, nadir ataklar halinde (ayda birden az) gelse de diğer yönden bazı hastalarda aile, iş ve sosyal yaşamlarını büyük ölçüde etkileyecek şekilde çok sık ve şiddetli, tedavisi zor bir şekilde gözlemlenebilir (69).

2.1.2 Evreler

Migren baş ağrısı 4 evreden oluşmaktadır;

1.Premonitor faz: Depresyon, yorgunluk, sinirlilik, hiperaktivite gibi zihinsel semptomlar ve esneme, hiperosmi, fonofobi ve fotofobi gibi nörolojik semptomların eşlik ettiği genel olarak baş ağrısından 2-72 saat önce başlayan evredir (70).

2. Aura: baş ağrısından önceki 1 saat içinde görülebilen geçici fokal nörolojik semptomlardır. Görsel aura en yaygın olandır ve migren hastalarının yaklaşık üçte birinde görülür.

3. Baş ağrısı: Zonklayan ve baş hareketleri ile kötüleşen baş ağrısı evresi, 4-72 saat sürmektedir. Allodini, osmofobi, fotofobi, fonofobi mide bulantısı ve kusma eşlik eden semptomlar arasındadır (71).

4. Postdrom: Yorgunluk, güçsüzlük, boyun ağrısı, gürültü ve ışık hassasiyeti gibi belirtilerin olduğu ağrı sonrası evredir. Migrenli hastalar arasında %81-%94 arasında görülür yani oldukça yaygındır. Semptomları, gastrointestinal, duyuşal, nöropsikiyatrik ve genel semptomlar olarak 4 ana grupta incelenebilir (72).

Migren auralı ve aurasız olmak üzere 2 ana başlıkta incelenmektedir.

Aurasız migrende ataklar, tekrarlayıcı ve nabız atımı (pulsatif) şeklinde hissedilir ve 4 ila 72 saat arasında sürer. Unilateral olarak hissedilmesi, fiziksel aktivite ile artış göstermesi, mide bulantısı, fotofobi ve fonofobi ile ilişkili olması başlıca özelliklerindedir (73).

Auralı migrende ise çift taraflı hissedilen, genellikle yavaş yavaş artış gösterip dakikalarca süren, görsel, duyuşal ve diğer santral sinir sistem semptomları eşlik eden ve devamında baş ağrısı görülen bir tablo gözlenir. Görsel aura en yaygın aura türüdür ve bu hastaların yaklaşık %90'ında gözlenir. Fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRI) çalışmaları görsel aura semptomlarının oksipital korteksteki kan akımı değişikliklerinden kaynaklandığını göstermektedir (74). Daha az sıklıkta görülen bir diğer duyuşal rahatsızlık ise vücudun herhangi bir bölümünün, yüzün veya dilin uyuşması hissidir. Ayrıca afazisi mevcut, konuşma bozukluğu yaşayan bireyler de bulunmakla birlikte bu nadir görülen bir aura tipidir (75).

Günümüzde, auranın nörofizyolojik bir olgu olan kortikal yayılım depresyon ve trigeminovasküler sistem aktivasyonundan kaynaklandığı bilinmektedir (65).

2.2 Migren Patofizyolojisi

2.2.1 Vasküler Teori

Vasküler teori ilk olarak 17. yy'da Thomas Willis tarafından ve migrenin kranial ve serebral damarların vazodilatasyonundan kaynaklandığı öne sürüldü (5). Daha sonra bu teori Graham ve Wollf'un yaptığı çalışmalarla daha da genişletilerek ilk olarak serebral damarların vazokonstriksiyonu ve bu olayı takiben vazodilatasyon sonucu gelişen vasküler bir mekanizması olduğu ileri sürülmüştür (76, 77). CGRP gibi güçlü vazodilatörlerle baş ağrısı ve migren ataklarının tetiklenmesi sumatriptan gibi günümüzde migren tedavisinde kullanılan vazokonstriktör maddelerle ağrı ve atakların hafiflemesi bu teorileri destekler niteliktedir (78, 79). Fakat bunların yanı sıra aurasız migren atakları esnasında yapılan ölçümler sonucu ekstrakranial arterlerde dilatasyon gözlenmediği bir çalışmanın ortaya koyulması ve baş ağrısı ile vazodilatasyon arasındaki korelasyon eksikliği bu teorinin bazı durumlarda yetersiz kaldığını, nörojenik inflamasyon gibi teoriler üzerinde daha sıklıkla durulması gerektiğini göstermektedir (80, 81).

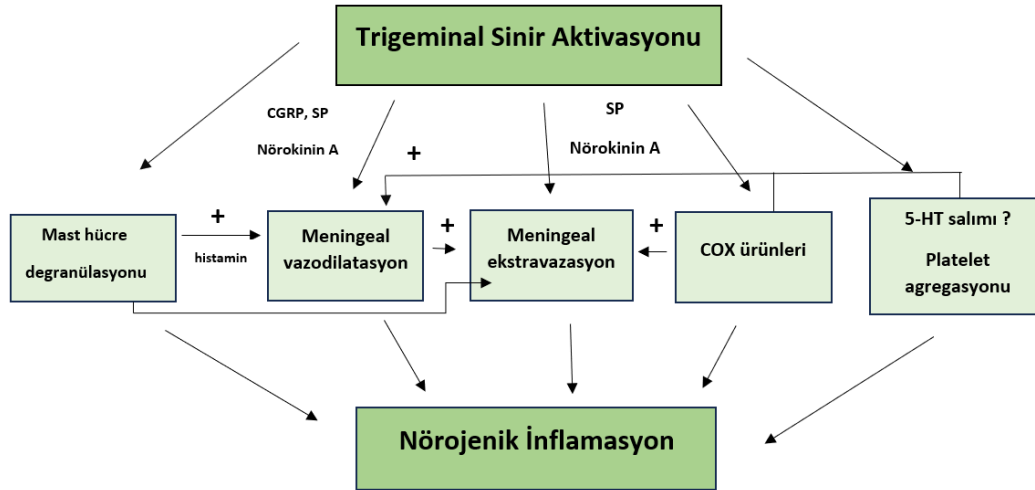
2.2.2 Nörojenik İnflamasyon Teorisi

Trigeminovasküler sistem, trigeminal sinir ve bu sinirin liflerinden oluşan, nosiseptif açıdan önemli kranial damarları inerve eden bir sistemdir. Trigeminovasküler sistemin periferik aktivasyonu miyelinsiz peptiderjik C-liflerinden, güçlü bir vazodilatör olan ve NO etkisiyle de periferik sinir uçlarından salınan CGRP'nin salımına yol açar. Bu nöropeptid dura materdeki mast hücrelerinden histamin ve serotonin salınmasına ve bunların etkisiyle sonuçta primer afferentlerin uyarılmasına sebep olur (81, 82). Miyelinli nosiseptif sinirler olan A δ -liflerinin ve bu lifleri barındıran nöronların üzerinde bulunan CGRP reseptörlerinin uyarılması da şiddetli baş ağrısına sebep olur (83).

Merkezi aktivasyon ise bu yapıların devamında uyarılan beyin sapı TNC'nin ikinci sıra nöronları ve servikal omurilik C1-C2 segmentinin uyarılması sonucu bu nöropeptidlerin salınmasıyla ilgilidir (84).

Migrenin ağrı fazında bu sistemde başlayan nöronal aktivasyon, CGRP, SP ve NKA gibi nöromodülatörlerin salınmasına sebep olduktan sonra, devamında gerçekleşen vazodilatasyon, mast hücre degranülasyonu gibi tetikleyici sebepler dura mater ve pia materi de kapsayan meninksler başta olmak üzere çeşitli dokularda inflamatuvar cevapların oluşmasına neden olur (Şekil 2.1) (84–86).

Bu teorinin önemli noktalarından biri de, hastalarda aura esnasında meydana gelen nörolojik semptomları açıklamada vasküler teorinin yetersiz kalmasıdır. Bu da migren patogenezi ve tedavisinin anlaşılması için nörojenik inflamasyon teorisinin üstünde durulması gerektiğini göstermektedir (87).



Şekil 2.1 Nörojenik inflamasyon teorisi

Trigeminal sinirin aktive olmasıyla salınan nöropeptitler, mast hücre degranülasyonuna, meningeal vazodilatasyona ve ekstrasvazyonuna, COX ürünlerinin salgımasına sebep olarak nörojenik inflamasyona yol açar (Şekil 2.1) (86).

2.2.3 Kortikal Yayılan Depresyon

Kortikal yayılan depresyon (KYD), nöronlar ve glial hücrelerden kaynaklanan korteks üzerinde 3–5 mm/dak hızla yayılan (yavaş ilerleyen) bir depolarizasyon dalgası ve ardından beyin aktivitesinin baskılanması olarak tanımlanmaktadır (88, 89). KYD, mekanik, elektriksel ve kimyasal uyarılarla tetiklendiği gibi kendiliğinden de meydana gelebilir. Ayrıca sinaptik aktiviteyi 5-15 dakika engellemekle birlikte devamında spontan bir şekilde normal fonksiyona dönüş yapar (90).

Beyin parankimasında, iyon dengesi bozulması sonucu başlayan KYD, glutamat, IL-1 β , iNOS/NO, K⁺ gibi meningeal olaylara ilişkin mediyatörler salgınmasına neden olur. Bu olayların devamında gerçekleşen vazodilatasyon ve salınan nöropeptitler inflamatuvar mediyatörlerin salgınmasına ve buna bağlı şekilde dural nosiseptörlerin aktive olmasına ve hassasiyete sebep olur. Bu durum bize KYD ve meningeal nosisepsiyon arasındaki bağlantıyı gösterir (91, 92).

Baş ağrısı ve KYD arasındaki önemli anatomik bağlantılar ise beyin sapı TNC ve trigeminal sinir tarafından innerve edilen ve değişiklikleri gözlemlemek için uygun bir yapı olan orta meningeal arterdir. TNC’de KYD ile artan c-fos ekspresyonu, KYD sonrasında 20 dakika içinde büyük artış gösteren MMA’daki kan akışı ve bu önemli arter etrafındaki plazma protein sızıntısı bu yapıların migrenin ağrı fazının açıklaması için kanıtlar sunmaktadır (39, 93, 94).

2.3 Migren’de Trigeminoasküler Sistem Teorisi

Migrende baş ağrısı, üst servikal bölgeler, temporal, frontal, oksipital ve parietal bölgelerde baskın iken, bölgesel baş ağrısı genelde temporal bölgede veya göz çevresi bölgelerinde hissedilir. Ağrı yollarında kısmen farklılıklar olsa da temel sebebinin trigeminoasküler sistemin aktive olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (11). Bu ağrının temelinin nöroasküler açıdan anlaşılması için, trigeminoasküler sistemin anatomisi ve fizyolojisinin iyi anlaşılması gerekir.

2.3.1 Trigeminoasküler Sistem Anatomisi

Serebral damarları innerve eden ve hücre gövdeleri trigeminal ganglionda bulunan nöronlar (1.sıra nöronlar), trigeminoasküler sistemi oluşturur.

Trigeminal ganglionun bipolar hücreleri, ağrı üretiminde büyük rolü olan kranial damarlar ve dura mater başta olmak üzere, diğer damarlar ve kranial yapılarla periferik olarak, üst servikal merkezler ve kaudal beyin sapı ile merkezi olarak sinaptik bağlantılar kurar (82).

Trigeminal gangliondan kaynaklanan lifler; dural, araknoid, pial damarlar ve büyük serebral arterleri innerve eden miyelinsiz C lifleri ve ince miyelinli A δ lifleri olup bu liflerin merkezi uzantıları TNC’ye (2. Sıra nöronlar) uzanarak bilgiyi burada ikinci sıra nöronlara aktarır (95). Migren baş ağrısı ile ilişkili yapıların innervasyonu, başlıca trigeminal sinirin oftalmik (V1) bölümü aracılığıyla olmaktadır bununla birlikte trigeminal sinirin maksiller (V2) ve mandibular (V3) bölümleri de bulunmaktadır. Dura mater’i trigeminal sinire ek olarak üst servikal dorsal kök ganglionlarından gelen sinirler de innerve eder. (Şekil 2.2) Bu yapıda herhangi bir elektriksel ve mekanik uyarıyla stimülasyon başladığında, baş ağrısı başta olmak üzere fotofobi ve mide bulantısı gibi semptomlar da ortaya çıkmaktadır. Ayrıca dural damarlardan uzakta oluşturulan uyarının çok daha az baş ağrısına sebep olması, bu damarların migrende ağrı yolağında büyük önem taşıdığını göstermektedir (11).

2.3.2 Asendan (Çıkan) Yolaklar

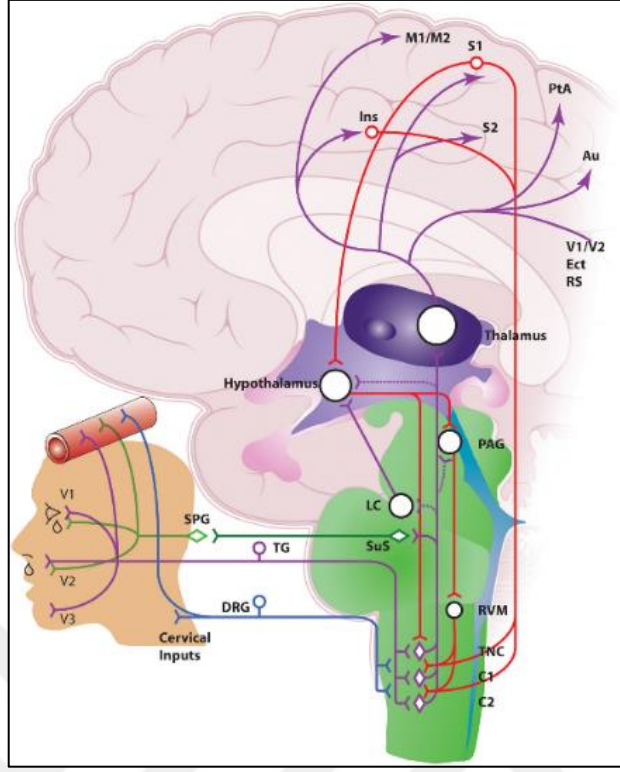
TNC ve servikal spinal korddaki C1 ve C2 bölgelerinin ortak ismi olan trigeminoservikal kompleks dural stimülasyon sonucu aktive olan; nükleus rafe magnus ve ponsun dahil olduğu Rostral ventromedial medulla, periaqueduktal gri gibi beyin sapı bölgeleriyle bağlantı yapmaktadır (96). Ayrıca baş bölgesi ve orofasiyal yapılardan visseral ve somatosensoryel nosiseptif bilgileri trigeminohipotalamik yol boyunca hipotalamusa, kaudal beyin sapı ve servikal bölgelerde işlenen bilgileri ise quintotalamik yol üzerinden talamustaki 3. sıra nöronlara taşır (95). Bu kompleks, yaptığı sinapslar nedeniyle ağrı iletimi ve hassasiyet oluşmasından ve nöromodülasyondan sorumlu ayrıca tedavi için kullanılan ilaçların hedef bölgesidir (97).

2.3.3 Santral Yapılar

Anterior singulat korteks, birincil (S1) ve ikincil (S2) somatosensoryel alanlar, prefrontal korteks ve talamus bütün nosiseptif uyarıların birleştiği ve işlendiği “ağrı matriksi” olarak adlandırılan yapılar nosiseptif işlemlerden sorumludur (95).

Derbyshire ve arkadaşlarının (1997) yaptığı, ağrı stimülasyonunun CO2 ile sağlandığı çalışmada, pozitron emisyon tomografisi kullanılarak, bölgesel serebral kan akımı değerleri kaydedilmiştir. Bu değerlere bakıldığında 14 hastanın 12’sinde anlamlı ölçüde aktive olan yapı anterior singulat kortekstir. İkinci sırada ise insula aktivasyonu yer almaktadır (98).

Anatomik yapılara bağlı hassasiyetlerle ilgili olarak, meningeal nosiseptörlerin hassaslaşmasının baş ağrısının TNC’deki merkezi trigeminovasküler nöronların hassaslaşmasının sefalik kütanöz allodininin, talamus’taki merkezi trigeminovasküler nöronların hassaslaşmasının ise ekstrasefalik allodininin kaynağı olduğu düşünülmektedir (99–101).



Şekil 2.2 Trigeminoasküler Sistem ve Migren (11)

Trigeminal gangliyon (TG), sfenopalatin gangliyon (SPG), rostral ventromedial medulla (RVM), locus coeruleus (LC), periaqueduktal grey (PAG), insula (İNS), birinci (S1), ikinci (S2) somatosensoriyel alanlar, trigeminal sinirin oftalmik (V1) maksiller (V2) ve mandibular (V3) bölümü, dorsal kök gangliyon (DRG) şekil 2.2’de gösterilmiştir.

2.3.4 Migrenle ilişkili sistemler ve nörotransmitterler

2.3.4.1 Sempatik Sinir Sistemi

Histamin, nitrogliserin gibi vazodilatörler sağlıklı bireylerde baş ağrısı, fotofobi ve mide bulantısı gibi semptomlara az sıklıkla sebep olsa da migren hastalarında bu belirtiler tetiklenebilir. Bu durum intrakraniyal damarlarda duyuşal liflerin olduğunu göstermektedir (102, 103).

Sempatik sinir lifleri, ipsilateral superior servikal gangliyonndan kaynak alır ve serebral kan damarlarını innerve etmektedir. Bu sinir liflerinin ana mediyatör transmitterleri sinir sonlanmalarında birlikte depolanan ve salınan vazokonstriksiyon aşamasında büyük önem taşıyan Nöropeptid Y ve noradrenalin’dir Aktivasyon ile gerçekleşen beyin-omurilik sıvısı (BOS) üretiminin azalması, kraniyal basıncın azaltılması ve serebrovasküler otheregölasyonun modülasyonu gibi olayları düzenlerler (104–106).

Gallai ve arkadaşlarının (1993), genç migrenli hastalar üzerinde yaptığı çalışmada, ataklar esnasında NPY düzeylerinin arttığı, ataklar arası dönemde ise azaldığı bu nöropeptidin migren üzerindeki etkisini göstermektedir (107).

2.3.4.2 Parasempatik Sinir sistemi

Parasempatik sinir lifleri, superior salivator nükleus içindeki hücre gövdelerinden kaynak alır, 8. kranial sinir liflerinden dağılır ve sfenopalatin ve otik ganglion ile sinaps yapar. Bu liflerin migren açısından önemi meningeal kan damarlarını innerve etmesi ve ağrıya sebep olan vazodilatasyona neden olmasıdır (103, 108).

Sfenopalatin gangliondaki, postganglionik parasempatik nöronların meningeal terminallerinin, superior salivator nükleus tarafından uyarılması, bu terminallerden, intrakranial damarların vazodilatasyonuna, meningeal nosiseptörlerin dural ve pial bölümlerini uyaran inflamatuvar moleküllerin salımına ve plazma protein ekstrasvazyonuna sebep olan VIP, Ach ve NO gibi nöromodülatörlerin salımına neden olur (68, 109).

2.3.4.3 VIP ve PACAP

Glukagon/sekretin ailesinde yer alan G-protein bağımlı reseptöre sahip bu iki vazoaaktif peptid, kranio-servikal damarlar üzerine güçlü bir etkiye sahiptir (73, 110). İki birlikte trigeminal ganglionun 1. sıra nöronlarında, trigeminoservikal kompleksin 2. sıra nöronlarında ve sfenopalatin ganlionunda yer alırken, PACAP38'in bağlanma bölgelerinin ek olarak durada perivasküler olarak yerleşmiş olan beyin mast hücreleri, talamus, hipotalamus, beyin sapı, orta serebral arter ve orta meningeal arterde yer aldığı görülmüştür (111–114). Tuka ve arkadaşlarının (2012), ratlarda NTG ile oluşturduğu migren modelinde, PACAP seviyesinin beyin sapı TNC'de anlamlı derecede yükseldiği ve trigeminal sistemin aktive olduğu görülmüştür (115). Burun, göz ve serebral damarları innerve eden sinirlerde bulunan bu nöropeptid, vazodilatör etkisiyle gözyaşı, burun akıntısı, konjunktival enfeksiyon gibi kranial otonomik semptomlara sebep olur (11).

Yapılan çalışmalarda parasempatik sistemin aktive olduğunu düşündüren hastalarda, migren atağı esnasında; kontrol grubuyla kıyaslandığında kronik ve epizodik migren hastalarının ataksız dönemlerinde plazma VIP seviyelerinin yükseldiği gözlenmiştir. Rizatriptan tedavisi uygulanan hastalarda, dış juguler venden alınan kan örneklerine bakıldığında VIP seviyelerinin anlamlı miktarda azaldığı tespit edilmiştir (116, 117).

Bu sonuçlar, VIP ve PACAP38'in periferal etkisini, santral sinir sisteminde ağrı öncesi rolü ve inflamasyona sebep olduğu sonucuna ulaşılmaktadır (11, 105).

2.3.4.4 Santral Sinir Sistemi

Migren ataklarında prodrom ve aura gibi nörolojik semptomlarla karakterize evreler o semptomlara özgü beyin bölgelerinde başlarken, baş ağrısı fazı meningeal nosiseptörlerin aktivasyonu ile başlar (118).

2.3.4.5 Talamus

Zagami ve arkadaşlarının (1991) yaptığı bir çalışmada, superior sagittal sinüs'in ve middle meningeal arter'in elektriksel uyarılmasıyla, yüksek derecede nosiseptif girdiye sahip trigeminal projeksiyonların bazı trigeminotalamik nöronlarda işlenmesi talamusun önemini göstermektedir (119). Aynı zamanda kaudal beyin sapı ve servikal korddan gelen nosiseptif bilgi de talamusa gelir ve burada işlenir (120). Bu nosiseptif bilginin kortikal düzeye ulaşmadan önceki son uğrak yeri ise, reseptörler aracılığı ile ağrının inhibisyonunda önem arz eden trigeminal servikal kompleks'deki ikincil nöronlardan kaynak alan ventroposteromedial çekirdektir (121, 122). Bu sebeple ventroposteromedial çekirdeğin anti-migren ilaçları için potansiyel bir hedef olabileceği düşünülür (123).

2.3.4.6 Glutamat reseptörleri

Santral sinir sisteminde önemli ve yaygın olarak bulunan bu eksitatör nörotransmitter migren patofizyolojisinde çok önemli bir rol oynamaktadır (124). Glutamat reseptörleri, talamusun yanı sıra merkezi ve periferik iletişimi sağlayan trigeminoservikal kompleks hipotalamus ve periakvaduktal gri madde olmak üzere ağrı modüle edici yapılarda yer alır (95).

Kasyon geçirgen iyonotropik glutamat reseptörleri NMDA, AMPA ve Kainat reseptörleri olmak üzere 3 ana başlıkta incelenir (125). Bu reseptörlerin migren için temel rolü nöronal depolarizasyon ile trigeminoservikal kompleks uyarılması ve nosiseptif uyarıya sebep olmalarıdır (120). NMDA reseptörleri bunun yanında, allodininin patofizyolojik karşılığı olarak kabul edilen merkezi ve periferik nöronal sensitizasyon ve hiperaljezide önemli bir rol oynar. Kutanöz allodini, ışık, gürültü, koku gibi nosiseptif olmayan uyarıların hastada nosiseptif bir etki oluşturmasıdır ve akut migren atağı esnasında sık rastlanır (126, 127).

Yapılan bir çalışmada glutamat enjeksiyonuyla hiperaljezik olan sıçanlara NMDA reseptör antagonisti olan MK-801 enjeksiyonu yapıldığı zaman inflamasyonu önlediği ve yapılan testlerde ağrı eşiğinin yükselmesi gibi olumlu sonuçlar gözlenmiştir (126). AMPA/Kainat reseptörleri ile ilgili kapsaisin kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada ise, trigeminoservikal kompleks’de nöronal aktivasyon belirteci olarak kabul edilen c-fos ekspresyonu, reseptör antagonistleri kullanılarak önemli ölçüde baskılanmıştır (128).

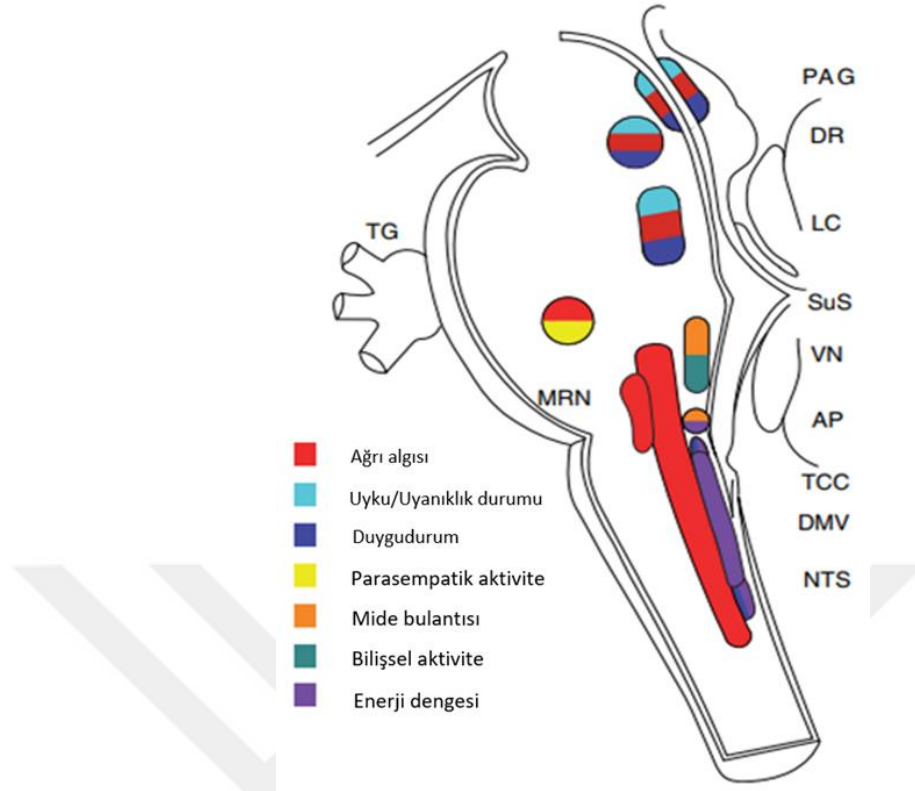
G proteini bağımlı metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR) ise 3 grup şeklinde incelenir. Grup 1, ikincil haberci olan fosfolipaz C’yi aktive ederek uyarılabilirliği artırır ve postsinaptik olarak bulunur. Bu sebeple pronosiseptif özellik gösterirken, grup 2 ve 3 ise adenil siklazı aktive ederek glutamat salımını azaltır ve antinosiseptif özellik gösterirler (123, 125, 129).

2.3.4.7 Hipotalamus

Migrende baş ağrısı fazından önce görülen uyku bozuklukları, duygu durum değişiklikleri, susama gibi hormon değişiklikleriyle ilişkili semptomlar, endokrin ve otonomik sinir sisteminin merkezi olan sirkadyen ritim gibi durumları düzenleyen hipotalamusla ilişkisini gösterir (112). Ayrıca migrende otonomik semptomların ortaya çıkmasında etkili olan SuS’la parasempatik nöronlar aracılığıyla bağlantı kurması, RVM, nükleus traktus solitaris, PAG gibi ağrı yolağında yer alan yapılarla direkt bağlantılar yapması da bu ilişkiyi desteklemektedir (11, 95, 130). Denuelle ve arkadaşlarının (2007) yaptığı PET çalışmasında orta beyin ve pons dışında ayrıca hipotalamus aktivitesi de gözlenerek migren ve hipotalamus bağlantısı ilk kez ispatlanmıştır (131). Bunlarla birlikte, somatostatin, oreksin, vazopressin, kalsitonin gibi antinosiseptif/analjezik etkiye sahip birkaç nöropeptit içerdiğine dikkat edilirse, bu yapının migren ağrısının patofizyolojisindeki potansiyel rolü daha iyi anlaşılabilir (132).

2.3.4.8 Beyin sapı

Trigeminoservikal kompleks’deki 2. sıra nöronlar, PAG, LC, RVM gibi beyin sapı yapılarıyla bağlantı kurar (133, 134). NTG ile tetiklenmiş ve serebral kan akışı sonuçlarına bakılarak değerlendirilen spontan migren atakları esnasında, beyin sapı aktivasyonunun artışına bakarak bu bağlantının ne kadar önemli olduğu anlaşılır (135, 136). Beyin sapı yapıları ve neden olduğu fizyolojik olaylar Şekil 2.3’te gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Beyin sapı ve kontrol ettiği fizyolojik olaylar

Beyin sapı ağrı iletimi, uyku ve uyanıklık durumu, stres ve duygu değişiklikleri, parasempatik kontrol gibi birçok fizyolojik olayda yer alan son derecede önemli bir anatomik yapıdır (Şekil 2.3) (136).

2.4 Nörojenik İnflamasyon

Nöronal bir aktive sonucu, trigeminovasküler sistemin merkezi ve periferik kısmında inflamatuvar bir reaksiyon gerçekleşmesi ve P maddesi ve CGRP gibi inflamatuvar mediatörlerin nöronlardan lokal olarak salınması nörojenik inflamasyon olarak tanımlanır (137, 138). CGRP, SP gibi inflamasyon peptidleri salımı sonucu C ve A δ liflerinde sürekli aktivasyon ve bu aktivasyonu takiben TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi major sitokinlerin salınması merkezi duyarlılaşma ve migren patofizyolojisiyle doğrudan ilişkilidir (16, 139).

2.4.1 Dura Mater

Meninkslerin en dış tabakasıdır ve trigeminal sinir başta olmak üzere, üst servikal sinir (C1-C3) tarafından inerve edilir (140, 141). Bu yapı, beyni büyük oranda koruyan orta meningeal arter başta olmak üzere santral arterlerce beslenir (9). Orta meningeal arter, migren patogenezinde vazodilatör etki göstererek büyük rol oynayan CGRP ve diğer nöropeptitleri barındırmakla birlikte trigeminal aktivasyon bu yapıda uzun süreli kan akışı

artışı meydana getirir (93, 142, 143). Dura mater ayrıca mast hücreleri, makrofajlar, dentritik hücreler gibi bağışıklık sistemi hücrelerini içerir (144, 145). CGRP ve SP mast hücrelerine etki ettiği zaman, histamin gibi vazodilatasyona sebep olan nörotransmitterler inflamasyona sebep olan sitokinler gibi maddelerin salınmasına yol açar (146, 147). Bu olaylar sonucu trigeminal afferentlerde hassasiyet ve ateşleme artışı görülmektedir (25). Trigeminal sinir uyarıldıktan sonra CGRP, SP, NO gibi nöromedyatörlerin salınmasının sonuçları 4 ana başlıkta incelenebilir. Bunlar glial hücrelerin aktivasyonu ve mast hücre degranülasyonu, plazma proteinlerinin ekstrasvazasyonu, damarların vazodilatasyonu ve son olarak inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salınmasıdır (8, 148). Nörojenik inflamasyon bu olaylar sonucunda meydana gelir ve kan-beyin bariyerinin geçirgenliğini artırarak immün hücrelerin SSS'ye geçmesinden, kronik ağrıdan ve merkezi duyarlaşmadan sorumlu olur (149).

2.4.2 Vazodilatasyon ve plazma protein ekstrasvazasyonu

Dural kan damarları, CGRP ve SP gibi vazoaaktif peptidler, sitokinler, gaz halindeki bir sinyal molekülü olan NO gibi maddeleri barındıran hücre tiplerinden oluşur ve bu maddeler vazodilatasyona dolayısıyla nörojenik inflamasyona aracılık eder. Örneğin SP, kan damarlarındaki NK1 reseptörlerine bağlanarak zar geçirgenliğine etki eder ve plazma proteini sızıntısına sebep olur. Ayrıca NK1 antagonistleri beyindeki kusma bölümüne etki eder ve antiemetik ilaçların geliştirilmesinde rol oynamıştır (13). CGRP ise düz kaslarda adenilat siklazı aktive ederek cAMP seviyesini yükseltir (150). Her iki nöropeptid de mast hücre degranülasyonuna ve dolayısıyla meningeal nosiseptörlerin daha duyarlı hale gelmesine sebep olur (8). PACAP enjekte edilmiş sağlıklı bireylerde MRI sonuçlarına göre orta meningeal arterde dilatasyona bağlı baş ağrısı görülmüş trigeminal sinirin birinci dalının uyarılmasıyla VIP salımı sonrası, parasempatik aktivasyon başlatılmış olup histamine bağımlı olarak NO ise düz kas hücresinde sırasıyla guanil siklazı, cGMP'yi ve Ca'ya duyarlı potasyum kanallarını aktive ederek damarların vazodilatasyonunu ve ağrı yolağını aktive etmektedir (40, 119, 151).

2.4.3 Bağışıklık Hücreleri

Mikroglialar SSS'de bulunan ve beyin korunmasında rol oynayan makrofajlardır (152). Astrosit hücreler ise kan-beyin-bariyerine katkıda bulunan, SSS dokusunda hücre dışı iyonik denge korunmasında rol alan hücrelerdir (153). SP, bu iki glial hücrenin aktive olmasına ve NF kappa-B sinyal yolağı ile proinflamatuvar sitokinlerin üretimine yol açar (154). Sitokinler ve kemokinler; astrositler, mikroglia ve T hücreleri tarafından salınır ve bunlar nosiseptif nöronları aktif hale getirir (155). Meningeal kan damarlarında

inflamasyona sebep olarak ağrıya aracılık ederler (156). Migren için en önemlileri IL-1, IL-6 ve TNF- α ve bir kemokin olan IL-8'dir (157). Önemli bir ajan olan TNF- α 'nın migren atağı esnasında kan seviyeleri yükselir, immün hücrelerin infiltrasyonuna ve doku ödemeine sebep olabilir (158). Kemokinler ise trigeminal sinirin aktivasyonunu ve vazoaaktif peptitlerin salınmasını uyararak inflamasyona aracılık eder. Lökositleri enfeksiyon bölgesine çeker ve kemotaksis özelliğine sahiptir (157, 159).

2.5 Mast Hücreleri

Mast hücreleri, genellikle yuvarlak, yaklaşık 10-20 mikrometre çapında olup birçok salgı molekülü içerir (160). Dokularda farklılaşan ve olgunlaşan kemik iliği hücrelerinin hematopoetik kök hücrelerin (HSC) miyeloid soyundan köken alan bu hücreler makrofajlara benzer şekilde dokularda bulunur. HSC'ler daha sonra mast hücre öncüllerine (MCP) farklılaşır. Öncül Mast hücrelerinin hedef dokulara göçü ve konumlanması, kemokinler ve yüzey adezyon moleküllerinin arasındaki etkileşim sonucu gerçekleşir (161). MCP'ler dokulara girdikten sonra mast hücrelerine farklılaşır ve burada çoğalır. Uzun ömürleri ve uygun mikro ortamlarda çoğalabilme yeteneklerinden dolayı etkileri uzun süreli olur. Ayrıca hasar görmüş dokuların onarımına, yeni kan damarlarının oluşumuna (anjiyogenez), doğuştan ve sonradan kazanılmış bağışıklık tepkilerine yardımcı olur (162–164).

Kemirgenlerde mukozal mast hücreleri (MMC), ara tip mast hücreleri (IMC) ve bağ dokusu mast hücreleri (CTMC) olmak üzere 3 tipi vardır (165). Bu hücrelerin önemli bir özelliği, ağrının ana mediyatörü olan CGRP reseptörlerini barındırmasıdır ve duyuşal nöronlara ve meningeal kan damarlarına bitişik olarak yerleşim gösterirler (166, 167).

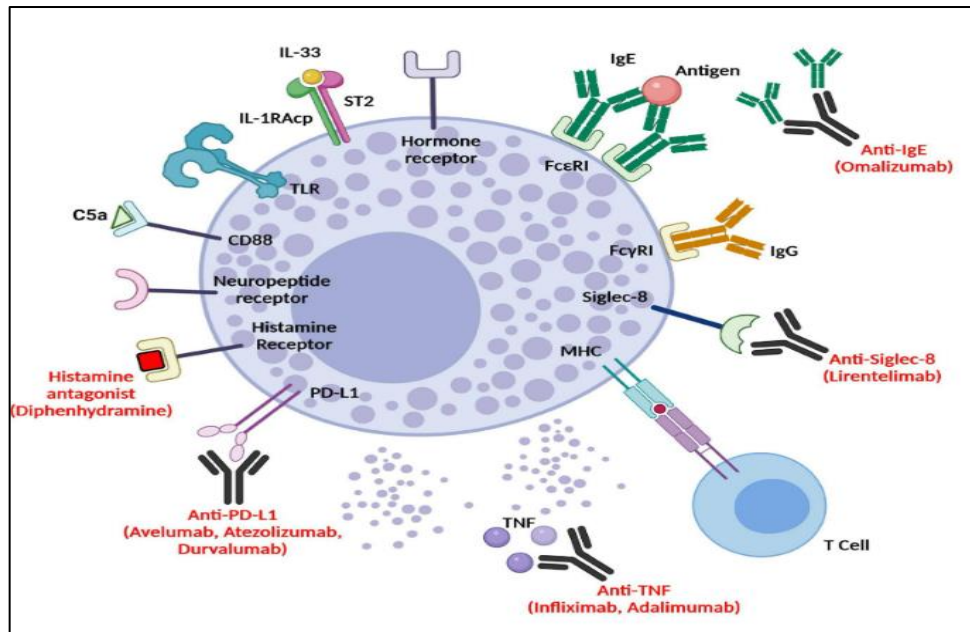
Triptaz, histamin, SP ve fazlaca sitokinleri içeren granülleri salma özelliklerinden dolayı granüositler olarak tanınır. Bu bileşikler nörojenik inflamasyon açısından son derece önemlidir (23, 145).

Bu hücrelerin homeostatik düzenleyici olarak kabul edildiği durumlar olsa da "degranülasyon eşiği" aşıldığı zaman onarım süreçlerine hasar verir, inflamasyonun kronikleşmesinden ve poliferasyon evresinin zarara uğramasından sorumludur (160). Bağışıklık sisteminin "ilk yanıtlayıcıları" olarak nitelendirilebilen bu hücreler, SSS'nin meningeal membranı başta olmak üzere dış yüzeye yakın yerlerde bulunmasından dolayı çevresel uyarılara hızlı bağışıklık yanıtları verirken mikroçevreye olan duyarlılığından dolayı ve ayrıca migren mediyatörleri ile ilişkisi sebebiyle, ağrı, inflamasyon, programsız

hücre bölünmesi gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte katkıda bulunur ve meninkslerin nörojenik inflamasyonunun ve ağrının başlıca sebeplerindedir (158, 168).

2.5.1 Mast hücre reseptörleri

Mast hücreleri, Fc reseptörleri (FcεR ve FcγR), Toll benzeri reseptörler (TLR), çeşitli sitokinler, patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP), nöropeptitler, hormonlar, proteazlar tarafınca aktif hale gelir (Şekil 2.4) (169, 170). Bu reseptörler bağlanan ligandlara göre birtakım fizyolojik olaylara sebep olurlar. MHC-I veya MHC-II (Majör histokompatibilite kompleksi) reseptörleri, T hücrelerini aktive ederek ve TNF- α ve IL-1 β salınımıyla dendritik hücre göçünü tetikleyerek sonradan kazanılmış bağışıklık sistemi üzerinde etki gösterir (171). Aynı zamanda mast hücreleri ve T hücreleri, iltihaplı dokuda birbirlerine yakın buldukları için aktif T hücrelerinin direkt teması, mast hücresi aktivasyonunu indükleyebilir (172). FcεRI'ye bağlı IgE, mast hücrelerinin fizyolojik olaylara hazırlanmasını destekler. IgE- veya IgG-antijen komplekslerinin çapraz bağlanması, mast hücre degranülasyonunu başlatır (164). Birincil duyuşal nöronlar, endojen hasarla ilişkili moleküler modelleri ve herhangi bir etkenle hasara uğrayan dokudan salınan eksojen patojenle ilişkili moleküler modelleri tanımak için TLR'leri eksprese eder Eksprese olan TLR aktivasyonu NF- κ B'nin yukarı regülasyonuna ve IL-1 ve TNF- α 'yı kodlayan genlerin transkripsiyonuna, bu da inflamatuvar sitokinlerin üretimini indükleyen kofaktör CD14'e bağlanarak ağrıya neden olur (173, 174).



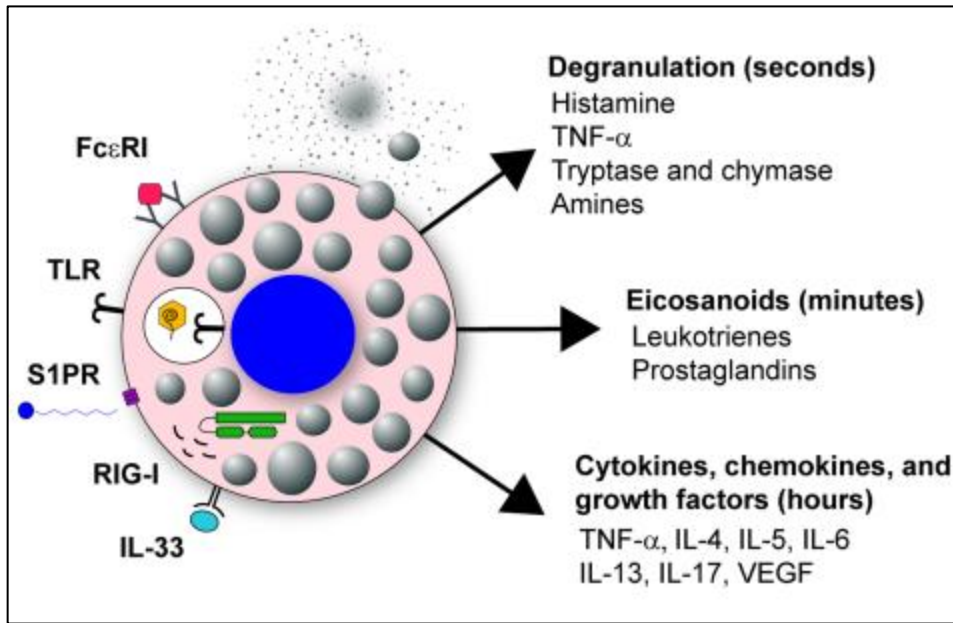
Şekil 2.4 Mast Hücre Reseptörleri (164)

2.5.2 Mast hücre araçları

Mast hücre granülleri, biyo-organik aminler (örn. serotonin, histamin vb.), proteazlar (örn. triptaz, kimaz vb.), proteoglikanlar (örn. heparin vb.), birçok sitokin (örn. tümör nekroz faktörü- α (TNF- α)), nitrik oksit (NO), eikozanoid (örn. prostaglandinler, lökotrienler vb.) ve kininler içerir. Uyarı sonucu granüller, Ca^{+2} bağlı ekzositoz yoluyla hücreden salınır ve depolanmış mediyatörleri dışarı bırakır. (Şekil 2.5) Diğer bir seçenek ise granüllerin parçalanmadan, ilgili hücreleri enfekte dokuya toplamak ve aktive etmek için kan ve lenfatik yolu kullanmaları ve sinyal mekanizması rolü üstlenmeleridir (65, 175–177).

Mast hücreleri çeşitli reseptörler aracılığıyla uyarıldıktan sonra aktivasyon fazları 3 aşamada sınıflandırılabilir. Bunlar:

- (1) Daha önceden sentezlenip depo edilmiş mediyatörlerin (Histamin, TNF- α , proteazlar, aminler) dışarı salınmasından sonra gerçekleşen ani degranülasyon
- (2) aktivasyondan sonra dakikalar içinde salgılanan prostaglandin ve lökotrienler
- (3) aktivasyondan uzun süre sonra salınan kemokin, sitokin ve büyüme faktörleri. Bu salınımlar ve kemotaktik moleküllerin etkisiyle aktivasyon gerçekleşir ve hücre geçirgenliği artar (24).



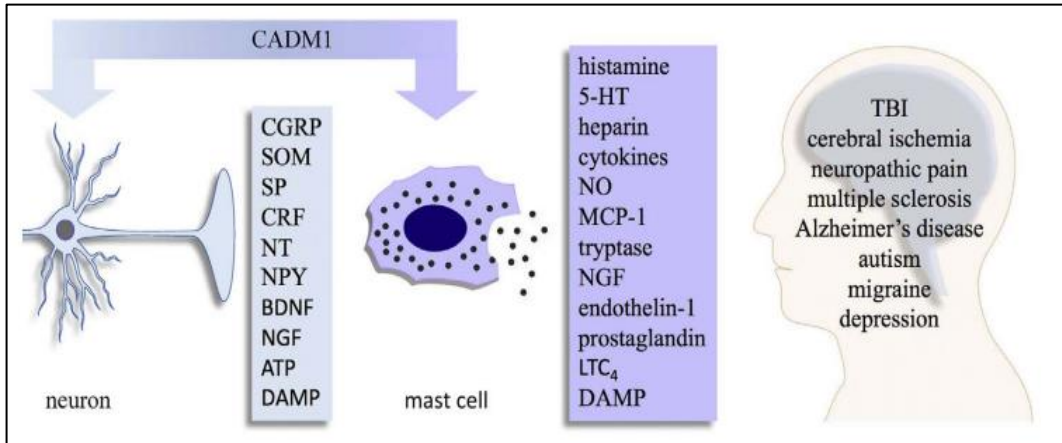
Şekil 2.5 Mast Hücreleri, aktivasyon fazları ve salgılanan mediyatörler (24)

İnflamasyon nöropeptitleri salındığı zaman mast hücrelerinden histamin salınımları indüklenir. Tam tersi şekilde histamin salınması da CGRP ve SP gibi nöropeptitlerin

salınımını uyarır. Bu çift yönlü etkileşim ağrı ve inflamasyonun temelini oluşturur. Aynı zamanda vasküler geçirgenliği artırır ve vazodilatasyona sebep olur (137, 178).

Triptaz sinir sonlanmalarında PAR-2(proteinazla aktive olan reseptör-2) 'yi aktif hale getirir. Ayrıca nötrofil infiltrasyonunu, plazma ekstravazasyonunu indükler ve sitokin salgılanmasını uyarır. PAR'lar, inflamasyon ve onarım başta üzere yaralanmaya verilen yanıtlarda oldukça önemlidir. İnflamasyon peptitlerinin sinir sonlanmalarında salınmasını uyaran TRPV1 kanallarını aktif hale getirir. Ek olarak PAR-2 agonistleri yaygın proinflamatuvar etkiye sahiptir (179–181).

Nöronlar, spesifik uyarılar sonucu birçok faktörün salınmasını sağlayan çeşitli araçlarla mast hücrelerini modüle ve aktive eder. Bu araçlar mikroglia, glia, nöronal hücrelerin fonksiyonları üzerinde etkilidir. Nöronlar ve mast hücreleri arasındaki bu etkileşim beyin hastalıklarının patolojisi üzerinde etkilidir (Şekil 2.6). NGF (Sinir büyüme faktörü), triptazın pro-NGF'yi parçalamasıyla oluşur ve mast hücrelerinden histamin başta olmak üzere pro-nosiseptif araçlar salgılanmasına sebep olur. Aktive edildikten birkaç saat sonra salınan bir dizi sitokin inflamasyondan ve bölgeye lökosit migrasyonundan sorumlu olurken, VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü), vazodilatasyona sebebiyet verdiği için dolayı ağrıdan sorumludur (182).

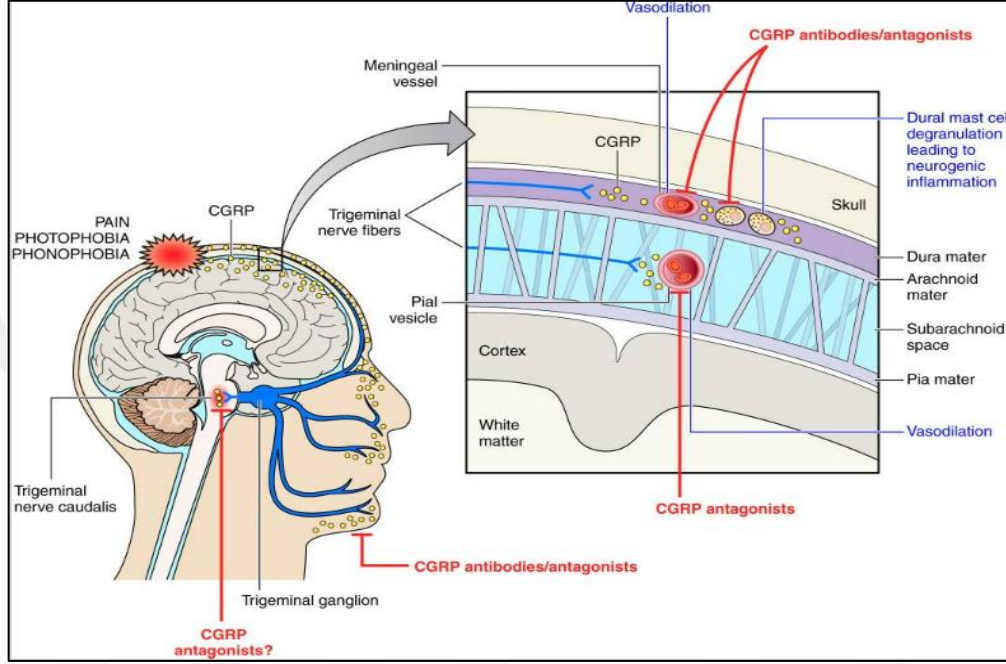


Şekil 2.6 Nöronlar ve mast hücre ilişkisi

CADM1 (cell adhesion molecule-1): Mast hücreleri ve nöronlar arasında adezyon ve iletişimi sağlar. 5-hidroksitriptamin (5HT), astroglia (AG), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), kalsitonin geni ilişkin peptit (CGRP), kortikotropin salgılayan faktör (CRF), tehlikeyle ilişkili moleküler modeller (DAMP), lökotrien C4 (LTC₄), monosit kemotaktik protein (MCP), sinir büyüme faktörü (NGF), travmatik beyin hasarı (TBI) (Şekil 2.6) (183).

2.6 CGRP

Kalsitonin gen ilişkili peptit, kalsitonin geninin haberci RNA'lar tarafından işlenmesinin bir ürünüdür (184). 37 aminoasitlik bu nöropeptidin, α CGRP ve β CGRP olmak üzere iki izoformu vardır ve CALC-I ve II genlerinden kopyalanırlar (14).



Şekil 2.7 CGRP ve migren patofizyolojisindeki rolü

CGRP, migren patofizyolojisinde önemli bir role sahiptir. CGRP, trigeminal afferent sinir liflerinden salınır, vazodilatasyona ve nörojenik inflamasyona sebep olur. Migren hastalarında hem merkezi hem de periferik CGRP seviyeleri yüksek olarak gözlenir. CGRP antagonistlerinin ve antikörlerinin, yükselen bu CGRP seviyelerini düşürerek ve etkilerini bloke ederek migren üzerinde etki ettiği düşünülmektedir. CGRP antikörlerinin etkileri periferle sınırlıyken, CGRP antagonistleri merkezi etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.7) (185).

Periferik sinir sisteminde CGRP'nin hedefi, meninkslerdeki trigeminal afferentler, glial hücreler, kan damarları, mast hücreleri ve trigeminal ganglionlardaki nöral hücre gövdeleridir (Şekil 2.7) (186). Hem miyelinsiz C lifleri hem de ince miyelinli A δ liflerinden salınır ve genellikle SP ile ko-lokalizedir (187). Bununla birlikte ratlarla yapılmış çalışmalarda CGRP'nin dural mast hücrelerinden histamin salınımını ve vazodilatasyonu önemli ölçüde tetiklemesi ve diğer nöropeptitlerden daha baskın bir rol oynaması CGRP'nin migren patogenezinde ana mediyatör olduğunu kanıtlar niteliktedir (188). Trigeminal sinirden perivasküler olarak CGRP salınımı, duraya yerleşik mast hücrelerinin

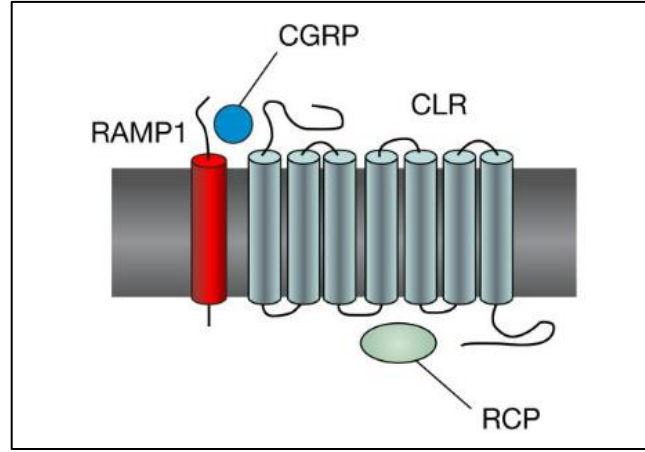
degranülasyonu, vazodilatasyon gibi inflamasyona ve buna bağlı ağrı, fotofobi, fonofobi gibi fizyolojik olaylara sebep olurken, inflamasyon ise aynı şekilde mast hücreleri üzerinde CGRP salınımını tetikleyerek çift yönlü bir etkileşime sebep olur (Şekil 2.7) (189, 190). Buna benzer şekilde mast hücrelerinden proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına sebep olan CGRP, salınan sitokinler tarafından uyarılarak duyuşal nöronlar üzerinde pozitif bir feedback döngüsü oluşturur (191).

Periferde CGRP üzerine etki gösteren bir diğere hücre türü ise glial hücrelerdir. Bu hücreler nöronal hücre gövdeleri etrafında mikro ortamı düzenler ve hücrelerin uyarılabilirlik durumunu kontrol eder (192). Yapılan bir çalışmada TG nöronlarının aktivasyonu, CGRP salgılanması ve komşu uydu glial hücrelerini uyarır. Bu uyarı sırasıyla IL-1 β salınmasını ve COX aktivitesini artırarak PGE2 üretilmesine sebep olarak aktivasyon ve nöronal hassasiyete sebep olur. Bu periferde CGRP-glial hücre etkileşimini göstermektedir (193).

CGRP reseptör antagonistlerinin kan-beyin bariyerini geçme yetenekleri çok az olduğundan, anti-CGRP tedavileri periferik odaklı olsa da SSS boyunca dağılmış CGRP reseptörleri merkezi sinir sisteminin de önemini göstermektedir (16, 194). Bu reseptörler, baş ağrısı ve mide bulantısından sorumlu olan beyin sapı ve trigeminovasküler sistemde, bir uyarıcı olarak tanımlanabilecek hipotalamusta, görsel semptomlar ve fonofobiden sorumlu süperior ve inferior kolliculusta ve beyincik gibi migren patofizyolojisinde önem taşıyan yapılarda bulunmaktadır (195).

2.6.1 Reseptörler

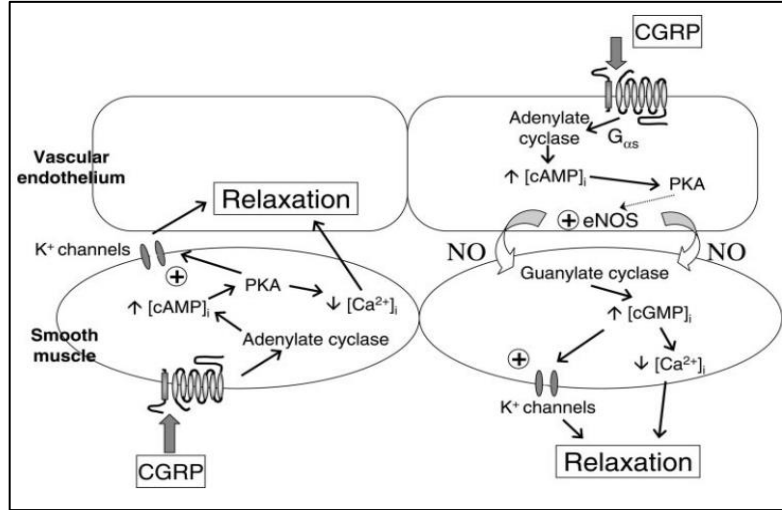
CGRP, amilin ve adrenomedullini de içeren kalsitonin (CT) ilişkili peptit grubuna dahildir ve trigeminal sistemin aktive olması, vasküler CGRP reseptörleri üzerinde etkili olan CGRP'nin salınımı ile sonuçlanır. Bu reseptörler, G protein ilişkili reseptör (GPCR), kalsitonin reseptörü (CTR), kalsitonin benzeri reseptör (CLR)'dür (16, 196). Bu reseptörlere ligandların bağlanmasını, farmakolojilerini, işlevselliğini kontrol eden yapı ise RAMP1 (Reseptör aktivitesini değıştiren proteinler)'dir (197). CLR'nin hücre yüzeyine taşınması ve CGRP bağlanması için CLR-RAMP1 birlikteliğı önemlidir ve tam bir reseptör özelliğı göstermeleri için birlikte sunulmalıdır (15). Ayrıca CGRP reseptör antagonistlerinin bir bağlanma bölgesi oluşturan bu yapıyı bloke ettiğı gözlemlenmiştir (198). Bir sitoplazmik protein olan RCP (reseptör bileşen proteini) ise reseptörün G-protein bağımlı sinyal mekanizmasının başlamasına yardımcı olur (Şekil 2.8) (199).



Şekil 2.8 CGRP reseptörleri (189)

2.6.2 Relaksasyon mekanizmaları

Vasküler baş ağrısının temel sebebi, orta meningeal arter ve serebral arterlerdeki CGRP reseptörlerinin sebep olduğu vazodilatasyon mekanizmalarıdır (200). Migren baş ağrısında da bu arterlerin dilatasyonunun rolü olduğu kabul edilmektedir. Bu vazodilatasyon mekanizmaları temel olarak endotel bağımlı ve endotelden bağımsız olarak 2 başlıkta incelenebilir. CGRP, endotel bağımlı bir reseptöre bağlanarak sırasıyla adenilat siklazı ve cAMP artışını tetikler. Bu artış PKA (Protein kinaz A) üzerinden etki eder ve katalitik alt birimi eNOS'u fosforile edip aktive ettikten sonra NO üretimine neden olur (201, 202). NO'nun düz kas hücrelerinden difüzyonu guanilat siklaz aktivasyonuna neden olur ve cGMP seviyelerini artırır. Potasyum kanalları açılır ve hücre içi kalsiyum miktarı azalarak damarların relaksasyonuna sebep olur (185, 203). Endotel bağımsız mekanizma ise düz kas hücrelerinden PKA'nın direkt potasyum kanallarına etki etmesiyle vasküler endotelde relaksasyona neden olur (Şekil 2.9) (204).



Şekil 2.9 CGRP ve neden olduğu relaksasyon mekanizması (204)

2.7 Trigeminal nükleus kaudalis'te c-fos ekspresyonu

Finkel, Osteojenik ve Sarkom kelimelerinin kısaltması olan “Fos” terimi, bir çeşit sarkom retrovirüsünün kodladığı geni tanımlamak için kullanılmıştır. Hücrel fos yani c-fos proteini, çoğu hücre tipinde az miktarda da olsa görülmesi normal olmasına rağmen sürekli veya düzensiz ekspresyonu da hücrede genetik değişikliğe neden olur (205). Yapılan çalışmalarda büyüme faktörleriyle tetiklenen c-fos seviyeleri 5 dakika sonra belirgin hale gelir 10 dakika sonra tepe noktasına ulaşır ve 15 dakika sonra azalmaya başlar (206). Hem proto-onkogen hem transkripsiyon faktörü olduğu bilinen ve nöronlarda hızla indüklenen bu gen acil erken genler sınıfına dahildir (207).

Trigeminal sinirler elektriksel, mekanik veya kimyasal herhangi bir uyararla tetiklendiği zaman intrakranial nosiseptif afferentlerin ana hedef bölgesi olan beyin sapı TNC lamina I ve II ‘yi uyarır. Bu uyarıdan sonra nöronal aktivasyon belirteci olan c-fos ekspresyonu gerçekleşir (208, 209). Nörotransmitterler gibi çevresel uyarılarla aktive olan membran reseptörleri, ikincil habercileri uyarırlar. Bu haberciler c-fos’un da aralarında bulunduğu acil erken genleri uyarır. Daha sonra nöronlarda uzun vadede değişikliğe sebep olacak spesifik geç cevap genlerinin uyarılmasıyla sonuçlanır.

2.7.1 Trigeminal nükleus kaudalis'te c-fos ekspresyonuna aracılık eden reseptörler

2.7.1.1 Kapsaisin Reseptörleri

Meningeal inflamasyon modellerinde yaygın olarak kullanılan kapsaisin, ağrıyı tetikleyen termal ve kimyasal uyarılar tarafından aktive edilen Vanilloid (VR1) reseptörlerini uyarır. VR1 reseptörleri, dorsal kök ganglionların lamina I-II'sinde, trigeminal ganglion ve trigeminal çekirdek gibi nosiseptif bilgiye aracı olan yapılarda bulunur (210, 211).

Bu reseptörler aynı zamanda ağrı mediyatörleri olan CGRP ve SP'nin salınmasını tetikler. Hayvan modellerinde, baş ağrısını tetiklemek ve beyin sapı TNC'de c-fos ekspresyonunu indüklemek için intersisternal olarak kapsaisin enjeksiyonu çalışmalarda kullanılmaktadır (212, 213).

2.7.1.2 Glutamat Reseptörleri

Presinaptik glutamat terminalleri TNC'nin lamina II'sinde bulunur ve bu ana uyarıcı nörotransmitter nörotransmisyon ve nosisepsiyonda büyük bir rol oynar (214). Glutamat, hem metabotropik reseptörü olan mGluR hem de iyonotropik reseptörler olan NMDA, AMPA ve kainat reseptörleriyle etki gösterir. Bu reseptörlerin agonistleri hayvan deneylerinde termal allodini, hiperalzeji ve c-fos ekspresyonuna yol açarken, MK-801 gibi antagonistleri ise bu etkileri büyük ölçüde azaltır (126, 215).

2.7.1.3 GABA Reseptörleri

GABA (Gama aminobütirik asit), glutamat gibi hem iyonotropik hem de metabotropik reseptörler aracılığı ile etki gösterir ve başlıca inhibitör etki gösteren nörotransmitterlerdendir (216).

GABA sentezini artıran ve GABA aminotransferaz inhibitörü olan valproik asit ile yapılan çalışmalarda, beyin sapı TNC'de artmış c-fos seviyesinin düşürülmesi, bu nörotransmitter reseptörleri yoluyla baş ağrısı ve beraberindeki etkilerin modüle edilebileceğini göstermiştir (213, 217).

2.7.1.4 NK-1 Reseptörleri

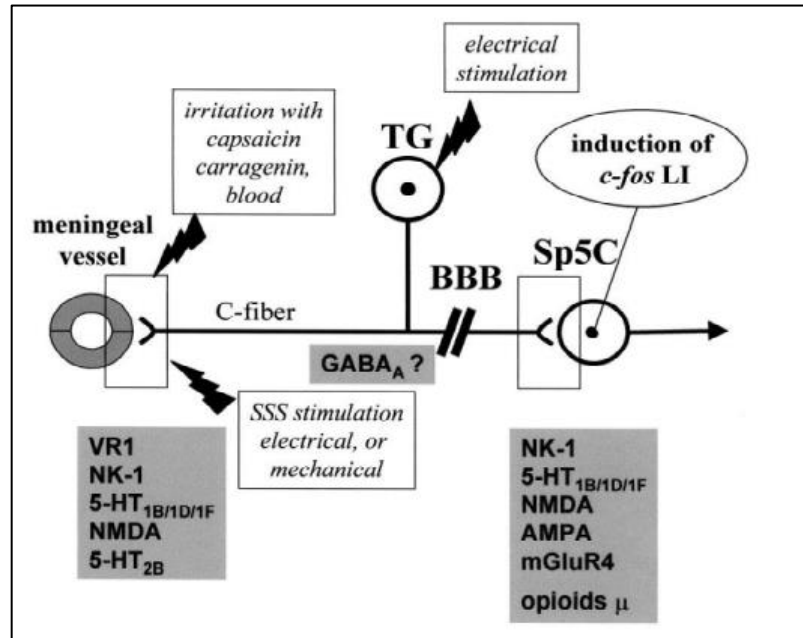
Ağrı yolağında rol oynayan SP reseptörü olan NK-1 TNC ve dorsal boynuzun yüzeyel katmanlarında bulunmaktadır (218).

Primer meningeal afferentlerin uyarılmasıyla artan beyin sapı TNC üzerindeki c-fos ekspresyonu, NK-1 reseptör antagonistleriyle azaltılmış olması reseptör blokajı ile akut migren ağrısı için bir hedef olabileceğini göstermiştir (213).

2.7.1.5 Serotonin Reseptörleri

5-HT reseptörleri 7 ana alt sınıfta incelenir ve hem iyonotropik hem de metabotropik tipleri vardır. Günümüzde migren tedavisi için kullanılan triptanlar, serotonin 5-HT_{1B/1D}-reseptör agonistleridir. Triptanların etki mekanizması, trigeminoservikal kompleks'in ikinci sıra nöronları boyunca iletimin inhibisyonu, periferik nöronal inhibisyon ve kranial vazokonstriksiyon olarak 3 şekilde incelenebilir. Bu şekilde aktive olmuş trigeminal afferentlerin inhibisyonuna ve nosiseptif etkinin azalmasına yardımcı olurlar (219–221).

In situ hibridizasyon teknikleri ile 5HT_{1B} reseptörleri üzerine yapılan bir çalışmada, bu reseptörlerin TNC ve TG üzerinde CGRP ve SP ile birlikte yerleştiği ve dolayısıyla ağrı modülasyonu peptidlerinin salınımını kontrol ettiğini göstermektedir (222). 5-HT reseptörleri üzerinden triptanlar grubuyla yapılan çalışmalarda ise, bu anti-migren ilaçlarının beyin sapı TNC üzerinde artmış c-fos ekspresyonunu baskıladığı ve CGRP salımını önlediği ve artmış TG aktivasyonunu azalttığı gözlenmiştir (223, 224). Trigeminal kaudalis içindeki c-fos indüksiyonunda rol alan reseptörler Şekil 2.10'da gösterilmiştir.



Şekil 2.10 Trigeminal kaudalis içindeki c-fos indüksiyonunda rol alan reseptörler

Trigeminal gangliyonun ve meningeal damarların kimyasal, elektriksel veya mekanik olarak uyarılması; nöropeptitlerin salınması, inflamasyon ve TNC'den c-fos salınımıyla sonuçlanır (32).

Meningeal damarların ve TG'nin çeşitli uyarılarla (elektriksel, mekanik veya kimyasal) uyarılması sonucu sinir liflerinin aktive olması, CGRP/SP nöropeptidlerinin salınmasına ve bunu takiben inflamasyona sebep olur. Bu olayların devamında TNC içindeki ikinci sıra nöronların uyarılması, nöronal aktivasyon belirteci olan c-fos salınımıyla sonuçlanır. (Şekil 2.10)

2.8 Nitrogliserin ile oluşturulan akut deneysel migren modeli

Nitrogliserin (NTG) bir NO donörüdür. Gaz halindeki bir sinyal molekülü olan NO, vücuttaki çoğu dokuda bulunur ve sentezi endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) tarafından katalizlenir (225, 226). eNOS, dural arterlerin endotel hücrelerinde ve serebral arterlerde yer alırken, nNOS ise özellikle beyincikte, kortekste daha fazla olmak üzere birçok merkezi nöronda, trigeminal ganglionda CGRP ile birlikte bulunur. Aynı zamanda adrenerjik ve kolinerjik olmayan ya da nitroksiderjik lifler olarak adlandırılan serebral arterlerdeki parasempatik sinir liflerinde lokalize olmuşlardır (227–230).

Bu sinirler uyarıldığı zaman ekstraserebral ve serebral arterler vazodilate olurken, sıçanlarda kan damarlarının vazodilatasyonu trigeminal ganglionun uyarılması ve CGRP'nin salınması ile gerçekleşir (229). Aynı zamanda NO'nun SSS'de yer alması ve tetikleyici uyarıları periferden talamus ve neokortekse taşınması ağrı yolağındaki önemini göstermektedir (102). Histamin H1 reseptörlerine bağlanarak endotelde NO oluşturan NOS'u aktive ederken, NTG serebral arter endotelinden difüze olarak düz kas hücrelerinde NOS'dan bağımsız şekilde NO oluşturur. Oluşan NO düz kas hücresinde sırasıyla guanil siklazı, cGMP'yi ve Ca'ya duyarlı potasyum kanallarını aktive ederek damarların vazodilatasyonunu ve ağrı yolağını aktive etmiş olur (40–42).

Ratlar üzerinde yapılan deneylerdeki gözlemlere bakılarak baş kaşıma ve tırmanma gibi ağrı göstergesi davranışlarının NTG enjeksiyonu sonrası muhtemel artmış nosisepsiyonla tetiklenmesi, TNC üzerinde c-fos ekspresyonunu artırması, ana mediyatör olan CGRP salınımını artırması, inflamasyonla ilişkili IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi sitokinler artarken buna bağlı temel yolak olan NF- κ B p65'in aktifleşmesi ve allodini / hiperaleji ile

doğru orantılı ilişkisi bu maddenin migren modellerinde çoğunlukla kullanılmasının temel sebebidir (231–233).

2.9 Güncel migren tedavileri

Günümüzden yaklaşık 100 sene önce migrene spesifik olarak tedavide kullanılan ilk ilaç bir alkaloid olan Ergotamindi (234, 235). Sempatik sinirlerin uyarılmasını bloke ettiği ve vazokonstriktör etkisiyle uzun yıllar migren için kullanılan temel ilaç olmasına rağmen beraberinde getirdiği yan etkilere ve çok kullanılmasının baş ağrısını tekrar tetiklemesinden kaynaklı yeni tedaviler konusunda araştırmalar sürmektedir (56, 236–238).

Yapılan bir araştırmada, çalışma dahilindeki mevcut popülasyonun %34’ü opioid türevi ve barbitürat gibi sedatif ilaç kullanmakla birlikte sadece %20’si migrene özđü ilaçla tedavi edilmekteydi (239).

Günümüzde migren tedavileri üzerinde daha çok bilgi sahibi olmak için patogeneizde rol oynayan ajanlar üzerinde araştırmalar devam etmektedir. Baş ağrısı fazında plazma serotonin seviyelerinin düşmesi, meninksler üzerinde periferik sinir terminallerinde nosiseptif aktiviteyi tetiklemesi gibi sebepler 5-HT reseptörlerinin migren tedavisi açısından önemli olduğunu gösterir (240–242).

Örneğin 5-HT1’in sempatik sinirin inhibisyonu ve vazokonstriksiyona, 5-HT2’nin ikincil haberciler aracılığıyla vasküler düz kas hücrelerde kasılmaya yol açtığına ve 5-HT7’nin cAMP artışı ile vazodilatasyona sebep olduğu ve migrenle ilişkili olduğu bilinmektedir (243).

5-HT1 reseptörleri agonisti olup özellikle 5-HT1B/D’ye affinite gösteren “triptanlar” vazoaktif nöropeptitlerin salımının inhibisyonu ve ilgili anatomik yapılarda ağrı sinyalinin azaltılması gibi yollarla migren tedavisinde önemlidir (Şekil 2.11) (49, 244).

Sumatriptan, rizatriptan, almotriptan, eletriptan, frovatriptan, zolmitriptan, naratriptan gibi alt tipleri olan bu analjezikler her ne kadar güncel tedaviler içinde olsa da fazla alınmasının baş ağrısını daha fazla tetiklemesi ve güçlü vazokonstriksiyona sebep olması ile özellikle kardiyovasküler açıdan risk taşıyan hastalarda kontra-endikedir (55, 245). Migren, bu hastalar için risk faktörü olduğundan aslında büyük bir grubun triptan kullanmasının önüne geçmektedir (246). Aynı zamanda kan beyin bariyeri geçişleri düşük olduğu için etkilerinin periferde kısıtlı olduğu söylenebilir (247).

Diğerlerinden farklı olarak 5-HT_{1F} reseptörleri damarların kontraktilesi ve çapı üzerinde etki göstermediği için yeni bir tedavi olarak ümit vermiştir. Şimdiye kadar 5-HT_{1F} reseptör agonisti olan LY344370 ve lasmiditan ile yapılan çalışmalarda duysal perivasküler sinirlerden CGRP salımını inhibe etmesi, oral alımından 1 saat sonra TNC üzerinde c-fos salımını düşürmesi ve baş ağrısı şikayetini azaltması gibi sonuçlar alınmıştır (248–250).

Trigeminal ganglionda ve intrakraniyal damarlarda bulunan, bununla birlikte serebral damarlar üzerinde vazodilatör etkisi olup baş ağrısına yol açtığından dolayı CGRP, tedavi seçenekleri açısından üzerinde durulan diğer bir ajandır (251).

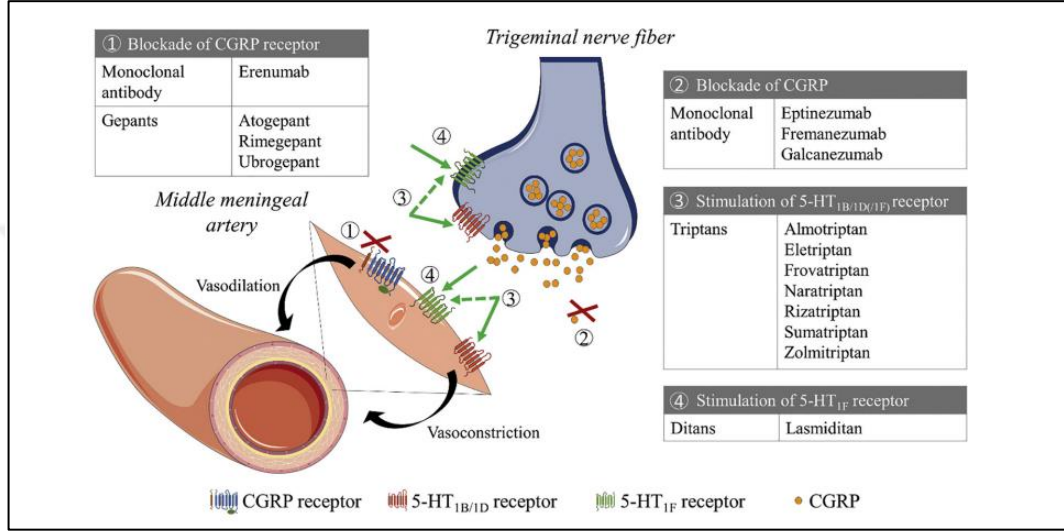
Migren atakları esnasında artış gösteren bu nöropeptitin inhibisyonu için CGRP reseptör antagonisti olan “gepantlar” üzerinde araştırmalara başlanmıştır. Olcegepant, Rimegepant, Ubrogapant gibi türleri olan bu grup, triptanların sebep olduğu vazokonstriksiyon kaynaklı kardiyovasküler risk açısından güvenli olması ve semptomlara sebep olmaması önemli bir avantajlarıdır (54, 252). Birincil nesil gepantlardan olan olcegepant üzerinde yapılan çalışmalarda, kullanımından 2 saat sonra baş ağrısı üzerinde etki gösterse de, başta parestezi olmak üzere mide bulantısı, anormal tat alma ve düşük oral biyoyararlanım nedeni ile çok geliştirilememiştir (253, 254).

Daha sonra olcegepantın aksine oral alım için geliştirilen ikincil nesil gepantlara bakıldığında fotofobi, fonofobi gibi migren ilişkili semptomlar üzerinde etkili olsa da devamında yükselen alanin aminotransferaz (ALT) seviyelerinin sebep olabileceği hepatotoksisite problemleri nedeni ile kullanımı sınırlandırılan Telcegepant sonrasında diğer gepantlar üzerine araştırmalar devam etmiştir (255–257). Sonuçta CGRP reseptör antagonistlerinden FDA onayı alan ubrogapant ve atogepant’ın çok az yan etkili ile tedavide büyük oranda başarılı olduğu ortaya çıkmıştır.

Tedavi için CGRP’yi hedef alan diğer bir grup ise Monoklonal antikorlardır (mAb) (52). Bu antikorların asıl amaçları trigeminovasküler sistem üzerindeki CGRP iletimini engellemektir (Şekil 2.11) (53). Bu 2 şekilde gerçekleşir ve ilaç grubu ona göre ayrılır. Birinci grup CGRP reseptörünü bloke ederek etki gösteren erenumab, ikinci grup ise sinir liflerinden salınan CGRP’yi tutarak direkt devre dışı bırakılmasına neden olan galcanezumab, fremanezumab, eptinezumab’dır (49, 139, 258).

Her gün kullanım gerektiren ilaçlarla kıyaslandığında etki süreleri uzundur ve diğer migren ilaçları oral olarak günde 1-3 arasında kullanılırken bu grubun ayda 1 kere kullanılması yeterlidir. Büyük boyutta oldukları için hedef özgüllüğü yüksektir ve kan beyin

bariyerini geçemedikleri için merkezi sinir sistemi üzerinde hedef dışı toksisite özelliği yoktur (259, 260). Bu gibi özellikleriyle avantajlı olarak görünseler de bu antikörlerin profilaktik tedavi için kullanılması ve bırakıldıkları zaman migren atağını ve şiddeti de dahil önemli yan etkilere sebep olabilecekleri tereddütüdür. Bu durum ilaçlardaki eksik ve yan etkileri nedeniyle tedavi konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (261). Migrene özgü ilaçlar ve hedef bölgeleri Şekil 2.11’de gösterilmiştir.



Şekil 2.11 Migrene spesifik ilaçlar ve olası hedefleri

Migren ilaçları, 5-HT_{1B/1D/1F} reseptörlerini uyararak veya CGRP reseptörünü bloke ederek etki gösterir (Şekil 2.11) (247).

2.10 Eskuletin

Basit kumarinler sınıfında incelenen, 6,7-dihidroksikumarin olarak da bilinen eskuletin, geleneksel Çin tıbbına ait *Cortex Fraxini*, *Viola yedoensis* gibi bitkilerin etken maddesidir (262, 263). Bu bitkinin dal ve ağaç kabuğu gibi çeşitli bölgeleri ilaç ve takviye amaçlı kullanılmaktadır. Başta anti-inflamatuar ve anti-nosiseptif olmak üzere, antioksidan, antikoagülan, antibakteriyel, antitümör, antidiyabetik ve karaciğer üzerinde koruyucu olarak birçok alanda etki göstermektedir (264). Eskuletinin de dahil olduğu kumarin bileşikler elektron ve yük taşıma özelliklerine bakıldığında kimyasal olarak aktiftirler bundan dolayı farmakolojik aktiviteleri güçlüdür. Ayrıca düşük yan etkilere sebep olması, biyoyararlanımının yüksek olması, ilaç dirençlerinin düşük olması gibi sebeplerle çeşitli hastalıklar için incelenmeye ağırlık verilmiştir (265, 266).

2.10.1 Anti-inflamatuar ve anti-nosiseptif rol

İnflamasyon, yabancı bir organizmaya karşı gelişen ve onarmak için başlayan fizyolojik bir süreçtir. Nötrofiller, makrofajlar, T-lenfositleri gibi bağışıklık hücreleri ve dokuların stromal, parankimal hücreleri inflamasyonda rol oynar (267). Örneğin viral enfeksiyonda sitotoksik lenfositlerin aktivasyonu, IFN- α , IFN- β üretimi gözlenirken, bakteriyel enfeksiyonlarda ise makrofajlar tarafından prostaglandin E (PGE2), IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi sitokinler ve kemokinler salgılanır. Bu ajanlar bölgeye nötrofil göçü, vazodilatasyon gibi olaylara yol açar ve buradaki olaylar bölgedeki nosiseptörler tarafından hissedilerek ağrı hissine sebep olur (268, 269).

NF-kB faktörü, başta inflamasyon olmak üzere hücre ölümü bağışıklık gibi fizyolojik olaylar için önemli bir rol üstlenir (270). İnflamasyon öncesi uyarılara cevaben sitokinler, oksidatif stres, patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMPs), NF-kB transkripsiyon faktörleri; hücrel adezyon molekülleri, sitokin ve kemokin gibi pro-inflamatuar genleri indükler (271). NF-kB transkripsiyon faktörleri E-selektin, VCAM, ICAM gibi adezyon moleküllerini, COX-2 ve iNOS gibi enzimleri, IL-8 ve MCP1 gibi kemokinleri, LTA, LT β , IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α gibi bağışıklık ve inflamasyonla ilgili önemli sitokinleri kontrol eder (272).

Pro-inflamatuar yolda rol alan bu faktörün inhibisyonu için önemli bir anti-inflamatuar olan Eskuletinle çeşitli çalışmalar yapılmıştır. E.coli ve LPS (lipopolisakkarit) ile indüklenen sepsis modeli üzerinde Eskuletin kullanılarak yapılan bir çalışmada, IL-1 β , IL-6, TNF- α ve CCL2 protein seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı, ve bu sitokinlerin üretilmesinde önemli rol oynayan NF-kB ve STAT1/3 (sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü) aktivasyonunun baskılandığı gözlemlenmiştir (273).

LTA ve LPS ile indüklenen başka çalışmalarda, RAW 264.7 makrofajları değerlendirilmiş ve NF-kB faktörü baskılanırken, oksidatif hasara karşı koruma sağlayan Nrf2'yi aktifleştirmiş, inflamasyon belirteçlerinden olan NO ve PGE2 üretimi inhibe edilmiş buna bağlı olarak da COX-2 ve iNOS ekspresyonunda Eskuletin kaynaklı azalma gözlenmiştir (274, 275).

Fraxinus rhynchophylla'dan üretilen eskuletin'le, fareler üzerinde yapılan atopik dermatit çalışmasında, belirgin semptomlar olan kulak şişmesi ve kaşıntı doza bağımlı şekilde belirgin ölçüde azalmış, serumdaki IgE, IgG2a ve histamin seviyeleri düşmüştür.

Bununla birlikte, kemokinlerin (CCL17) , Th1 (TNF- α , IFN γ) ve Th2 sitokinlerinin (IL-4, IL-13) ekspresyonu baskılanmıştır (276).

TNF- α , prostaglandin gibi inflamatuvar mediyatörleri salgılayan makrofaj hücreleri, inflamasyon açısından son derecede önemlidir (277). Yağ dokusu tarafından salgılanan MCP-1 (monosit kemoatraktan protein-1), makrofajların yağ dokusuna infiltrasyonunu sağlayan önemli kemokinlerdendir (278). Buraya sızan makrofajlar ilk önce inflamasyonu daha sonra buna bağlı obeziteye sebep olur. Bu noktada Eskuletinle ilgili yapılan bir çalışmaya bakıldığında, TNF- α , NO, MCP-1 üretiminde inhibisyon gözlenmiş, güçlü bir antioksidan enzim olan ve hücrel hasar ve iltihaplanmada rol oynayan hem-oksijenaz-1'in (HO-1) ekspresyonunu indüklemiştir. Bu Eskuletin'in anti-inflamatuvar özelliğinin yanı sıra obezitede inflamasyonu önlediği için dolaylı olarak anti-diyabetik etkisini ve HO-1'i indüklediği için anti-oksidan özelliğini de göstermektedir (279).

Eskuletin'in LPS ile indüklenen nöroinflamatuvar süreçlerin değerlendirilmesi üzerine yapılan bir çalışmada, kuyruk süspansiyon ve yüzme testinde Eskuletin uygulanmasıyla hareketsizlik sürelerinin azaldığı, NF-kB ve buna bağlı olarak serum ve hipokampüste IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerinin de önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Aynı zamanda, Eskuletin'in hipokampusta BDNF/p-TrkB (beyin kaynaklı nörotrofik faktör/fosforile tirozin kinaz B) protein ekspresyonunu yukarı regüle etmesi Eskuletin'in anti-depresan etkisinin ve nöroprotektif rolünün de kanıtıdır (280).

Eskuletin'in başka bir özelliği ise güçlü bir 5-Lipoksijenaz (5-LOX) inhibitörü olmasıdır. Bu yol inflamasyon ve ağrı üzerinde rol oynayan lökotrienlerin oluşumunda görev alır ve inhibisyonu inflamatuvar ağrı başta olmak üzere farklı türde ağrıların hafifletilmesinde önemli rol üstlenir. Yapılan bir çalışmada eskuletin kullanımı sonrası, nötrofillerin bölgeye göçünü tetikleyen ve bugüne kadar bilenen en güçlü kemotaktik ajanlardan biri olan LTB4'ün (Lökotrien B 4) plazma konsantrasyon seviyeleri azalmış, hayvanların mekanik ve termal uyarılara tepki süreleri artmış ve hiperaljezi doza bağlı şekilde hafiflemiştir (281). Bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde eskuletin'in anti-inflamatuvar ve anti-nosiseptif özelliklere sahip olduğu anlaşılmaktadır (64).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan sıçanların barındırılması, refahı ve beslenmesi Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından yapıldı. Çalışmalarda 2-3 aylık (180-220 gr ağırlığında) 97 adet erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar herhangi bir kısıtlama olmadan standart pelet yem ve çeşme suyuyla beslendi. Sıçanlar pleksiglas kafeslerde barındırıldı ve kafeslerin yer aldığı bakım odaları 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü ile ışıklandırıldı ve oda sıcaklığı ise 20–25 °C arasına ayarlandı. Çalışma için gerekli olan etik izin Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (karar no: 2021/38, değiş.: 28.03.2022/13).

3.1 Deneyde kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışları

3.1.1 Yapay Beyin Omurilik Sıvısı (yBOS)

Yapay beyin omurilik solüsyonu hazırlamak için 0,294 gr kalsiyum klorür , 0,16 gr potasyum klorür, 6,95 gr sodyum klorür, 0,101 gr magnezyum klorür, 1,98 gr glikoz, 0,138 gr monosodyum fosfat, 2,52 gr sodyum bikarbonat son hacim 1 litre olacak şekilde distile su eklenerek ve manyetik karıştırıcı (May, WBC 3044-PR) kullanılarak çözüldü. Daha sonra çözeltinin pH'sı hidroklorik asit (%37) eklenerek 7.4'e ayarlandı. Sonuçta yBOS' un bileşimi şu şekildeydi: NaCl (115 mmol/L), KCl (3 mmol/L), CaCl₂ (2 mmol/L), MgCl₂ (1 mmol/L), NaH₂PO₄ (1 mmol/L), NaHCO₃ (25 mmol/L) ve glikoz (11 mmol/L). Hazırlanan yBOS 30 dakika karbojenlendirildi (%95 O₂; %5 CO₂). ve ex-vivo deneylerde kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

3.1.2 Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS) Hazırlanışı

Her tablet formundaki PBS (Sigma-Aldrich® Schnelldorf, Almanya) için 200 ml kadar distile su ilave edildi, manyetik karıştırıcı kullanılarak çözdürüldü ve PBS solüsyonu elde edildi.

3.1.3 PAF (Paraformaldehit) Hazırlanışı

Son hacmi 1 litre olacak şekilde 40 gr paraformaldehite (SigmaAldrich® Schnelldorf, Almanya) PBS solüsyonu eklendi. Manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırma ve kaynatma işlemi yapıldı ve berrak olarak %4'lük PAF solüsyonu elde edildi.

3.2 Deneylerde kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri

Tablo 3.1 Deneylerde kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri

Kullanılan cihazlar ve Laboratuvar malzemeleri	Firmalar ve modelleri
Homojenizatör	ISOLAB, Ultra-Turrax
Elektronik hassas terazi	Radwag , AS 220 R.2
Etüv	Nüve, EC160
Santrifüj	Nüve, NF 400R
Vorteks	Velp scientifica
Manyetik karıştırıcı	May, WBC 3044-PR
ELISA okuyucu	Biotek, Epoch
pH Metre	Hanna instruments, HI 2212
Mikroskop Kamerası	Nikon, DS-Fi1
Mikroskop	Nikon, Eclipse 80i
Von frey filamentı	North Coast Medical

3.3 Deneylerde kullanılan kimyasallar

Tablo 3.2 Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler	Firmalar
PBS (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi)	Sigma-Aldrich® (Schnelldorf, Almanya)
Rat CGRP ELISA Kit	Elabscience (Texas, ABD)
Rat c-Fos ELISA Kit	Sunredbio, Şanghay, Çin
Paraformaldehit(PAF)	Sigma-Aldrich® (Schnelldorf, Almanya)
Nitrogliserin	Adeka Farma, Türkiye
Sumatriptan	TGİ (Tokyo, Japonya)
Toluidine blue	Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Fransa
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	Sigma-Aldrich® (Schnelldorf, Almanya)
Eskuletin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, ABD

3.4 İn vivo Deney grupları ve Deneysel Uygulamalar:

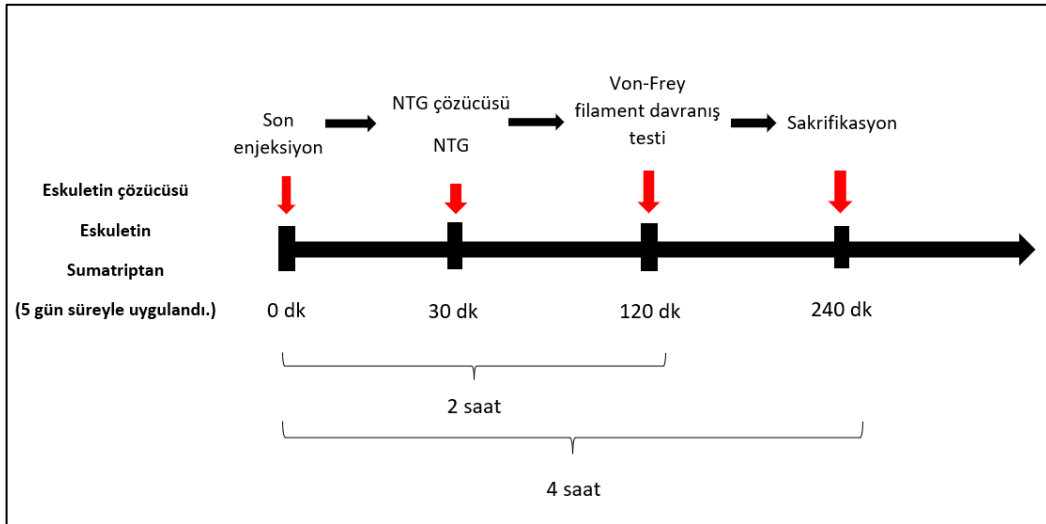
Nitrogliserin (NTG)' in sıçan ve farelere sistemik enjeksiyonu ile oluşturulan migren modeli, migrenin insan modeline en yakın olanıdır ve migren ilacı olan sumatriptan tedavisine de cevap vermektedir (282). Bu sebeple çalışmaların in-vivo bölümünde migren modeli 10 mg/kg NTG'nin sıçanlara intraperitoneal enjeksiyonu ile oluşturuldu (10, 283–285). Migren modellerinde etkinliği araştırılan eskuletin'in farklı dozlarının aralığı daha önce yapılan farklı çalışmalardan yararlanılarak belirlendi (59, 63, 64, 279).

3.4.1 İn-vivo DeneY Grupları:

İN-vivo deneylerde, gruplardaki sıçanlara enjeksiyonlar intraperitoneal yolla gerçekleştirildi.

Tablo 3.3 İn vivo deney grupları ve enjeksiyonlar

GRUPLAR	ENJEKSİYONLAR	n
1.Çözücü(Es)+Çözücü(NTG)	Eskuletin çözücüsü + NTG çözücüsü	7
2. Çözücü (Es)+NTG	Eskuletin çözücüsü + 10 mg/kg i.p. NTG	7
3. Es-1+NTG	5 mg/kg i.p. Eskuletin + 10 mg/kg i.p. NTG	7
4. Es-2+NTG	10 mg/kg i.p. Eskuletin + 10 mg/kg i.p. NTG	7
5. Es-3+NTG	20 mg/kg i.p. Eskuletin + 10 mg/kg i.p. NTG	7
6. Sumatriptan+NTG	600 µg/kg i.p. Sumatriptan + 10 mg/kg i.p. NTG	7
7. Es (etkin)+Çözücü (NTG)	Eskuletinin etkili dozu+ NTG çözücüsü	7



Şekil 3.1 İn-vivo deneysel prosedür

3.4.1.1 Grup-1: Kontrol Grubu (Veh(Es)+Veh(Ntg))

Kontrol grubundaki sıçanlara 5 gün boyunca günde bir kez eskuletin'in çözücüsü (serum fizyolojikte [SF] çözülmüş DMSO) enjekte edildi, 5. gün son enjeksiyondan 30 dakika sonra NTG'nin çözücüsü (% 6 propilen glikol, % 6 alkol, 0.9% SF) enjekte edildi (Şekil 3.2A), NTG çözücüsünün enjeksiyonundan 2 saat sonra Von Frey filamentleri ile ağrı eşiği değerlendirildi, NTG çözücüsünün enjeksiyonundan 4 saat sonra deney sonlandırıldı (Şekil 3.1).

3.4.1.2 Grup-2: Model Grubu(Veh(Es)+Ntg)

Bu model grubundaki sıçanlara 5 gün boyunca günde bir kez eskuletin'in çözücüsü (serum fizyolojikte [SF] çözülmüş DMSO) enjekte edildi, 5. gün son enjeksiyondan 30 dakika sonra NTG enjekte edildi. NTG enjeksiyonundan 2 saat sonra Von Frey filamentleri ile ağrı eşiği değerlendirildi, NTG enjeksiyonundan 4 saat sonra deney sonlandırıldı (Şekil 3.1).

3.4.1.3 Grup-3: Es-1+Ntg Grubu

Bu gruptaki sıçanlara 5 gün boyunca günde bir kez 5 mg/kg dozda eskuletin enjekte edildi, 5. gün son enjeksiyonu takiben 30 dakika sonra NTG enjekte edildi. NTG enjeksiyonunda 2 saat sonra Von Frey filamentleri ile ağrı eşiği değerlendirildi, NTG enjeksiyonundan 4 saat sonra deney sonlandırıldı (Şekil 3.1).

3.4.1.4 Grup-4: Es-2+NTG grubu

Bu gruptaki sıçanlara 5 gün boyunca günde bir kez 10 mg/kg dozda eskuletin enjekte edildi, 5. gün son enjeksiyonu takiben 30 dakika sonra NTG enjekte edildi. NTG enjeksiyonunda 2 saat sonra Von Frey filamentleri ile ağrı eşiği değerlendirildi, NTG enjeksiyonundan 4 saat sonra deney sonlandırıldı (Şekil 3.1).

3.4.1.5 Grup-5: Es-3+NTG grubu

Bu gruptaki sıçanlara 5 gün boyunca günde bir kez 20 mg/kg dozda eskuletin enjekte edildi, 5. gün son enjeksiyonu takiben 30 dakika sonra NTG enjekte edildi. NTG enjeksiyonundan 2 saat sonra Von Frey filamentleri ile ağrı eşiği değerlendirildi, NTG enjeksiyonundan 4 saat sonra deney sonlandırıldı (Şekil 3.1).

3.4.1.6 Grup-6: Sum+Ntg Grubu

Bu gruptaki sıçanlara 5 gün boyunca günde bir kez 600 µg/kg dozda migren ilacı olan Sumatriptan enjekte edildi, 5. gün son enjeksiyondan 30 dakika sonra NTG enjekte edildi. NTG enjeksiyonundan 2 saat sonra Von Frey filamentleri ile ağrı eşiği değerlendirildi, NTG enjeksiyonundan 4 saat sonra deney sonlandırıldı (Şekil 3.1).

3.4.1.7 Grup-7:Es(etkin)+Veh(Ntg) Grubu

Bu gruptaki sıçanlara (önceki deneylerde Von Frey testi sonucunda eskuletin'in etkin dozu 20 mg/kg olarak tespit edildiği için) 5 gün süreyle günde bir kez 20 mg/kg dozda eskuletin enjekte edildi, 5. gün son enjeksiyondan 30 dakika sonra NTG çözücüsü enjekte edildi. NTG çözücüsü enjeksiyonundan 2 saat sonra Von Frey filamentleri ile ağrı eşiği değerlendirildi, NTG çözücüsünün enjeksiyonundan 4 saat sonra deney sonlandırıldı (Şekil 3.1).

3.4.2 İn-vivo gruplara Von-Frey filament davranış testinin uygulanması (mekanik allodini/hiperaljezi)

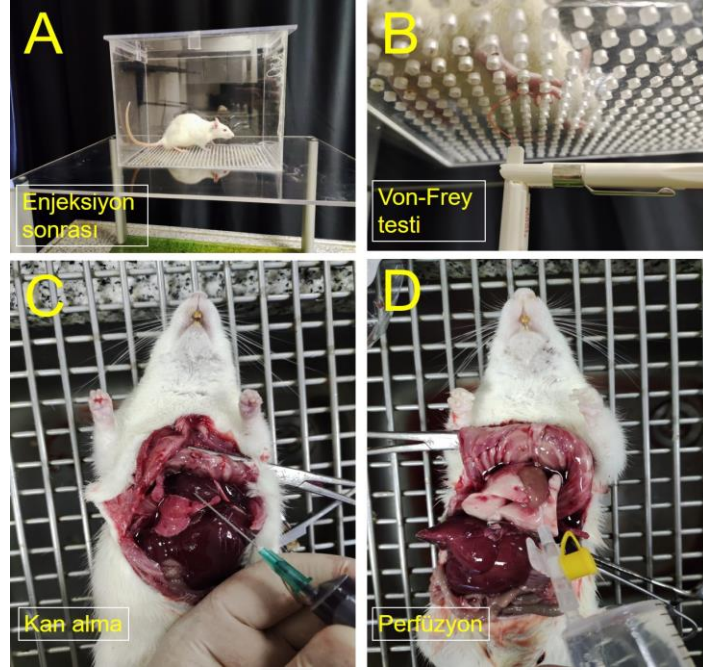
Von-Frey testi deneysel migren (284, 286–288) veya farklı ağrı modellerinde mekanik uyarıya cevap olarak ağrı eşiğini değerlendirmek için kullanılan en temel testtir. Manuel von-Frey testinde değişik güçlerde (0.008-300 gr) von-Frey filamentleri sıçanların pençesine uygulanmak suretiyle mekanik sensivite belirlenmektedir. Daha önce tarif edildiği gibi NTG enjeksiyonundan 2 saat sonra von-Frey filamentleri sıçanların arka pençesine uygulanarak her bir sıçanın ağrı eşikleri gram cinsinden ölçüldü (Şekil 3.2B) (284). Prosedür “up and down” yöntemine göre gerçekleştirildi. Buna göre sıçanların arka pençesinin orta plantar bölgesine ilk önce 2 gr gücündeki filament uygulandı. İlgili filament ile uyarının hemen ardından pençenin kaldırılması veya titremesi durumunda yanıt alındı olarak kabul edildi. Sıçan pençesini geri çekene veya filament “C- harfi” şeklinde bükülene kadar her bir filament sıçanın arka patisine arka arkaya 3 kez uygulandı. Geri çekme eşiği, aynı filament ile 3 ardışık test sırasında en az 2 geri çekilme reaksiyonuna neden olan daha hafif filament olarak kabul edildi.

3.4.3 Kan alınması

Deneylerin sonunda, ketamin anestezisi (90 mg/kg, i.p.) yapılarak, 5 ml'lik enjektör kullanılarak sağ ventrikülden yaklaşık 4 ml kan alınarak EDTA'lı tüplere aktarıldı (Şekil 3.2C). Devamında kan örnekleri 4000 rpm' de ve 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi daha sonra, plazma örnekleri -20 °C'de saklandı.

3.4.4 Perfüzyon işlemi

İn-vivo gruplardaki sıçanlara koroner perfüzyon işlemi uygulandı. Kan alımından hemen sonra beyin dokularındaki kanı uzaklaştırmak için kardiyak sol ventriküle bir kanül yerleştirildi ve 200 ml PBS (pH:7,4) infüzyonu ile perfüzyon gerçekleştirildi. (Şekil 3.2D)



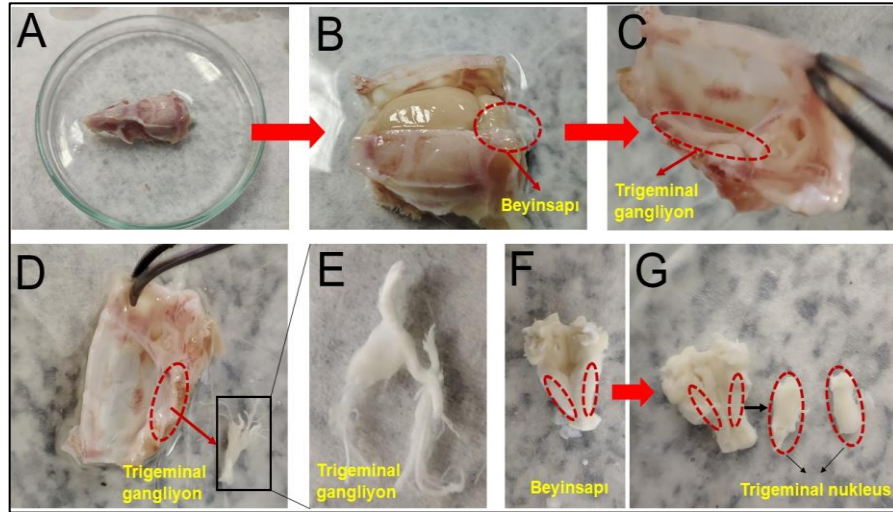
Şekil 3.2 İn-vivo deneyler sırasında gerçekleştirilen von-Frey testi, kan alma ve perfüzyon işlemleri.

3.4.5 Dura mater, beyin sapı ve trigeminal gangliyonun çıkarılması

Perfüzyon işleminden hemen sonra kafa makas ve pens yardımıyla açıldı. Dura materini hasarlamadan beyin hemisferleri çıkarıldı ve devamında beyin sapı (trigeminal nukleus kaudalis) ve trigeminal gangliyon çıkarılıp ıslak ağırlıkları tartıldı ve ependorf tüplere alınarak dokular homojenize edilene kadar -20 °C de saklandı. (Şekil 3.3) Ayrıca kranyal dura materin yapışık olduğu kranyum % 4'lük PAF solüsyonuna alındı ve dural mast hücrelerinin fikse edilmesi sağlandı.

3.4.6 Beyin sapı ve trigeminal gangliyon dokularının homojenizasyonu

Trigeminal gangliyon ve beyin sapı nukleus trigeminalis dokularında CGRP ve c-fos ölçümleri yapmak için öncelikle dokular homojenize edildi. Kısaca, dokular içinde PBS (pH: 7.4) solüsyonu olan homojenizasyon kaplarına alınarak üzerine 20 IU/ml aprotinin eklendi. Hızlı bir şekilde homojenizasyon kapları içinde buz olan bir behere yerleştirildi. Hafif yük Ultra-Turrax homojenizatör (ISOLAB) yardımıyla 100 mg ıslak doku/1 ml olacak şekilde homojenize edildi. Homojenatlar 4000 rpm'de 4°C'de 30 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. Elde edilen süpernatant örneklerde, c-Fos ve CGRP konsantrasyonları aşağıda tarif edildiği gibi ELISA ile ölçüldü.



Şekil 3.3 İn-vivo deneyler sonunda kranyum, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nukleus trigeminalis dokularını çıkarma işlemleri.

3.4.7 Dural mast hücrelerinin görüntülenmesi

PAF fiksatifinden çıkarılan dural örnekler PBS ile yıkandıktan sonra polilizinli lam üzerine yayıldı ve oda sıcaklığında açık havada kuruması sağlandı. Daha sonra preparta üzerine dokuyu kaplayacak şekilde Toluidin-Blue (%0.1, pH: 2.5) ile boyası damlatıldı ve alkol serilerinden geçirilerek doku içindeki su uzaklaştırıldı. Devamında entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı. (Şekil 3.4) Her bir dura materdeki mast hücreleri, ışık mikroskobu kullanılarak mikroskop altında 40' lık objektifte middle meningeal arter boyunca arterin bifurkasyon yaptığı 5 sol taraf ve 5 de sağ tarafta toplam 10 alanda sayıldı. Sağlam ve degranüle sınıflaması yapmak için daha önce tarif edilen şu kriter kullanıldı: eğer hücrenin çevresinde 15'ten fazla granül dağılması var ise veya granülleri boşaldığı için boyamayı kaybedip hücre hayalet görüntüsü kazanmışsa bu durum degranüle olarak kabul edildi devamında gruplara ait temsili resimler mikroskoba bağlı kamera ile çekildi (289).



Şekil 3.4 İn-vivo deneylerde kranyal dura materin çıkarılması ve mast hücrelerini görüntülemek için toluidin-blue ile boyanması.

3.5 Ex-vivo Deneysel Grupları ve Deneysel Uygulamalar:

Ex-vivo hemiskull, trigeminal gangliyon ve beyin sapı preparatlarının çalışıldığı deneylerde deneysel prosedür birbirini takip eden üç aşamada gerçekleştirildi (10, 285, 290, 291).

3.5.1 Hemiskull preparatları

Bu preparat kranyal dura mater innerve eden periferik trigeminal afferentlerden salınan CGRP' yi ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (10, 285, 290). Bir hayvandan iki dura mater (hemiskull) preparatı hazırlandı. Her grup 3 aşamada çalışıldı. Bütün gruplar için söz konusu 3 aşama da aynıydı. Ancak her aşamada çalışılan farmakolojik maddenin ve dozlarının farklı olması nedeniyle 3 aşama ilk grupta detaylı bir şekilde anlatıldı diğer gruplar için ilgili aşamadaki farmakolojik madde ve dozları vurgulandı.

3.5.1.1 Grup-1 (n=8 (4 sıçan)):

Petri kaplarına sabitlenen preparatlara deneylerin ilk aşamasında kontrol amacıyla 350 µl vehikül (%0,1 DMSO yapay beyin omurilik sıvısı içinde çözünmüş) uygulandı ve inkübatörde 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi, devamında inkübasyon sıvısı alınarak -20 °C de saklandı, ikinci aşamasında aynı preparata 100 µM NTG (10, 285) uygulandı 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi devamında inkübasyon sıvısı alınarak -20 °C de saklandı, üçüncü aşamasında 100 µM eskuletin uygulandı 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi devamında inkübasyon sıvısı alınarak -20 °C de saklandı.

3.5.1.2 Grup-2 (n=8 (4 sıçan)):

Grup-2 preparatlarına deneylerin birinci aşamasında kontrol amacıyla 350 µl vehikül (%0,1 DMSO), ikinci aşamasında tek başına 100 µM NTG ve üçüncü aşamasında 100 µM NTG+100 µM eskuletin beraber uygulandı. Grup-1'dekine benzer şekilde inkübasyon sıvı örnekleri alındı ve -20 °C de saklandı.

3.5.1.3 Grup-3 (n=8 (4 sıçan)):

Grup-3 preparatlarına deneylerin birinci aşamasında kontrol amacıyla amacıyla 350 µl vehikül (%0,1 DMSO), ikinci aşamasında tek başına 100 µM NTG ve üçüncü aşamasında 100 µM NTG+30 µM Sumatriptan beraber uygulandı. Grup-1 ve 2'dekine benzer şekilde inkübasyon sıvı örnekleri alındı ve -20 °C de saklandı.

3.5.2 İzole trigeminal gangliyon preparatları

Dural preparatların hazırlanmasına benzer şekilde bir hayvandan iki trigeminal gangliyon preparatı hazırlandı (10, 285, 292). Dural preparatlarda olduğu gibi her grup üç aşamada çalışıldı.

3.5.2.1 Grup-1 (n=8 (4 sıçan))

Trigeminal gangliyon dokuları ependorf tüplere konuldu ve deneylerin ilk aşamasında kontrol amacıyla 350 µl vehikül (%0,1 DMSO) uygulandı ve inkübatörde 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi, devamında inkübasyon sıvısı alınarak -20 °C de saklandı, ikinci aşamasında 100 µM NTG uygulandı 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi devamında inkübasyon sıvısı alınarak -20 °C de saklandı, üçüncü aşamasında 100 µM eskuletin uygulandı 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi devamında inkübasyon sıvısı alınarak -20 °C de saklandı.

3.5.2.2 Grup-2 (n=8 (4 sıçan))

Grup-2 preparatlarına deneylerin birinci aşamasında kontrol amacıyla 350 µl vehikül (%0,1 DMSO), ikinci aşamasında tek başına 100 µM NTG ve üçüncü aşamasında ise 100 µM NTG+100 µM eskuletin beraber uygulandı. Grup-1'dekine benzer şekilde inkübasyon sıvı örnekleri alındı ve -20 °C de saklandı.

3.5.2.3 Grup-3(n=8 (4 sıçan))

Grup-3 preparatlarına deneylerin birinci aşamasında kontrol amacıyla 350 µl vehikül (%0,1 DMSO), ikinci aşamasında tek başına 100 µM NTG ve üçüncü aşamasında ise 100 µM NTG+30 µM Sumatriptan beraber uygulandı. Grup-1 ve 2'dekine benzer şekilde inkübasyon sıvı örnekleri alındı ve -20 °C de saklandı.

3.5.3 İzole beyin sapı preparatları

Bu preparatlar beyin sapının nukleus trigeminalis bölümünü içermektedir. Beyin sapının nukleus trigeminalis bölümü de bilateral olarak bulunmasına rağmen oldukça küçük olduğundan iki yapı bir preparat olarak hazırlandı bu sebeple bir hayvandan bir adet çalışma preparatı hazırlandı (292, 293). Diğer ex-vivo preparatlarda olduğu gibi her grup 3 aşamada çalışıldı.

3.5.3.1 Grup-1 (n=4)

Beyin sapı nukleus trigeminalis dokuları ependorf tüplere konuldu ve deneylerin birinci aşamasında kontrol amacıyla 350 µl vehikül (%0,1 DMSO) uygulandı ve inkübatörde 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi, devamında inkübasyon sıvısı alınarak -20 °C de saklandı,

ikinci aşamasında 100 µM NTG uygulandı 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi devamında inkübasyon sıvısı alınarak -20 °C de saklandı, üçüncü aşamasında 100 µM eskuletin uygulandı 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi devamında inkübasyon sıvısı alınarak -20 °C de saklandı.

3.5.3.2 Grup-2 (n=4)

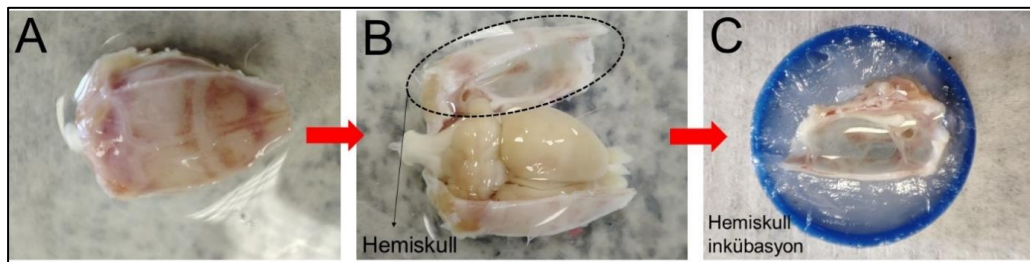
Grup-2 preparatlarına deneylerin birinci aşamasında kontrol amacıyla 350 µl vehikül (%0,1 DMSO), ikinci aşamasında tek başına 100 µM NTG ve üçüncü aşamasında ise 100 µM NTG+100 µM eskuletin beraber uygulandı. Grup-1'dekine benzer şekilde inkübasyon sıvı örnekleri alındı ve -20 °C de saklandı.

3.5.3.3 Grup-3 (n=4)

Grup-3 preparatlarına deneylerin birinci aşamasında kontrol amacıyla 350 µl vehikül (%0,1 DMSO), ikinci aşamasında tek başına 100 µM NTG ve üçüncü aşamasında ise 100 µM NTG+30 µM Sumatriptan beraber uygulandı. Grup-1 ve 2'dekine benzer şekilde inkübasyon sıvı örnekleri alındı ve -20 °C de saklandı.

3.5.4 Ex-vivo hemiskull preparatlarının hazırlanması

Servikal dislokasyon ile sakrifiye edilen hayvanların kafa derisi ve kasları temizlenerek yBOS içerisine alındı. Sonra kafa sagittal düzlem boyunca ikiye yarıya ayrıldı, beyin hemisferleri uzaklaştırıldı, sonuçta bir sıçan kafasından dura materin intakt olduğu iki hemiskull preparatı hazırlandı. Preparatlar hemen yBOS ile 30 dakika perfüze edildi ve devamında içinde vazelin bulunan petri kaplarına sabitlenerek çalışmaya hazır duruma getirildi. Deneyler sırasında hemiskull preparatı hazırlanma aşamaları Şekil 3.5'de gösterilmektedir.

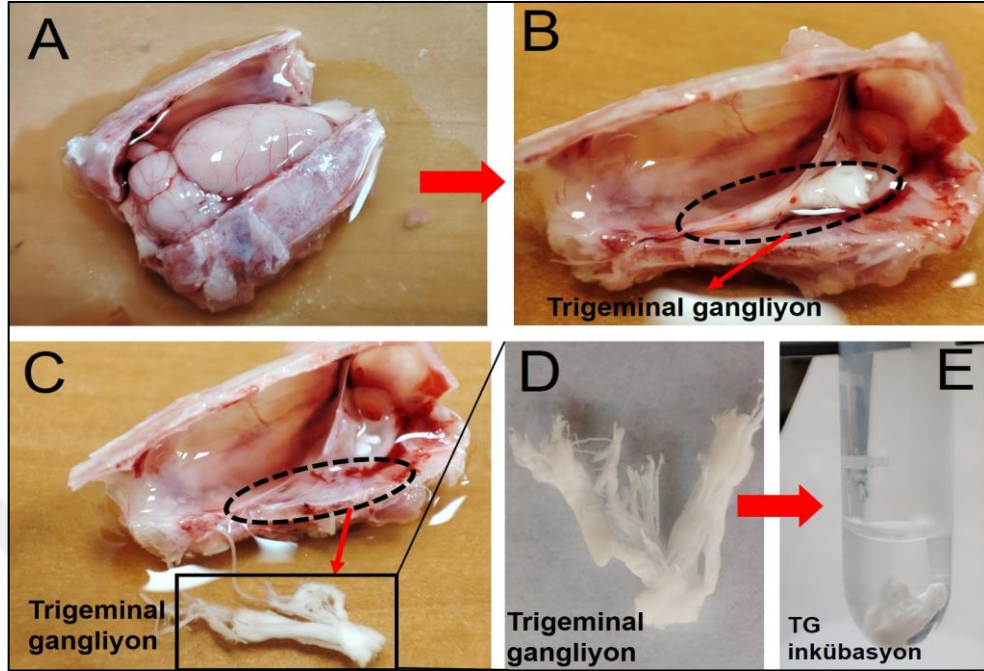


Şekil 3.5 Ex-vivo hemiskull preparatı hazırlanma aşamaları

3.5.5 Trigeminal Gangliyon Preparatı Hazırlanışı

Hemiskull preparatının hazırlanmasında anlatıldığı gibi kafa kaslardan temizlendikten sonra, beyin hemisferleri uzaklaştırılan hemi-kafatasının tabanında yerleşik trigeminal gangliyon mandibular dalının ayrıldığı noktaya 1 mm proksimal ve distal mesafeden

kesilerek alındı. yBOS ile 30 dakika perfüze edildi. Deneyler sırasında trigeminal gangliyon preparatı hazırlanma aşamaları Şekil 3.6'da gösterilmektedir.

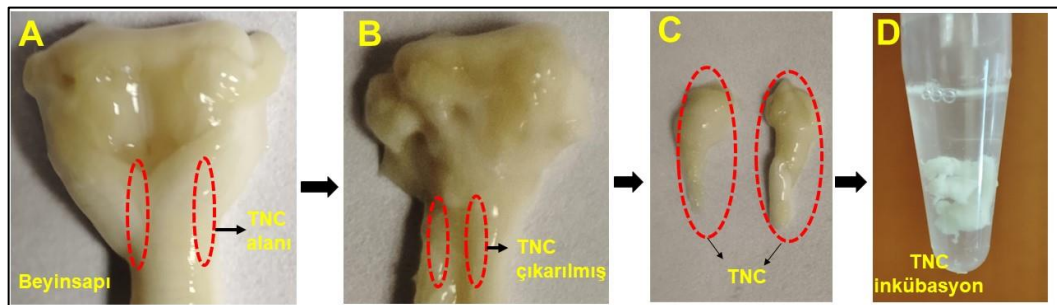


Şekil 3.6 Ex-vivo trigeminal gangliyon preparatı hazırlanma aşamaları

(TG: trigeminal gangliyon)

3.5.6 Beyin sapı Preparatı Hazırlanışı

Hemiskul preparatının hazırlanmasında anlatıldığı gibi kafa kaslardan temizlendikten sonra stereotaktik koordinatlara göre bregma'nın lateraline 4 mm uzaklıkta olacak şekilde posteriorndan bregmaya doğru -9 mm'den -15 mm'ye kadar ilerlendi ve bununla birlikte dokunun ventraline doğru 2-3 mm derinliğe inilerek nukleus trigeminalis alanı çıkarıldı. Doku yBOS içerisine alınarak 30 dakika perfüze edildi. Deneyler sırasında beyinsapı preparatı hazırlanma aşamaları Şekil 3.7'de gösterilmektedir.



Şekil 3.7 Ex-vivo beyin sapı nukleus trigeminalis preparatı hazırlanması.

(TNC, trigeminal nukleus kaudalis)

3.6 Plazma, Beyin sapı trigeminali nukleus, Trigeminal Gangliyon ve Ex-Vivo deneylerden elde edilen süperfüzet örneklerinde CGRP ve Beyin sapı trigeminalis nukleus c-fos Düzeylerinin Ölçümü

In-vivo gruplardan elde edilen plazma, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nukleus trigeminalis homojenatları ve ex-vivo preparatlardan elde edilen süpernatant örneklerinde CGRP konsantrasyonları ve beyin sapı trigeminali nukleus kaudalis homojenatlarında c-fos konsantrasyonları ELISA yöntemi ile ölçüldü (10, 285, 293). Prosedür olarak kiti üreten firmanın yönergeleri takip edildi. Buna göre 96 kuyucuklu plakanın standart kuyucuklarına 100 µL CGRP standart örneği (c-fos için 40 µL c-fos standart) örnek kuyucuklarına ise 100 µL örnek (c-fos için 40 µL) konuldu. Devamında, ELISA plakası 37 °C'de 90 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 100 uL *biyotinlenmiş-detection-Ab* kimyasalı kondu devamında ELISA plakası 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra plaka kuyucuklarına 100 µL HRP konjugat isimli kimyasal ilave edildi ve ELISA plaka 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra plaka kuyucuklarına 90 µL substrat kimyasalı ilave edildi ve ELISA plaka 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonda sonra kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu isimli kimyasal ilave edildi. Renk değişimi gözlenir gözlenmez ELISA okuyucuda (Epoch BioTek Instruments, Inc. Highland Park, Winooski, VT, ABD) 450 nm'de örneklerin absorbansı ölçüldü. Optik yoğunluk eğrisi kullanılarak CGRP ve c-fos konsantrasyonları hesaplandı.

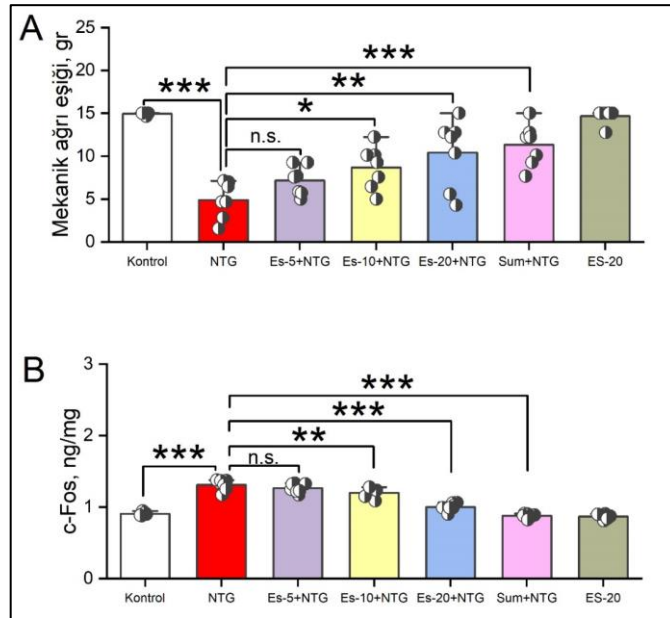
3.7 Verilerin Değerlendirilmesi

Veriler, ortalama±ortalamanın standart hatası (SEM) olarak sunuldu. Verilerin normallik analizi Shapiro–Wilk testi kullanılarak gerçekleştirildi. İn-vivo gruplardan elde edilen veriler One-Way ANOVA testi ve devamında post-hoc Tukey testi ile analiz edildikiren; ex-vivo gruplardan elde edilen veriler one-way ANOVA ve devamında Bonferroni post-hoc testi ile analiz edildi. İstatistik analizlerin gerçekleştirilmesinde SPSS 22.0 yazılımı kullanıldı. $P \leq 0,05$ olduğu istatistik sonuçları anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Eskuletin'in in-vivo gruplarda NTG' nin yol açtığı mekanik hiperaljezi ve beyin sapı c-fos ekspresyonu üzerine etkileri

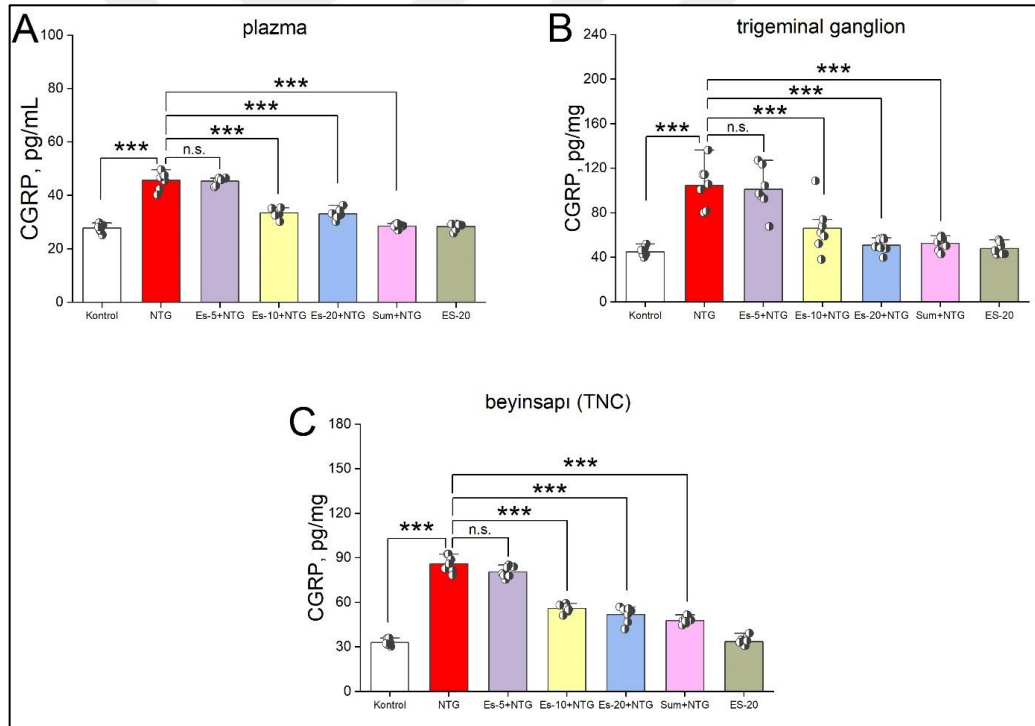
NTG uygulaması model grupta kontrol grubuna göre mekanik ağrı eşikini azaltarak mekanik allodiniye (hiperaljezi) ve ayrıca beyin sapı trigeminal nukleus kaudalis yapısında c-fos düzeylerinde anlamlı artışlara neden oldu ($p<0.001$, Şekil 4.1A ve B). Ayrıca eskuletin'in 10 mg/kg ve 20 mg/kg dozları NTG'nin yol açtığı mekanik hiperaljeziyi ($p<0.05$; $p<0.01$) ve beyin sapı c-fos düzeylerindeki artışı ($p<0.01$; $p<0.001$) model gruba göre anlamlı olarak azalttı. Ancak eskuletinin 5 mg/kg dozu NTG ile uyarılan bu parametreleri azaltmadı (Şekil 4.1A ve B). Bunlara ek olarak pozitif kontrol amacıyla uygulanan ve bir migren ilacı olan sumatriptan, NTG' nin yol açtığı mekanik hiperaljezi ve c-fos düzeylerindeki değişiklikleri önledi ($p<0.001$, Şekil 4.1A ve B). Ayrıca von-frey davranış deneylerinde eskuletin'in en etkili dozunun 20 mg/kg olduğu tespit edildi ve bu dozun tek başına kontrol parametreleri üzerine bir etkisi olup olmadığı araştırıldı. Sonuçta tek başına eskuletin uygulamasının ilgili parametreleri kontrol gruba göre değiştirmeyeceği bulundu ($p>0.05$, Şekil 4.1A ve B). Gruplara ait ağrı eşikleri ve c-fos düzeyleri değerleri Tablo 4.1 'de sunulmaktadır.



Şekil 4.1 İn-vivo gruplarda eskuletin'in mekanik hiperaljezi ve c-fos düzeyleri üzerine etkileri

4.2 Eskuletin'in in-vivo gruplarda NTG ile uyarılan plazma, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nükleus trigeminalis'te CGRP seviyeleri üzerine etkileri

Model grupta NTG'nin uygulanması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazmada, trigeminal gangliyonda ve beyin sapı nükleus trigeminalis'te CGRP konsantrasyonlarında anlamlı düzeyde artışlara yol açtı ($p < 0.001$, Şekil 4.2A, B ve C). NTG ile uyarılan bu yapılardaki CGRP düzeyi artışları, eskuletin' in 10 ve 20 mg/kg dozları ile ayrı ayrı anlamlı olarak azaltılırken eskuletin' in 5 mg/kg dozu CGRP düzeylerini azaltmadı ($p < 0.001$, Şekil 4.2A, B ve C). Migren ilacı sumatriptan davranış deneylerinde olduğu gibi bu üç yapıdan NTG' nin yol açtığı CGRP düzeylerindeki artışları önemli derecede azalttı ($p < 0.001$, Şekil 4.2A, B ve C). Tek başına uygulanan 20 mg/kg dozda eskuletin CGRP düzeylerini kontrole göre değiştirmede ($p > 0.05$, Şekil 2A, B ve C). Gruplara ait plazma, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nükleus trigeminalis CGRP değerleri Tablo 4.1'de sunulmaktadır.



Şekil 4.2 İn-vivo gruplarda Eskuletin'in plazma, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nükleus trigeminalis'te CGRP düzeyleri üzerine etkileri

Tablo 4.1 İn-vivo gruplarda ağrı eşiği, c-fos, CGRP ve mast hücre parametrelerine ait değerler

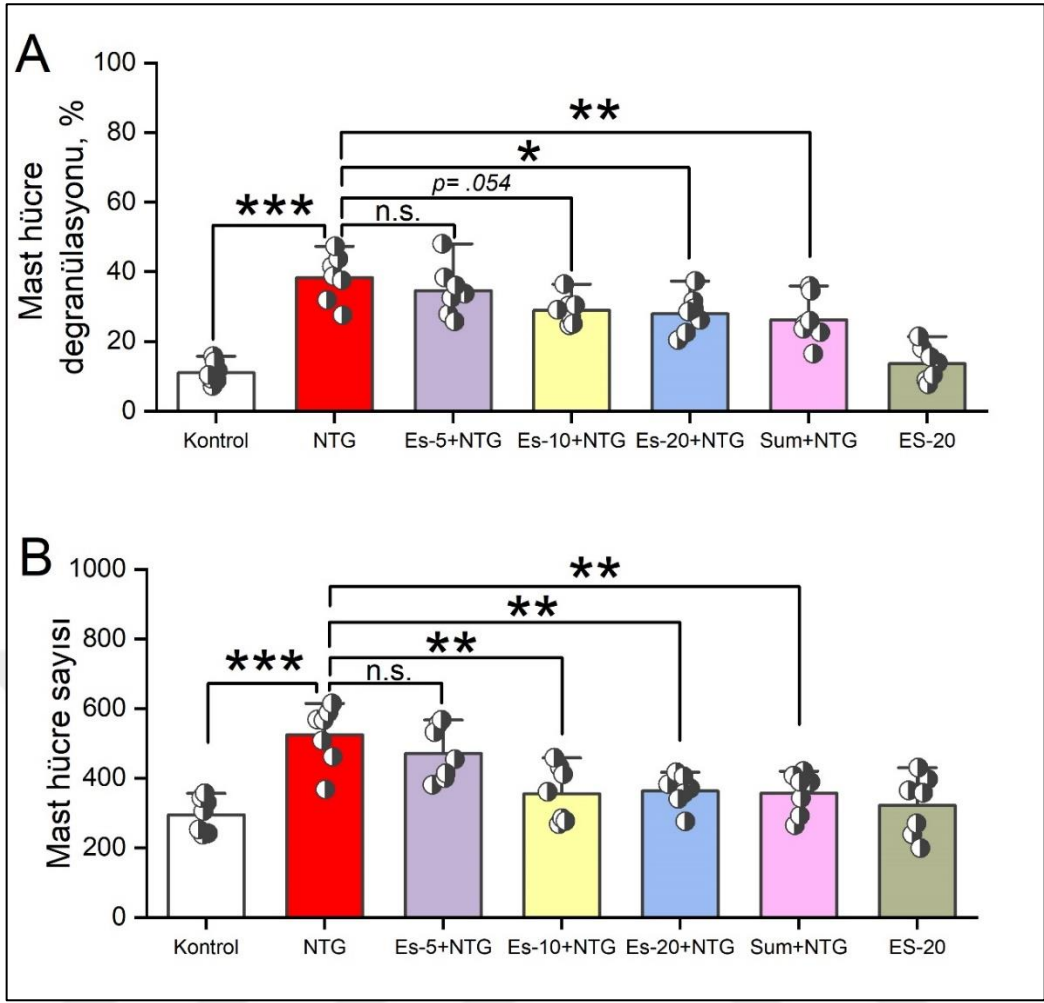
Parametreler	Gruplar							
	Kontrol	NTG	Es-5+NTG	Es-10+NTG	Es-20+NTG	Sum+NTG	ES-20	
Ağrı eşiği (gr)	14,9±0,05	4,9±0,81***	7,2±0,65	8,7±0,93*	10,4±1,51**	11,3±0,93***	14,6±0,32	
c-Fos (ng/mg)	0,9±0,01	1,3±0,03***	1,3±0,02	1,2±0,02**	1,0±0,02***	0,88±0,01***	0,87±0,01	
CGRP	Plazma (pg/mL)	27,8±0,6	45,7±1,2***	45,3±0,5	33,4±0,7***	33,2±0,7***	28,5±0,3***	28,4±0,5
	Trigeminal ganglion (pg/mg)	45,0±1,6	104,7±7,5***	101,2±7,6	65,9±8,4***	50,8±2,4***	52,4±2,3***	47,9±2,1
	Beyinsapı nukleus trigeminalis (pg/mg)	32,9±0,8	86,0±2,1***	80,5±1,4	55,9±1,1***	51,8±2,1***	47,7±0,8***	33,5±1,1
Mast hücre	Degranülasyon (%)	11,0±1,2	38,3±2,6***	34,6±2,8	28,9±1,5	27,9±2,1*	26,3±2,6**	13,7±1,9
	Sayı	295,6±19	524,8±33***	472,0±30	355,9±30**	364,1±18**	357,8±22,6**	322,6±33

Değerler ortalama±ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir. * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; + NTG grubu ile karşılaştırıldığında; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001. NTG: nitrogliserin, ES: Eskuletin, Sum: sumatriptan.

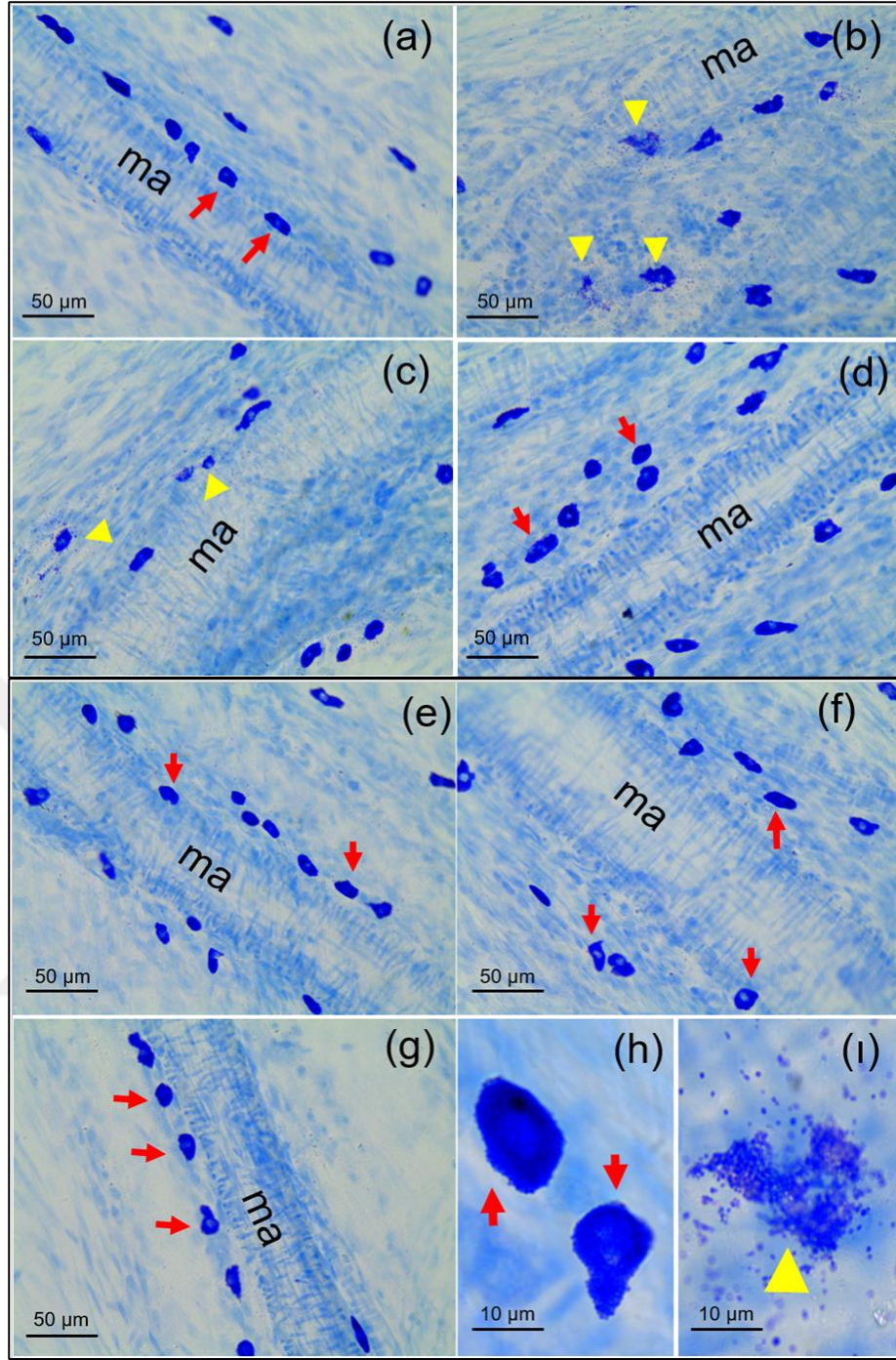
4.3 Eskuletin'in in-vivo gruplarda NTG ile uyarılan dural mast hücre degranülasyonu ve sayısı üzerine etkileri

Model grupta NTG uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mast hücrelerinin degranülasyonunu ve sayısını anlamlı olarak artırdı (p<0.001, Şekil 4.3A ve B). Buna karşılık uygulanan eskuletin dozlarından 10 ve 20 mg/kg dozlar NTG'nin yol açtığı mast hücre degranülasyonu (p<0.05) ve sayısındaki artışları anlamlı ölçüde azalttı (p<0.01) (Şekil 4.3A ve B). Ancak eskuletinin 5 mg/kg dozu etkili olmadı. Tedavi açısından pozitif kontrol olarak uygulanan migren ilacı sumatriptan NTG'nin yol açtığı mast hücre degranülasyonu ve sayısındaki artışları anlamlı derecede azalttı (p<0.01, Şekil 4.3A ve B).

Mast hücrelerinin bazal degranülasyonu ve sayısı üzerinde, tek başına uygulanan eskuletinin 20 mg/kg dozu herhangi bir değişikliğe yol açmadı (p>0.05, Şekil 4.3A ve B). Deney gruplarına ait dural mast hücre sayısı ve degranülasyonunun değerleri Tablo 4.1'de sunulmaktadır. Ayrıca gruplara ait temsili mast hücre görüntüleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir



Şekil 4.3 İn-vivo gruplarda Eskuletin'in dural mast hücreleri üzerine etkileri



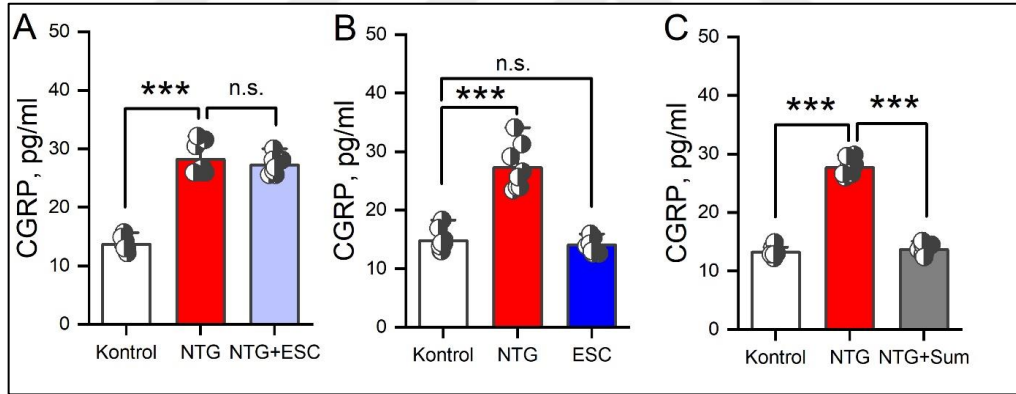
Şekil 4.4 İn-vivo gruplara ait temsili dural mast hücre görüntüleri

(a) kontrol, (b) NTG, (c) Es-5+NTG, (d) Es-10+NTG, (e) Es-20+NTG, (f) Sum+NTG, (g) Es-20 grupları (X40). (h) kontrol grubunda intakt (sağlam) mast hücresi (X100), (i) NTG grubunda degranüle mast hücresi (X100). Kırmızı düz oklar intakt (sağlam) mast hücrelerini, sarı ok uçları degranüle mast hücrelerini göstermektedir. (ma: middle meningeal arter) (Şekil 4.4)

4.4 Eskuletin'in ex-vivo hemiskull, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nükleus trigeminalis preparatlarından NTG ile indüklenmiş CGRP salımı üzerine etkileri

Hemiskull preparatları kullanılarak yapılan deneylerin ilk bölümünde, NTG uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CGRP salımını anlamlı derecede artırdı ($p<0.001$, Şekil 4.5A). İndüklenmiş CGRP salımı üzerine etkinliği araştırılan eskuletin'in NTG ile birlikte uygulanması NTG'nin yol açtığı CGRP salımını değiştirmede ($p>0.05$, Şekil 4.5A).

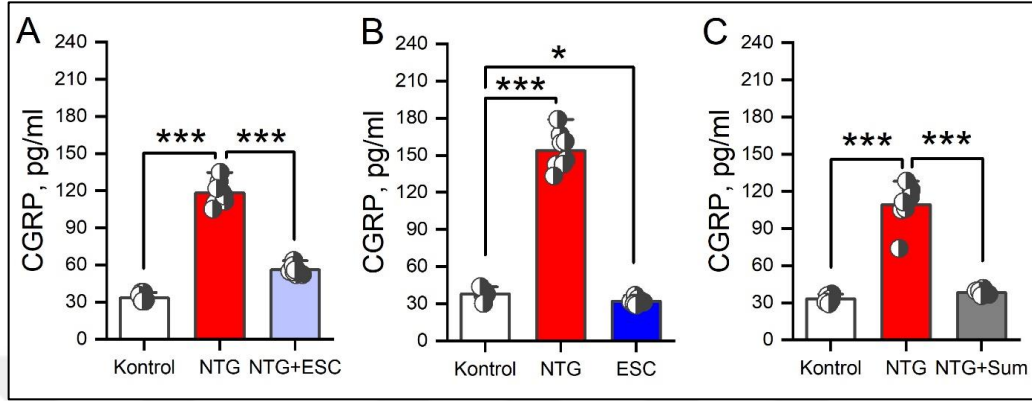
Bu deneylerin ikinci bölümünde, NTG uygulaması kontrole göre CGRP salımını anlamlı artırdı ($p<0.001$, Şekil 4.5B), NTG olmaksızın tek başına uygulanan eskuletin ise kontrol ile karşılaştırıldığında CGRP'nin bazal salımı üzerine etki etmedi ($p>0.05$, Şekil 4.5B). Deneylerinin üçüncü bölümünde, NTG uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığında CGRP salımını anlamlı artırdı ($p<0.001$, Şekil 4.5C) ve ayrıca pozitif kontrol olarak uygulanan migren ilacı sumatriptan NTG'nin yol açtığı CGRP salımındaki artışları anlamlı derecede azalttı ($p<0.001$, Şekil 4.5C).



Şekil 4.5 Ex-vivo hemiskull preparatlarında Eskuletin'in CGRP salımı üzerine etkileri.

Trigeminal gangliyon preparatları ile yapılan deneylerin birinci bölümünde, NTG uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığında CGRP salımını anlamlı artırdı ($p<0.001$, Şekil 4.6A) bununla birlikte NTG ile birlikte uygulanan eskuletin, NTG'nin yol açtığı CGRP salımındaki artışları anlamlı olarak azalttı ($p<0.001$, Şekil 4.6A). Trigeminal gangliyon preparatları ile yapılan deneylerin ikinci bölümünde, NTG uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığında CGRP salımını anlamlı derecede artırırken ($p<0.001$, Şekil 4.6B) ilginç bir şekilde tek başına eskuletin uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CGRP'nin bazal salımını anlamlı olarak azalttı. ($p<0.05$, Şekil 4.6B). Trigeminal gangliyon preparatları

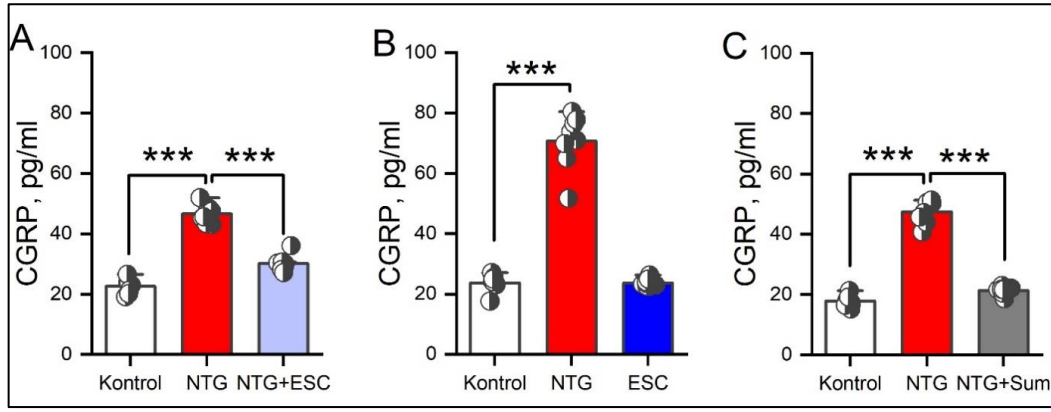
ile yapılan deneylerin üçüncü bölümünde, NTG uygulaması kontrole ile karşılaştırıldığında CGRP salımını anlamlı ölçüde artırdı. ($p<0.001$, Şekil 4.6C), ayrıca pozitif kontrol olarak uygulanan migren ilacı sumatriptan ise NTG'nin yol açtığı CGRP salımındaki artışları anlamlı olarak azalttı ($p<0.001$, Şekil 4.6C).



Şekil 4.6 Ex-vivo trigeminal ganglion preparatlarında Eskuletin'in CGRP salımı üzerine etkileri.

Beyin sapı nukleus trigeminalis preparatları ile gerçekleştirilen deneylerin birinci bölümünde, NTG uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığında CGRP salımını önemli derecede artırdı ($p<0.001$, Şekil 4.7A) buna karşılık NTG ile birlikte uygulanan eskuletin, NTG'nin yol açtığı CGRP salımındaki artışları anlamlı olarak azalttı ($p<0.001$, Şekil 4.7A).

Beyin sapı nukleus trigeminalis preparatları ile gerçekleştirilen deneylerin ikinci bölümünde, NTG uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığında CGRP salımını önemli derecede artırdı ($p<0.001$, Şekil 4.7B) ancak eskuletin'in NTG olmaksızın tek başına uygulanması kontrol ile karşılaştırıldığında CGRP'nin bazal salımını değiştirmede. ($p>0.05$, Şekil 4.7B). Beyin sapı nukleus trigeminalis preparatları ile gerçekleştirilen deneylerin üçüncü bölümünde, NTG uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığında CGRP salımını önemli derecede artırdı ($p<0.001$, Şekil 4.7C), pozitif kontrol olarak uygulanan migren ilacı sumatriptan ise NTG'nin yol açtığı CGRP salımındaki artışları anlamlı olarak azalttı ($p<0.001$, Şekil 4.7C). Ex-vivo hemiskull, trigeminal ganglion ve beyin sapı nukleus trigeminalis deneylerine ait CGRP değerleri gruplara göre Tablo 4.2'de sunulmaktadır.



Şekil 4.7 Ex-vivo beyin sapı nukleus trigeminalis preparatlarında Eskuletin'in CGRP salımı üzerine etkiler.

4.5 Ex-vivo gruplarda CGRP düzeylerine ait değerler

Tablo 4.2 Ex-vivo gruplarda CGRP düzeylerine ait değerler

(CGRP, pg/mL)		Gruplar				
		Kontrol	NTG	NTG+ES	ES	NTG+Sum
Hemiskull	1. deney seti	13,7±0,4	28,2±0,9	27,2±0,6		
	2. deney seti	14,8±0,7	27,2±1,4***		14,0±0,5	
	3. deney seti	13,2±0,3	27,7±0,5***			13,6±0,3***
Trigeminal gangliyon	1. deney seti	33,4±1,1	118,1±3,4***	56,1±1,4***		
	2. deney seti	37,9±1,4	153,8±5,4***		31,9±1,0*	
	3. deney seti	33,2±1,0	109,2±5,8***			38,3±0,7***
Beyinsapı nukleus trigeminalis	1. deney seti	22,6±0,8	46,6±1,1***	30,1±1,0***		
	2. deney seti	23,7±1,0	70,8±3,2***		23,7±0,5	
	3. deney seti	18,0±0,7	47,4±1,3***			21,3±0,5***

Değerler ortalama±ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir. * Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; + NTG grubu ile karşılaştırıldığında; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001. NTG: nitrogliserin, ES: Eskuletin, Sum: sumatriptan.

5. TARTIŞMA

Migren baş ağrısının patofizyolojisi her ne kadar karmaşık olsa da patofizyolojiyi açıklamaya yönelik ileri sürülen teorilerden nörojenik inflamasyon teorisi diğerlerine göre oldukça ön plana çıkmaktadır. Nörojenik inflamasyonun bileşenlerinden CGRP'nin düzeylerinin migren hastalarının plazmasında yüksek bulunması (294–297) ve ayrıca migrenin deneysel modellerinde trigeminovasküler sistemden salımının artması (10, 232, 282, 285, 298) migren patofizyolojisinde nörojenik inflamasyonun rolünü güçlendirmiştir. Deneysel kemirgen modellerinde, nörojenik inflamasyonun diğer bileşeni olan dural mast hücrelerinin aktivasyonunun migren baş ağrısından sorumlu tutulan trigeminal ağrı yolağını aktive ettiğinin ve trigeminal sinirin meninksleri innerve eden periferik afferentlerinde nosiseptif ateşlemeyi uzun süreli tetiklediğinin gösterilmesi nörojenik inflamasyon teorisini daha fazla güçlendirmiştir (50, 299). Meningeal trigeminal duysal sinir uçlarından salınan CGRP ile bu sinir uçlarına yakın bir şekilde yerleşmiş olan meningeal (dural) mast hücrelerinin karşılıklı etkileşimi meninkslerde meydana gelen steril nörojenik inflamasyonun bir kısır döngü halini almasında önemli bir rol oynamaktadır. Buna göre, trigeminovasküler sistemin aktivasyonu sonucu akson refleksi ile trigeminal meningeal sinir terminallerinden salınan CGRP meningeal mast hücrelerini degranüle/aktive etmektedir. Aktive olan mast hücrelerinden degranülasyon yoluyla granüllerinde bulunan histamin, serotonin, ATP, CGRP, SP, bradikinin, IL-1beta, TNF- α , proteazlar, nitrik oksit, lökotrienler ve prostaglandinler gibi pro-inflamatuvar, vazoaaktif ve pro-nosiseptif özellikteki aracı moleküller salınır. Bu moleküller trigeminal meningeal sinir uçlarını daha fazla sensitize ve aktive ederek nörojenik inflamasyonun güçlenmesine ve nosiseptif ateşlemenin ve iletimin artmasına yol açarlar.

İlginç bir şekilde trigeminovasküler sistem aktivasyonu sonucu sinir uçlarından salınan ve dural mast hücrelerinin degranülasyonuna yol açan CGRP aynı zamanda aktive olan mast hücrelerinin granüllerinden de salınmaktadır. Her iki durumda da CGRP güçlü vazodilatasyon, meningeal sinir uçlarının sensitizasyonu ve yeniden mast hücre aktivasyonunu tetiklemektedir. Migren patofizyolojisindeki bu önemli rolünden dolayı CGRP patofizyolojik ve tedaviye yönelik araştırmalarda başlıca hedef haline gelmiştir. Triptanlar grubundan sumatriptan ve ditanlar grubundan lasmiditan isimli ilaçların trigeminal sinirlerden CGRP salımını bloke ederek migren ataklarını sonlandırması da migren tedavisinde CGRP sisteminin oldukça önemli olduğunu pekiştirmiştir. Bunlara ek olarak, son zamanlarda geliştirilen yeni nesil spesifik anti-migren ilaçları CGRP sinyal

yolağını hedef almaktadır (300, 301). Bu kapsamda CGRP'yi ve CGRP reseptörünü bloke eden monoklonal antikolar ve ayrıca CGRP reseptör antagonistlerinin kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır (300, 301). Ülkemizde de bu ilaçlardan bazıları reçete edilmektedir. Yeni nesil bu spesifik ilaçların migren hastalarının yaklaşık yarısında etkili olduğu yapılan klinik denemelerle kanıtlanmıştır (301). Migren tedavisindeki bu olumlu gelişmelere rağmen hala bu ilaçlara cevap vermeyen migren hastalarında etkili olabilecek yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda nörojenik inflamasyonun birden fazla bileşenini hedef alan ve trigeminal sinir uçlarındaki reseptör ve enzim sistemlerini modüle eden çok hedefli yaklaşımlar umut verici olabilir. Bu yaklaşımı temel alarak mevcut tez çalışmasında migren dışındaki farklı deneysel çalışmalarda güçlü anti-nosiseptif, anti-inflamatuvar, anti-oksidan, anti-koagülan ve 5-lipoksijenaz inhibitörü özellikleri kanıtlanmış olan eskuletin isimli fitokimyasalın in-vivo ve ex-vivo migren modellerinde, migren patofizyolojisinden sorumlu tutulan nörojenik inflamasyonun bileşenleri üzerine terapötik etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda migren modelini oluşturmak için enjekte edilen NTG, in-vivo'da mekanik hiperaljeziyi, beyin sapı nukleus trigeminalis c-fos ekspresyonunda artışı, plazma, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nukleus trigeminalis CGRP düzeylerinde artışı ve dural mast hücre sayısı ve degranülasyonundaki artışı tetikledi. Çalışmamızda in-vivo migren modeli oluşturmak için kullanılan ve bir nitrik oksit donörü olan NTG'nin insanlara ve kemirgenlere sistemik enjeksiyonu dünya genelinde migren baş ağrısını gerçeğine yakın temsil eden en geçerli model olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda NTG'nin hiperaljezi, CGRP ve c-fos ekspresyonunda artış ve mast hücre degranülasyonundaki artışa yol açması literatür ile uyumludur ve NTG ile indüklenmiş migren modelinin doğru bir şekilde oluşturulduğunu göstermiştir (10, 282, 285, 298, 302, 303). Ayrıca NTG ile uyarılan değişikliklerin migren tedavisinde kullanılan sumatriptan isimli ilaç tarafından inhibe edilmesi modelin doğruluğunu daha fazla desteklemektedir. Çünkü NTG ile oluşturulan migren modelinin Sumatriptan tedavisine cevap verdiği daha önce kanıtlanmıştır (45, 282, 288, 304).

Diğer taraftan etkinliği araştırılan eskuletin'in 5 mg/kg dozu etkili olmazken 10 ve 20 mg/kg dozları in-vivo gruplarda NTG'nin tetiklediği mekanik hiperaljeziyi, beyin sapı nukleus trigeminalisteki c-fos ekspresyonunu ve ayrıca plazma, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nukleus trigeminalisteki CGRP konsantrasyonlarını ve dural mast hücrelerinin aktivasyonunu ve sayısını azalttı. Eskuletin'in NTG kaynaklı mekanik allodiniyi (hiperaljezi) ve beyin sapında nosiseptif iletim sırasında ekspresyonu artan c-fos'u

baskılması önceki çalışmalarda bildirilen analjezik etkisi ile uyumludur (64, 305). Daha önce yapılan çalışmalarda sıçanlarda inflamatuvar ve non-inflamatuvar olarak indüklenmiş ağrı modellerinde eskuletin'in analjezik etkiler gösterdiği bulunmuştur (64). Bir çalışmada, rezerpin ile oluşturulan deneysel sıçan fibromiyalji modelinde eskuletin'in mekanik allodiniyi iyileştirdiği gösterilmiştir (305). Mevcut çalışmada migren modelinde eskuletin'in analjezik etkilerinin gösterilmesi literatürde ilk olup her ne kadar literatürdeki çalışmalar migren ile ilgili olmasa da eskuletin'in anti-nosiseptif etkili olması ile uyumludur.

Bunlara ek olarak eskuletin'in NTG ile indüklenen plazma, trigeminal gangliyon ve beyin sapı nukleus trigeminalisteki CGRP konsantrasyonlarını azaltması migrendeki terapötik etkileri açısından önemlidir. Çünkü yukarıda da bahsedildiği gibi CGRP migren patofizyolojisindeki ana mediyatör olarak kabul edilmektedir ve yeni nesil migrene özgü ilaçlar CGRP ve reseptörünü hedef alarak etki göstermektedir. Dahası CGRP yolağını hedefleyen bu yeni ilaçlar tedavide büyük başarı göstermiştir. CGRP güçlü bir vazodilatör olmasının yanında trigeminal meningeal sinir terminallerini sensitize edici özelliğinden dolayı aynı zamanda pro-nosiseptif bir nöropeptittir. Kronik migrenin altında bulunan periferik ve merkezi sensitizasyonda ana rolü üstlendiği de kabul edilmektedir. Bu özellikleri ile uyumlu olarak migrenli hastaların kanında CGRP düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (294–297). Daha önce yapılan klinik çalışmalar ayrıca CGRP infüzyonunun insanlarda migren-benzeri baş ağrısı oluşturduğunu ve migrenin prodrom semptomlarına yol açtığını bildirmiştir (306). Mevcut çalışmamızda eskuletin, trigeminovasküler yapılardan (trigeminal gangliyon ve beyin sapı) NTG ile indüklenen CGRP salımını azaltmıştır. Eskuletin'in mekanik allodiniyi ve beyin sapı c-fos ekspresyonunu azaltıcı etkisi birlikte ele alındığında, eskuletin'in migren modelindeki bu anti-nosiseptif etkilerini trigeminovasküler sistemden migren mediyatörü olan CGRP'nin salımını inhibe ederek gösterdiği ileri sürülebilir. Ayrıca CGRP'nin migren patofizyolojisinden sorumlu tutulan meningeal nörojenik inflamasyonun oluşumundaki merkezi rolü göz önüne alındığında eskuletin'in migren modelinde CGRP salımını azaltarak anti-inflamatuvar etkiler sergilediği sonucuna da varılabilir.

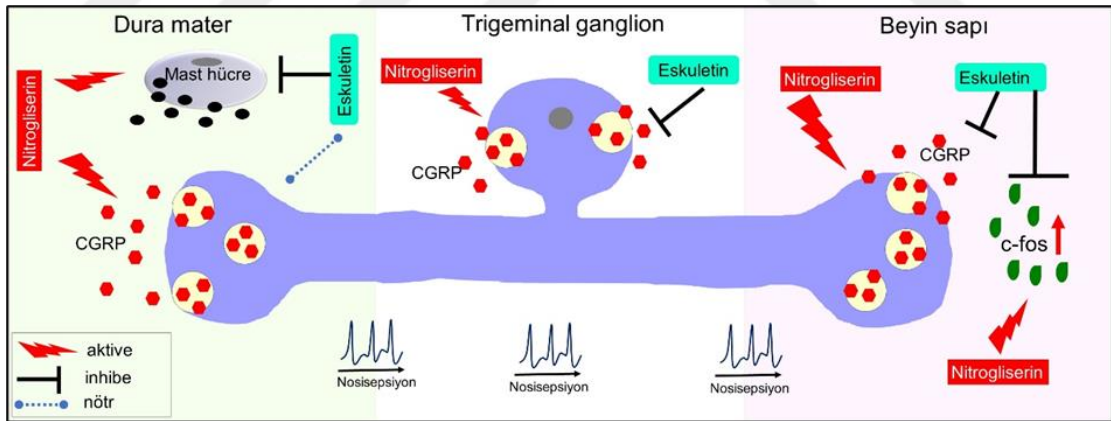
CGRP' ye ek olarak eskuletin mevcut çalışmada dural mast hücre aktivasyonunu da baskılamıştır. Mast hücreleri çok işlevli immün hücrelerdir ve tehlike anında potansiyel hasar vericilere karşı ilk cevap verenlerdir (307). Granüllerinde bulunan elli çeşitten fazla mediyatör aracılığı ile inflamatuvar yanıtı alevlendirerek vücudu alarma geçirirler (65, 304). Eskuletin'in çalışmamızda dural mast hücre aktivasyonunu baskılaması anti-inflamatuvar etkisinin diğer bir kanıtıdır. Daha önce inflamasyonun indüklendiği hayvan modellerinde, bu çalışmalar her ne kadar migren modelinde olmasa da, eskuletin'in IL-1B ve TNF- α gibi

bazı pro-inflamatuvar sitokinlerin ve inflamatuvar yolak ürünlerinden lökotrien B4' ün düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (305). Ayrıca farklı çalışmalarda eskuletin'in inflamasyon ile ilgili deneysel modellerde, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCL2 ve iNOS, NO ve PGE2 gibi inflamatuvar araçları ve yolakları inhibe ettiği de bildirilmiştir (273, 274, 279, 280). İnflamatuvar yolak ürünlerinden lökotrien B4' ün oluşumu araşidonik asit üzerine 5-lipoksijenaz (5-LOX) enziminin etkisi ile oluşmaktadır. Eskuletin güçlü bir 5-LOX inhibitörüdür. Önceki deneysel çalışmalar bazı lipoksijenaz metabolitlerinin periferik inflamasyona, hiperaljeziye ve nöropatik ağrıya yol açtığını göstermiştir (308–311). Bununla birlikte daha önce 5-LOX inhibitörünün mekanik hiperaljeziyi inhibe ettiği gösterilmiştir (310). Bu çalışmalardan yola çıkarak mevcut çalışmada eskuletin'in migren ağrısı ile ilgili parametreleri azaltıcı etkisinin onun 5-LOX inhibitörü özelliğinden kaynaklandığını ileri sürmek oldukça mantıklıdır ve literatür ile uyumludur

Buna ek olarak önceki çalışmalar eskuletin'in, inhibitör bir nörotransmitter olan GABA'nın GABA_A reseptörleri için kısmi bir agonist olduğunu bildirmiştir (312–314). GABA_A reseptörleri aktive olduğunda nörona klor girişini artırarak nöronal inhibisyon sağlamaktadır. Eskuletin'in mevcut çalışmadaki anti-nosiseptif etkisinden onun GABA_A reseptörlerini aktive edici etkisi de sorumlu olabilir. Çünkü GABA_A reseptör aktivasyonu nosiseptif ileti yollarındaki nöronları inhibe ederek analjezik özellik gösterirler. Bunlara ek olarak, yukarıda belirtildiği gibi bazı deneysel çalışmalar eskuletin'in iNOS ve NO'yu inhibe ettiğini bildirmiştir (273, 274, 279, 280). Migren modelini indüklemek için kullandığımız NTG bir nitrik oksit donörü olup migren benzeri etkilerini NO aracılığıyla ortaya çıkarmaktadır. Dolayısıyla bu bilgiler doğrultusunda eskuletin'in çalışmamızdaki anti-migren etkilerini NO yolağını baskılayarak göstermiş olabileceği yorumunu yapmak da oldukça mantıklıdır. Birlikte değerlendirildiğinde Eskuletin'in etki mekanizması açısından her üç olasılık da mümkündür ancak kesin etki mekanizmasının aydınlatılması için bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

In-vivo deneylere ek olarak çalışmamızda, eskuletin ex-vivo trigeminal gangliyon ve beyin sapı nukleus trigeminalis preparatlarında NTG ile uyarılan CGRP'nin salımını önemli ölçüde azalttı. Ancak eskuletin, ex-vivo hemiskull preparatlarında NTG ile uyarılan CGRP salımı üzerine etkili olmadı. Çalışmamızda in-vivo modele ek olarak eskuletin'in ex-vivo'da da test edilmesi eskuletin'in CGRP salımı üzerine CGRP'nin kaynağı olan sinirlere etkisinin direk mi yoksa dolaylı mı olduğunu anlamak içindi. Ex-vivo preparatlar vücuttan ayrı olduğu için uygulanan eskuletin direk nöronlar üzerine etki etmektedir. Ancak in-vivo'da vücuttaki ikincil mekanizmaları harekete geçirerek etki etmiş olması da muhtemeldir. Bunu anlamak

için eskuletin ex-vivo'da uygulanmış ve trigeminal gangliyon ve beyin sapı nukleus trigeminaliste uyarılmış CGRP düzeylerini azalttığı bulunmuştur. Bu bulgular eskuletin'in etkilerini vücutta ikinci mekanizmaları kullanmak yerine direk trigeminal sinir yapılarını etkileyerek gösterdiğini önermektedir. Diğer taraftan, ex-vivo hemiskull (dural) preparatlarda eskuletin NTG ile indüklenen CGRP salımını değiştirmedir. Bu bulgu her ne kadar diğer bulgularımız ile tezat gibi görünse de eskuletin'in bu etkisi meninksleri (kranyal dura mater) innerve eden trigeminal sinir uçlarında çok fazla çeşitte ve sayıda reseptör ve iyon kanalı sistemlerinin bulunması ile açıklanabilir (315, 316). Dolayısıyla ex-vivo hemiskull preparatlarında eskuletin, meninksleri (dura mater) innerve eden trigeminal sinir uçlarında hem eksitasyona hem de inhibisyona aracılık eden reseptör ve/veya iyon kanallarını aynı anda aktive ederek nöronal depolarizasyonun stabilizasyonuna yol açmış olabilir. Böyle bir olası mekanizma eskuletin'in, meningeal trigeminal sinir uçlarından NTG'nin CGRP salımını indükleyici etkisine engel olamamasını açıklayabilir. Bu konuda, meninksleri innerve eden trigeminal sinir uçlarındaki reseptör ve iyon kanallarının modülatörlerinin eskuletin ile birlikte test edilmesi, olası mekanizmanın aydınlatılması açısından yararlı olacaktır. Eskuletinin NTG ile indüklenmiş deneysel migren modellerindeki etkilerine dair bulgularımız Şekil 5.1'de özet olarak şematize edilmiştir.



Şekil 5.1 NTG ile oluşturulan migren modelinde Eskuletin'in etkilerinin şematik özet gösterimi. Eskuletin, migren ağrısı ile ilişki yapılar olan trigeminal gangliyon ve beyin sapı nukleus trigeminaliste NTG ile indüklenen CGRP salımını ve nucleus trigeminalis c-fos ekspresyonunu azalttı. Diğer taraftan eskuletin, migren ağrısının başlangıç yeri olarak kabul edilen meninklerde NTG ile indüklenen dural mast hücrelerinin aktivasyonunu azalttı ancak meningeal trigeminal sinir terminallerinden CGRP' nin indüklenmiş salımını değiştirmedir.

Sonuç olarak, mevcut çalışmamızda eskuletin'in NTG ile indüklenmiş in-vivo ve ex-vivo migren modellerinde anti-hiperaljezik etkisi ve trigeminovasküler sistemin periferik (trigeminal gangliyon) ve merkezi (beyin sapı) yapılarından migren mediyatörü olarak kabul edilen CGRP'nin indüklenmiş salımını azaltması ve nörojenik inflamasyonda önemli role sahip olan dural mast hücrelerinin aktivasyonunu baskılaması onun migren tedavisinde umut verici bir anti-migren potansiyeli sergilediğini önermektedir. Sunulan çalışma, eskuletinin bu yeni etkilerine dair ilk ve öncü bir çalışma olması nedeniyle de önemli olup bu açıdan literatüre katkıda bulunma potansiyeline sahiptir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Eskuletin deneysel migren modelinde trigeminovasküler sistem aktivasyonunu yansıtan mekanik allodiniyi ve beyin sapı c-fos ekspresyonunu azalttı.
- Eskuletin deneysel migren modelinde migren patofizyolojisi ile ilgili olan trigeminovasküler sistem yapılarından migren mediyatörü olarak kabul edilen CGRP'nin salımını azalttı.
- Eskuletin deneysel migren modelinde migren patofizyolojisinden sorumlu tutulan meningeal nörojenik inflamasyonun bileşenlerinden meningeal (dural) mast hücrelerinin aktivasyonunu baskıladı.
- Eskuletin ex-vivo modellerde trigeminal ganglion ve beyin sapı nukleus trigeminalis'ten CGRP salımını azalttı ancak meninksleri innerve eden trigeminal afferentleri içeren hemiskull'dan CGRP salımını etkilemedi.
- Eskuletin'in trigeminovasküler sistemin merkezi ve periferik yapılarından CGRP salımını ve dural mast hücre aktivasyonunu baskılaması nörojenik inflamasyonun bileşenlerini hedef alan çok hedefli yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemlidir.
- Bu çalışma eskuletin'in migren modelinde etkilerini araştıran ilk ve öncü bir çalışmadır
- Eskuletin'in migren modelinde sergilediği olumlu sonuçlar ileride farklı migren modellerinde de terapötik etkilerinin araştırılması için iyi bir bilimsel temel oluşturmuştur.
- Eskuletin' in farklı migren modellerinde 5-lipoksijenaz, nitrik oksit ve çeşitli iyon kanallarını hedef alan bloker ve antagonistlerle birlikte test edilmesi etki mekanizmasının daha fazla aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır.
- Eskuletin' in ileride farklı migren modellerinde de terapötik etkinliğinin ortaya çıkarılması migren hastalarında klinik denemelerinin yapılması için iyi bir temel oluşturacaktır.

7. KAYNAKLAR

(Bu tez çalışmasında Vancouver atıf sistemi kullanılmıştır.)

1. Goadsby PJ, Holland PR. An Update: Pathophysiology of Migraine. *Neurol Clin.* 2019;37(4):651–71.
2. Saylor D, Steiner TJ. The Global Burden of Headache. *Semin Neurol.* 2018;38(2):182–90.
3. Ashina M, Saper J, Cady R, et al. Eptinezumab in episodic migraine: A randomized, double-blind, placebo-controlled study (PROMISE-1). *Cephalalgia.* 2020;40(3):241.
4. Fu T, Liu L, Huang X, et al. Cerebral blood flow alterations in migraine patients with and without aura: An arterial spin labeling study. *J Headache Pain [Internet].* 2022 [cited 2023 Jul 22];23(1) Available from: /pmc/articles/PMC9531478/. doi:10.1186/S10194-022-01501-0.
5. Rapoport A, Edmeads J. Migraine: the evolution of our knowledge. *Arch Neurol.* 2000;57(8):1221–3.
6. Erdener ŞE, Kaya Z, Dalkara T. Parenchymal neuroinflammatory signaling and dural neurogenic inflammation in migraine. *J Headache Pain [Internet].* 2021 [cited 2023 Aug 6];22(1) Available from: /pmc/articles/PMC8600694/. doi:10.1186/S10194-021-01353-0.
7. Penfield W, Mcnaughton F. Dural headache and innervation of the dura mater. *Arch Neurol Psychiatry.* 1940;44(1):43-75
8. Ramachandran R. Neurogenic inflammation and its role in migraine. *Semin Immunopathol.* 2018;40(3):301–14.
9. Ray BS, Wolff HG. Experimental studies on headache: Pain-sensitive structures of the head and their significance in headache. *Archives of Surgery.* 1940;41(4):813-56
10. Kilinc E, Dagistan Y, Kukner A, et al. Salmon calcitonin ameliorates migraine pain through modulation of CGRP release and dural mast cell degranulation in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018;45(6):536–46.
11. Hoffmann J, Baca SM, Akerman S. Neurovascular mechanisms of migraine and cluster headache. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2019;39(4):573–94.

12. Tajti J, Möller S, Uddman R, Bodi I, Edvinsson L. The human superior cervical ganglion: neuropeptides and peptide receptors. *Neurosci Lett*. 1999;263(2–3):121–4.
13. Graefe SB, Mohiuddin SS. Biochemistry, Substance P. StatPearls [Internet]. 2022 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554583/>.
14. Steenbergh PM, Höppener JWM, Zandberg J, Visser A, Lips CJM, Jansz HS. Structure and expression of the human calcitonin/CGRP genes. *FEBS Lett*. 1986;209(1):97–103.
15. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, et al. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*. 1998;393(6683):333–9.
16. Edvinsson L, Warfvinge K. Recognizing the role of CGRP and CGRP receptors in migraine and its treatment. *Cephalalgia*. 2019;39(3):366–73.
17. Sevivas H, Fresco P. Treatment of resistant chronic migraine with anti-CGRP monoclonal antibodies: a systematic review. *Eur J Med Res*. 2022;27(1):86.
18. Durham PL. Inhibition of Calcitonin Gene-Related Peptide Function: A Promising Strategy for Treating Migraine. *Headache*. 2008;48(8):1269.
19. Cernuda-Morollón E, Larrosa D, Ramón C, Vega J, Martínez-Camblor P, Pascual J. Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine. *Neurology*. 2013;81(14):1191–6.
20. Sarchielli P, Alberti A, Codini M, Floridi A, Gallai V. Nitric oxide metabolites, prostaglandins and trigeminal vasoactive peptides in internal jugular vein blood during spontaneous migraine attacks. *Cephalalgia*. 2000;20(10):907–18.
21. Goadsby PJ, Edvinsson L. The trigeminovascular system and migraine: Studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann Neurol*. 1993;33(1):48–56.
22. Dahlin JS, Hallgren J. Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues. *Mol Immunol*. 2015;63(1):9–17.
23. da Silva EZM, Jamur MC, Oliver C. Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2014;62(10):698.
24. Graham AC, Temple RM, Obar JJ. Mast cells and influenza A virus: Association with allergic responses and beyond. *Front Immunol* [Internet]. 2015 [cited 2022 Dec 12];6(MAY) doi:10.3389/FIMMU.2015.00238.

25. Zhang XC, Strassman AM, Burstein R, Levy D. Sensitization and activation of intracranial meningeal nociceptors by mast cell mediators. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;322(2):806–12.
26. Neeb L, Hellen P, Boehnke C, et al. IL-1 β Stimulates COX-2 Dependent PGE2 Synthesis and CGRP Release in Rat Trigeminal Ganglia Cells. *PLoS One.* 2011;6(3):17360.
27. Cunha JM, Cunha FQ, Poole S, Ferreira SH. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 2000;130(6):1418.
28. Paszcuk AF, Quintão NLM, Fernandes ES, et al. Mechanisms underlying the nociceptive and inflammatory responses induced by trypsin in the mouse paw. *Eur J Pharmacol.* 2008;581(1–2):204–15.
29. Jin H, Koyama T, Hatanaka Y, Akiyama S, Takayama F, Kawasaki H. Histamine-induced vasodilation and vasoconstriction in the mesenteric resistance artery of the rat. *Eur J Pharmacol.* 2006;529(1–3):136–44.
30. Levy D. Migraine pain, meningeal inflammation, and mast cells. *Curr Pain Headache Rep.* 2009;13(3):237–40.
31. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci.* 1989;12(11):459–62.
32. Mitsikostas DD, Sanchez del Rio M. Receptor systems mediating c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis in animal models of migraine. *Brain Res Rev.* 2001;35(1):20–35.
33. Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, et al. The Concise Guide to Pharmacology 2013/14.: The Concise Guide to Pharmacology 2013/14: G Protein-Coupled Receptors. *Br J Pharmacol.* 2013;170(8):1459.
34. Messlinger K, Fischer MJM, Lennerz JK. Neuropeptide effects in the trigeminal system: pathophysiology and clinical relevance in migraine. *Keio J Med.* 2011;60(3):82–9.
35. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature.* 1987;328(6131):632–4.

36. Clayton JS, Gaskin PJ, Beattie DT. Attenuation of Fos-like immunoreactivity in the trigeminal nucleus caudalis following trigeminovascular activation in the anaesthetised guinea-pig. *Brain Res.* 1997;775(1–2):74–80.
37. Kaube H, Hoskin KL, Goadsby PJ. Activation of the trigeminovascular system by mechanical distension of the superior sagittal sinus in the cat. *Cephalalgia.* 1992;12(3):133–6.
38. Zhu X, Han Y, Xiong W, et al. Effects of heating coagulation of middle meningeal artery on plasma CGRP level and c-fos expression in migraine rat triggered by nitroglycerin. *Neurological Sciences.* 2011;32(4):589–94.
39. Moskowitz MA, Nozaki K, Kraig RP. Neocortical spreading depression provokes the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. *The Journal of Neuroscience.* 1993;13(3):1167.
40. Francis SH, Busch JL, Corbin JD. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev.* 2010;62(3):525–63.
41. Lassen LH, Christiansen I, Iversen HK, Jansen-Olesen I, Olesen J. The effect of nitric oxide synthase inhibition on histamine induced headache and arterial dilatation in migraineurs. *Cephalalgia.* 2003;23(9):877–86.
42. Luo ZD, Cizkova D. The role of nitric oxide in nociception. *Curr Rev Pain.* 2000;4(6):459–66.
43. Sureda-Gibert P, Romero-Reyes M, Akerman S. Nitroglycerin as a model of migraine: Clinical and preclinical review. *Neurobiol Pain.* 2022;12:100105–100105.
44. Afridi SK, Kaube H, Goadsby PJ. Glyceryl trinitrate triggers premonitory symptoms in migraineurs. *Pain.* 2004;110(3):675–80.
45. Juhasz G, Zsombok T, Modos EA, et al. NO-induced migraine attack: strong increase in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and negative correlation with platelet serotonin release. *Pain.* 2003;106(3):461–70.
46. Wu S, Ren X, Zhu C, et al. A c-Fos activation map in nitroglycerin/levcromakalim-induced models of migraine. *J Headache Pain [Internet].* 2022 [cited 2023 Aug 7];23(1) Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36180824/>. doi:10.1186/S10194-022-01496-8.

47. Pardutz A, Szatmári E, Vecsei L, Schoenen J. Nitroglycerin-induced nNOS increase in rat trigeminal nucleus caudalis is inhibited by systemic administration of lysine acetylsalicylate but not of sumatriptan. *Cephalalgia*. 2004;24(6):439–45.
48. Tassorelli C, Joseph SA. Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Res*. 1995;682(1–2):167–81.
49. Zobdeh F, ben Kraiem A, Attwood MM, et al. Pharmacological treatment of migraine: Drug classes, mechanisms of action, clinical trials and new treatments. *Br J Pharmacol*. 2021;178(23):4588–607.
50. Kilinc E, Dagistan Y, Kotan B, Cetinkaya A. Effects of *Nigella sativa* seeds and certain species of fungi extracts on number and activation of dural mast cells in rats. *Physiol Int*. 2017;104(1):15–24.
51. Tanaka M, Török N, Vecsei L. Are 5-HT₁ receptor agonists effective anti-migraine drugs? <https://doi.org/10.1080/1465656620211910235>. 2021;22(10):1221–5.
52. Edvinsson L, Haanes KA, Warfvinge K, Krause DiN. CGRP as the target of new migraine therapies - successful translation from bench to clinic. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(6):338–50.
53. Manoukian R, Sun H, Miller S, Shi D, Chan B, Xu C. Effects of monoclonal antagonist antibodies on calcitonin gene-related peptide receptor function and trafficking. *Journal of Headache and Pain*. 2019;20(1):1–12.
54. Luo G, Chen L, Conway CM, et al. Discovery of (5S,6S,9R)-5-amino-6-(2,3-difluorophenyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-cyclohepta[b]pyridin-9-yl 4-(2-oxo-2,3-dihydro-1H-imidazo[4,5-b]pyridin-1-yl)piperidine-1-carboxylate (BMS-927711): an oral calcitonin gene-related peptide (CGRP) antagonist in clinical trials for treating migraine. *J Med Chem*. 2012;55(23):10644–51.
55. Yang CP, Liang CS, Chang CM, et al. Comparison of New Pharmacologic Agents With Triptans for Treatment of Migraine: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open* [Internet]. 2021 [cited 2023 Mar 23];4(10) Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34633423/>. doi:10.1001/JAMANETWORKOPEN.2021.28544.
56. Tfelt-Hansen PC, Koehler PJ. History of the use of ergotamine and dihydroergotamine in migraine from 1906 and onward. *Cephalalgia*. 2008;28(8):877–86.

57. Rubio V, García-Pérez AI, Tejedor MC, Herráez A, Díez JC. Esculetin Neutralises Cytotoxicity of t-BHP but Not of H₂O₂ on Human Leukaemia NB4 Cells. *Biomed Res Int* [Internet]. 2017 [cited 2023 Sep 7];2017 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28367450/>. doi:10.1155/2017/9491045.
58. Zhang L, Xie Q, Li X. Esculetin: A review of its pharmacology and pharmacokinetics. *Phytother Res*. 2022;36(1):279–98.
59. Rzodkiewicz P, Gaśnińska E, Gajewski M, Bujalska-Zadrozny M, Szukiewicz D, Maśliński S. Esculetin reduces leukotriene B₄ level in plasma of rats with adjuvant-induced arthritis. *Reumatologia*. 2016;54(4):161–4.
60. Hu Y, Hu Y, Chen X, Duan H, Mu X. Chinese herbal medicinal ingredients inhibit secretion of IL-6, IL-8, E-selectin and TXB₂ in LPS-induced rat intestinal microvascular endothelial cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2009;31(4):550–5.
61. Payá M, Halliwell B, Hoult JRS. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem Pharmacol*. 1992;44(2):205–14.
62. Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *Biomed Res Int* [Internet]. 2013 [cited 2023 Sep 7];2013 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23586066/>. doi:10.1155/2013/963248.
63. Lee HC, Liu FC, Tsai CN, Chou AH, Liao CC, Yu HP. Esculetin Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice Via Modulation of the AKT/ERK/NF- κ B and ROR γ t/IL-17 Pathways. *Inflammation*. 2020;43(3):962–74.
64. Rzodkiewicz P, Gasinska E, Maslinski S, Bujalska-Zadrozny M. Antinociceptive properties of esculetin in non-inflammatory and inflammatory models of pain in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015;42(2):213–9.
65. Koyuncu Irmak D, Kilinc E, Tore F. Shared fate of meningeal mast cells and sensory neurons in migraine. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2019 [cited 2022 Oct 24];13 doi:10.3389/FNCEL.2019.00136.
66. Lipton RB, Bigal ; M E, Diamond ; M, Freitag ; F, Reed ML, Stewart WF. Migraine prevalence, disease burden, and the need for preventive therapy. 2007 [cited 2022 Oct 25];

67. Wöber C, Brannath W, Schmidt K, et al. Prospective analysis of factors related to migraine attacks: the PAMINA study. *Cephalalgia*. 2007;27(4):304–14.
68. Burstein R, Nosedà R, Borsook D. Migraine: Multiple Processes, Complex Pathophysiology. 2015 [cited 2022 Oct 24]; Available from: http://www.jneurosci.org/misc/ifa_minireviews.dtl.
69. Donnet A, Ducros A, Radat F, Allaf B, Chouette I, Lanteri-Minet M. Severe migraine and its control: A proposal for definitions and consequences for care. *Rev Neurol (Paris)*. 2021;177(8):924–34.
70. Silberstein SD, Young WB. Migraine aura and prodrome. *Semin Neurol*. 1995;15(2):175–82.
71. Aguilar-Shea AL, Diaz-de-Teran J. Migraine review for general practice. *Aten Primaria*. 2022;54(2):102208.
72. Bose P, Karsan N, Goadsby PJ. The Migraine Postdrome. *Continuum (Minneapolis)*. 2018;24(4, Headache):1023–31.
73. Edvinsson L, Uddman R. Neurobiology in primary headaches. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005;48(3):438–56.
74. Boran HE, Bolay H. Pathophysiology of Migraine. *Noro Psikiyatir Ars*. 2013;50(Suppl 1):S1.
75. Olesen J, Bes A, Kunkel R, et al. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia*. 2013;33(9):629–808.
76. Graham JR, Wolff HG. Mechanism of migraine headache and action of ergotamine tartrate. *Arch Neurol Psychiatry*. 1938;39(4):737-63.
77. Eadie MJ. The pathogenesis of migraine - 17th to early 20th century understandings. *J Clin Neurosci*. 2005;12(4):383–8.
78. Geppetti P, Rossi E, Chiarugi A, Benemei S. Antidromic vasodilatation and the migraine mechanism. *J Headache Pain*. 2012;13(2):103.
79. Asghar MS, Hansen AE, Amin FM, et al. Evidence for a vascular factor in migraine. *Ann Neurol*. 2011;69(4):635–45.
80. Amin FM, Asghar MS, Hougaard A, et al. Magnetic resonance angiography of intracranial and extracranial arteries in patients with spontaneous migraine without aura: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2013;12(5):454–61.

81. Ashina M, Tfelt-Hansen P, Dalgaard P, Olesen J. Lack of correlation between vasodilatation and pharmacologically induced immediate headache in healthy subjects. *Cephalalgia*. 2011;31(6):683–90.
82. May A, Goadsby PJ. The trigeminovascular system in humans: pathophysiologic implications for primary headache syndromes of the neural influences on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(2):115–27.
83. Messlinger K. Migraine: where and how does the pain originate? *Exp Brain Res*. 2009;196(1):179–93.
84. Bartsch T, Goadsby PJ. Anatomy and Physiology of Pain Referral Patterns in Primary and Cervicogenic Headache Disorders. *Headache Currents*. 2005;2(2):42–8.
85. Shibata Y. Migraine Pathophysiology Revisited: Proposal of a New Molecular Theory of Migraine Pathophysiology and Headache Diagnostic Criteria. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 19];23(21) Available from: /pmc/articles/PMC9653875/. doi:10.3390/IJMS232113002.
86. Williamson DJ, Hargreaves RJ. Neurogenic inflammation in the context of migraine. *Microsc Res Tech*. 2001;53(3):167–78.
87. Parsons AA, Strijbos PJLM. The neuronal versus vascular hypothesis of migraine and cortical spreading depression. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3(1):73–7.
88. Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med*. 2011;17(4):439–47.
89. Telles JPM, Welling LC, Coelho ACS da S, Rabelo NN, Teixeira MJ, Figueiredo EG. Cortical spreading depolarization and ketamine: a short systematic review. *Neurophysiol Clin*. 2021;51(2):145–51.
90. Kraio RP, Nicholson C. Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience*. 1978;3(11):1045–59.
91. Zhou N, Rungta RL, Malik A, Han H, Wu DC, MacVicar BA. Regenerative glutamate release by presynaptic NMDA receptors contributes to spreading depression. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2013;33(10):1582.
92. Carneiro-Nascimento S, Levy D. Cortical spreading depression and meningeal nociception. *Neurobiology of Pain* [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 20];11 Available from: /pmc/articles/PMC9065921/. doi:10.1016/J.YNPAI.2022.100091.

93. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med.* 2002;8(2):136–42.
94. Bolay H, Vuralli D, Goadsby PJ. Aura and Head pain: relationship and gaps in the translational models. *J Headache Pain* [Internet]. 2019 [cited 2023 Mar 20];20(1) Available from: /pmc/articles/PMC6734357/. doi:10.1186/S10194-019-1042-8.
95. Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(10):570–84.
96. Buture A, Gooriah R, Nimeri R, Ahmed F. Current Understanding on Pain Mechanism in Migraine and Cluster Headache. *Anesth Pain Med.* 2016;6(3):35190.
97. Charles A. The pathophysiology of migraine: implications for clinical management. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):174–82.
98. Derbyshire SWG, Jones AKP, Gyulai F, Clark S, Townsend D, Firestone LL. Pain processing during three levels of noxious stimulation produces differential patterns of central activity. *Pain.* 1997;73(3):431–45.
99. Nosedà R, Burstein R. Migraine pathophysiology: anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, CSD, sensitization and modulation of pain. *Pain* [Internet]. 2013 [cited 2023 Mar 29];154 Suppl 1(SUPPL. 1) Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24347803>. doi:10.1016/j.pain.2013.07.021.
100. Strassman AM, Raymond SA, Burstein R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature.* 1996;384(6609):560–4.
101. Burstein R, Jakubowski M, Garcia-Nicas E, et al. Thalamic sensitization transforms localized pain into widespread allodynia. *Ann Neurol.* 2010;68(1):81.
102. Olesen J, Iversen HK, Thomsen LL. Nitric oxide supersensitivity: a possible molecular mechanism of migraine pain. *Neuroreport.* 1993;4(8):1027–30.
103. Edvinsson L. Pathophysiology of primary headaches. *Curr Pain Headache Rep.* 2001;5(1):71–8.
104. Edvinsson L, Owman C, Sjöberg NO. Autonomic nerves, mast cells, and amine receptors in human brain vessels. A histochemical and pharmacological study. *Brain Res.* 1976;115(3):377–93.

105. Tajti J, Szok D, Majláth Z, Tuka B, Csáti A, Vécsei L. Migraine and neuropeptides. *Neuropeptides*. 2015;52:19–30.
106. Edvinsson L, Villalón CM, Maassenvandenbrink A. Basic mechanisms of migraine and its acute treatment. *Pharmacol Ther*. 2012;136(3):319–33.
107. Gallai V, Sarchielli P, Trequattrini A, Paciaroni M, Usai F, Palumbo R. Neuropeptide Y in juvenile migraine and tension-type headache. *Headache*. 1994;34(1):35–40.
108. Larsson LI, Edvinsson L, Fahrenkrug J, Håkanson R, Owman C. Immunohistochemical localization of a vasodilatory polypeptide (VIP) in cerebrovascular nerves. *Brain Res*. 1976;113(2):400–4.
109. Nozaki K, Moskowitz MA, Maynard KI, et al. Possible Origins and Distribution of Immunoreactive Nitric Oxide Synthase-Containing Nerve Fibers in Cerebral Arteries. <http://dx.doi.org/101038/jcbfm19939>. 2016;13(1):70–9.
110. Laburthe M, Couvineau A, Tan V. Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: Structure, models of activation and pharmacology. *Peptides (NY)*. 2007;28(9):1631–9.
111. Csati A, Tajti J, Kuris A, Tuka B, Edvinsson L, Warfvinge K. Distribution of vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, nitric oxide synthase, and their receptors in human and rat sphenopalatine ganglion. *Neuroscience*. 2012;202:158–68.
112. González-Hernández A, Condés-Lara M, García-Boll E, Villalón CM. An outlook on the trigeminovascular mechanisms of action and side effects concerns of some potential neuropeptidergic antimigraine therapies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2021;17(2):179–99.
113. Erdling A, Sheykhzade M, Maddahi A, Bari F, Edvinsson L. VIP/PACAP receptors in cerebral arteries of rat: characterization, localization and relation to intracellular calcium. *Neuropeptides*. 2013;47(2):85–92.
114. Syed AU, Koide M, Braas KM, May V, Wellman GC. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Potently Dilates Middle Meningeal Arteries: Implications for Migraine. *J Mol Neurosci*. 2012;48(3):574.
115. Tuka B, Helyes Z, Markovics A, et al. Peripheral and central alterations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-like immunoreactivity in the rat in response to activation of the trigeminovascular system. *Peptides (NY)*. 2012;33(2):307–16.

116. Sarchielli P, Pini LA, Zanchin G, et al. Clinical-Biochemical Correlates of Migraine Attacks in Rizatriptan Responders and Non-Responders. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2005.01016.x>. 2016;26(3):257–65.
117. Cernuda-Morollón E, Martínez-Camblor P, Ramón C, Larrosa D, Serrano-Pertierra E, Pascual J. CGRP and VIP levels as predictors of efficacy of Onabotulinumtoxin type A in chronic migraine. *Headache*. 2014;54(6):987–95.
118. Nosedá R, Jakubowski M, Kainz V, Borsook D, Burstein R. Cortical Projections of Functionally Identified Thalamic Trigeminovascular Neurons: Implications for Migraine Headache and Its Associated Symptoms. *The Journal of Neuroscience*. 2011;31(40):14204.
119. Zagami AS, Goadsby PJ, Edvinsson L. Stimulation of the superior sagittal sinus in the cat causes release of vasoactive peptides. *Neuropeptides*. 1990;16(2):69–75.
120. Goadsby PJ, Charbit AR, Andreou AP, Akerman S, Holland PR. Neurobiology of migraine. *Neuroscience*. 2009;161(2):327–41.
121. Shields KG, Goadsby PJ. Serotonin receptors modulate trigeminovascular responses in ventroposteromedial nucleus of thalamus: a migraine target? *Neurobiol Dis*. 2006;23(3):491–501.
122. Summ O, Charbit AR, Andreou AP, Goadsby PJ. Modulation of nociceptive transmission with calcitonin gene-related peptide receptor antagonists in the thalamus. *Brain*. 2010;133(9):2540–8.
123. Andreou AP, Goadsby PJ. Therapeutic potential of novel glutamate receptor antagonists in migraine. <http://dx.doi.org/10.1517/13543780902913792>. 2009;18(6):789–803.
124. Goadsby PJ, Holland PR, Martins-Oliveira M, Hoffmann J, Schankin C, Akerman S. Pathophysiology of Migraine: A Disorder of Sensory Processing. *Physiol Rev*. 2017;97(2):553–622.
125. Kew JNC, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005;179(1):4–29.
126. Jackson DL, Graff CB, Richardson JD, Hargreaves KM. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*. 1995;284(3):321–5.

127. Burstein R, Cutrer MF, Yarnitsky D. The development of cutaneous allodynia during a migraine attack clinical evidence for the sequential recruitment of spinal and supraspinal nociceptive neurons in migraine. *Brain*. 2000;123 (Pt 8)(8):1703–9.
128. Mitsikostas DD, Del Rio MS, Wacber C, Huang Z, Michael Cutrer F, Moskowitz MA. Non-NMDA glutamate receptors modulate capsaicin induced c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis. *Br J Pharmacol*. 1999;127(3):623–30.
129. Hoffmann J, Charles A. Glutamate and Its Receptors as Therapeutic Targets for Migraine. *Neurotherapeutics* 2018 15:2. 2018;15(2):361–70.
130. Settle M. The hypothalamus. *Neonatal Netw*. 2000;19(6):9–14.
131. Denuelle M, Fabre N, Payoux P, Chollet F, Geraud G. Hypothalamic activation in spontaneous migraine attacks. *Headache*. 2007;47(10):1418–26.
132. Alstadhaug K. Migraine and the hypothalamus. *Cephalalgia*. 2009;29(8):809–17.
133. Burstein R, Dado RJ, Giesler GJ. The cells of origin of the spinothalamic tract of the rat: a quantitative reexamination. *Brain Res*. 1990;511(2):329–37.
134. Liu Y, Broman J, Zhang M, Edvinsson L. Brainstem and Thalamic Projections from a Craniovascular Sensory Nervous Centre in the Rostral Cervical Spinal Dorsal Horn of Rats. <https://doi.org/10.1111/j1468-2982200801829.x>. 2009;29(9):935–48.
135. Afridi SK, Matharu MS, Lee L, et al. A PET study exploring the laterality of brainstem activation in migraine using glyceryl trinitrate. *Brain*. 2005;128(Pt 4):932–9.
136. Holland PR, Saengjaroenham C, Vila-Pueyo M. The role of the brainstem in migraine: Potential brainstem effects of CGRP and CGRP receptor activation in animal models. *Cephalalgia*. 2019;39(3):390–402.
137. Rosa AC, Fantozzi R. The role of histamine in neurogenic inflammation. *Br J Pharmacol*. 2013;170(1):38.
138. Xanthos DN, Sandkühler J. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(1):43–53.
139. Melo-Carrillo A, Strassman AM, Nir RR, et al. Fremanezumab—A Humanized Monoclonal Anti-CGRP Antibody—Inhibits Thinly Myelinated (A δ) But Not Unmyelinated (C) Meningeal Nociceptors. *The Journal of Neuroscience*. 2017;37(44):10587.

140. Xianli L, Wu Z, Li Y. Innervation of the Cerebral Dura Mater. *Neuroradiol J.* 2014;27(3):293.
141. Witten A, Marotta D, Cohen-Gadol A. Developmental innervation of cranial dura mater and migraine headache: A narrative literature review. *Headache.* 2021;61(4):569–75.
142. Jansen I, Uddman R, Ekman R, Olesen J, Ottosson A, Edvinsson L. Distribution and effects of neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide, substance P, and calcitonin gene-related peptide in human middle meningeal arteries: comparison with cerebral and temporal arteries. *Peptides (NY).* 1992;13(3):527–36.
143. Liu Y, Broman J, Edvinsson L. Central projections of the sensory innervation of the rat middle meningeal artery. *Brain Res.* 2008;1208:103–10.
144. Manning BM, Gruba SM, Meyer AF, Haynes CL. Neuropeptide-Induced Mast Cell Degranulation and Characterization of Signaling Modulation in Response to IgE Conditioning. *ACS Chem Biol.* 2016;11(11):3077–83.
145. Balcziaik LK, Russo AF. Dural Immune Cells, CGRP, and Migraine. *Front Neurol.* 2022;13:874193.
146. KILINÇ E, BARANOĞLU Y. Mast cell stabilizers as a supportive therapy can contribute to alleviate fatal inflammatory responses and severity of pulmonary complications in COVID-19 infection. *Anadolu Kliniği Tıp Bilimleri Dergisi.* 2020;25(Special Issue on COVID 19):111–8.
147. Alstadhaug KB. Histamine in migraine and brain. *Headache.* 2014;54(2):246–59.
148. Moskowitz MA. The neurobiology of vascular head pain. *Ann Neurol.* 1984;16(2):157–68.
149. Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(7):533.
150. Edwards RM, Stack EJ, Trizna W. Calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase and relaxes intracerebral arterioles. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics [Internet].* 1991 [cited 2022 Dec 7];257(3).
151. Amin FM, Asghar MS, Guo S, et al. Headache and prolonged dilatation of the middle meningeal artery by PACAP38 in healthy volunteers. *Cephalalgia.* 2012;32(2):140–9.

152. Färber K, Kettenmann H. Physiology of microglial cells. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;48(2):133–43.
153. Sofroniew M V. Astrocyte reactivity: Subtypes, states and functions in CNS innate immunity. *Trends Immunol.* 2020;41(9):758.
154. Fiebich BL, Schleicher S, Butcher RD, Craig A, Lieb K. The neuropeptide substance P activates p38 mitogen-activated protein kinase resulting in IL-6 expression independently from NF-kappa B. *J Immunol.* 2000;165(10):5606–11.
155. Edvinsson L, Haanes KA, Warfvinge K. Does inflammation have a role in migraine? *Nat Rev Neurol.* 2019;15(8):483–483.
156. Empl M, Sostak P, Riedel M, et al. Decreased Stnf-Ri in Migraine Patients? *BOS*<https://doi.org/10.1046/j1468-2982200300453.x>. 2016;23(1):55–8.
157. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2014;1843(11):2563–82.
158. Conti P, D'Ovidio C, Conti C, et al. Progression in migraine: Role of mast cells and pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Eur J Pharmacol.* 2019;844:87–94.
159. Christopherson K, Hromas R. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. *Stem Cells.* 2001;19(5):388–96.
160. Tore F, Tuncel N. Anatomical and Functional Relationships Between Sensory Nerves and Mast Cells. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2012;10(1):10–7.
161. Leist M, Sünder CA, Drube S, et al. Membrane-bound stem cell factor is the major but not only driver of fibroblast-induced murine skin mast cell differentiation. *Exp Dermatol.* 2017;26(3):255–62.
162. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev.* 1997;77(4):1033–79.
163. Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunology* 2010 3:2. 2009;3(2):111–28.
164. Noto CN, Hoft SG, DiPaolo RJ. Mast Cells as Important Regulators in Autoimmunity and Cancer Development. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:2814.

165. Tore F, Reynier-Rebuffel AM, Tuncel N, Callebert J, Aubineau P. Effects of sepsis on mast cells in rat dura mater: influence of L-NAME and VIP. *Br J Pharmacol*. 2001;134(7):1367.
166. Rozniecki JJ, Dimitriadou V, Lambracht-Hall M, Pang X, Theoharides TC. Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell-neuron interactions in vitro and in vivo. *Brain Res*. 1999;849(1–2):1–15.
167. Lennerz JK, Rühle V, Ceppa EP, et al. Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system: differences between peripheral and central CGRP receptor distribution. *J Comp Neurol*. 2008;507(3):1277–99.
168. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2005;6(2):135–42.
169. Alvarez-Errico D, Lessmann E, Rivera J. Adapters in the organization of mast cell signaling. *Immunol Rev*. 2009;232(1):195.
170. Min HK, Kim KW, Lee SH, Kim HR. Roles of mast cells in rheumatoid arthritis. *Korean J Intern Med*. 2020;35(1):12.
171. Suto H, Nakae S, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ. Mast Cell-Associated TNF Promotes Dendritic Cell Migration. *The Journal of Immunology*. 2006;176(7):4102–12.
172. Baram D, Vaday GG, Salamon P, Drucker I, Hershkovich R, Mekori YA. Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha. *J Immunol*. 2001;167(7):4008–16.
173. Liu X, Yang W, Zhu C, et al. Toll-like receptors and their role in neuropathic pain and migraine. *Mol Brain* [Internet]. 2022 [cited 2022 Dec 12];15(1) Available from: [/pmc/articles/PMC9392297/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/392297/). doi:10.1186/S13041-022-00960-5.
174. Lacagnina MJ, Watkins LR, Grace PM. Toll-like receptors and their role in persistent pain. *Pharmacol Ther*. 2018;184:145.
175. Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(7):478–94.
176. Kunder CA, St. John AL, Li G, et al. Mast cell-derived particles deliver peripheral signals to remote lymph nodes. *J Exp Med*. 2009;206(11):2455.

177. John ALS, Chan CY, Staats HF, Leong KW, Abraham SN. Synthetic mast-cell granules as adjuvants to promote and polarize immunity in lymph nodes. *Nat Mater.* 2012;11(3):250.
178. Tani E, Senba E, Kokumai S, Masuyama K, Ishikawa T, Tohyama M. Histamine application to the nasal mucosa induces release of calcitonin gene-related peptide and substance P from peripheral terminals of trigeminal ganglion: a morphological study in the guinea pig. *Neurosci Lett.* 1990;112(1):1–6.
179. Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, et al. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med.* 2000;6(2):151–8.
180. Vergnolle N, Bunnett NW, Sharkey KA, et al. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. *Nat Med.* 2001;7(7):821–6.
181. Gupta K, Harvima IT. Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. *Immunol Rev.* 2018;282(1):168.
182. Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, et al. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(1):21.
183. Hendriksen E, van Bergeijk D, Oosting RS, Redegeld FA. Mast cells in neuroinflammation and brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017;79:119–33.
184. Amara SG, Arriza JL, Leff SE, Swanson LW, Evans RM, Rosenfeld MG. Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science.* 1985;229(4718):1094–7.
185. Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin Gene-Related Peptide: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1099.
186. Messlinger K, Russo AF. Current understanding of trigeminal ganglion structure and function in headache. *Cephalalgia.* 2019;39(13):1661.
187. Gibbins IL, Furness JB, Costa M, MacIntyre I, Hillyard CJ, Girgis S. Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. *Neurosci Lett.* 1985;57(2):125–30.
188. Ottosson A, Edvinsson L. Release of histamine from dural mast cells by substance P and calcitonin gene-related peptide. *Cephalalgia.* 1997;17(3):166–74.
189. Raddant AC, Russo AF. Calcitonin gene-related peptide in migraine: intersection of peripheral inflammation and central modulation. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e36.

190. Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA. Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *The Journal of Neuroscience*. 1987;7(12):4129.
191. Burstein R, Collins B, Jakubowski M. Defeating migraine pain with triptans: a race against the development of cutaneous allodynia. *Ann Neurol*. 2004;55(1):19–26.
192. Vause C V., Durham PL. Calcitonin gene-related peptide differentially regulates gene and protein expression in trigeminal glia cells: Findings from array analysis. *Neurosci Lett*. 2010;473(3):163.
193. Capuano A, De Corato A, Lisi L, Tringali G, Navarra P, Dello Russo C. Proinflammatory-activated trigeminal satellite cells promote neuronal sensitization: relevance for migraine pathology. *Mol Pain*. 2009;5:43.
194. Iyengar S, Johnson KW, Ossipov MH, Aurora SK. CGRP and the Trigeminal System in Migraine. *Headache*. 2019;59(5):659.
195. Van Rossum D, Hanisch UK, Quirion R. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997;21(5):649–78.
196. Hay DL, Garelja ML, Poyner DR, Walker CS. Update on the pharmacology of calcitonin/CGRP family of peptides: IUPHAR Review 25. *Br J Pharmacol*. 2018;175(1):3.
197. Pioszak AA, Hay DL. RAMPs as allosteric modulators of the calcitonin and calcitonin-like class B G protein-coupled receptors. *Adv Pharmacol*. 2020;88:115.
198. ter Haar E, Koth CM, Abdul-Manan N, et al. Crystal structure of the ectodomain complex of the CGRP receptor, a class-B GPCR, reveals the site of drug antagonism. *Structure*. 2010;18(9):1083–93.
199. Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, Oliver KR, Dickerson IM. CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J Biol Chem*. 2000;275(40):31438–43.
200. Oliver KR, Wainwright A, Edvinsson L, Pickard JD, Hill RG. Immunohistochemical localization of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying proteins in the human cerebral vasculature. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22(5):620–9.

201. Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, et al. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 2000;275(7):5179–87.
202. Ferro A, Queen LR, Priest RM, et al. Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *Br J Pharmacol.* 1999;126(8):1872–80.
203. Hong KW, Yoo SE, Suk SS, Lee JY, Rhim BY. Pharmacological coupling and functional role for CGRP receptors in the vasodilation of rat pial arterioles. *Am J Physiol* [Internet]. 1996 [cited 2022 Dec 19];270(1 Pt 2) Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8769767/>. doi:10.1152/AJPHEART.1996.270.1.H317.
204. Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev.* 2004;84(3):903–34.
205. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci.* 1991;14:421–51.
206. Greenberg ME, Ziff EB. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature.* 1984;311(5985):433–8.
207. Lanahan A, Worley P. Immediate-Early Genes and Synaptic Function. *Neurobiol Learn Mem.* 1998;70(1–2):37–43.
208. Ter Horst GJ, Meijler WJ, Korf J, Kemper RHA. Trigeminal nociception-induced cerebral Fos expression in the conscious rat. *Cephalalgia.* 2001;21(10):963–75.
209. Kilinc E, Firat T, Tore F, Kiyani A, Kukner A, Tunçel N. Vasoactive Intestinal peptide modulates c-Fos activity in the trigeminal nucleus and dura mater mast cells in sympathectomized rats. *J Neurosci Res.* 2015;93(4):644–50.
210. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature.* 1999;398(6726):436–41.
211. A G, L V, J W, X L, R E. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci.* 1999;11(3):946–58.

212. Geppetti P, Del Bianco E, Santicioli P, Th.Lippe I, Maggi CA, Sicuteri F. Release of sensory neuropeptides from dural venous sinuses of guinea pig. *Brain Res.* 1990;510(1):58–62.
213. Cutrer FM, Limmroth V, Ayata G, Moskowitz MA. Attenuation by valproate of c-fos immunoreactivity in trigeminal nucleus caudalis induced by intracisternal capsaicin. *Br J Pharmacol.* 1995;116(8):3199.
214. Iliakis B, Anderson NL, Irish PS, Henry MA, Westrum LE. Electron microscopy of immunoreactivity patterns for glutamate and γ -aminobutyric acid in synaptic glomeruli of the feline spinal trigeminal nucleus (subnucleus caudalis). *Journal of Comparative Neurology.* 1996;366(3):465–77.
215. Bereiter DA, Bereiter DF, Hathaway CB. The NMDA receptor antagonist MK-801 reduces Fos-like immunoreactivity in central trigeminal neurons and blocks select endocrine and autonomic responses to corneal stimulation in the rat. *Pain.* 1996;64(1):179–89.
216. Bormann J. The “ABC” of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21(1):16–9.
217. Cutrer FM, Moskowitz MA. Wolff Award 1996. The actions of valproate and neurosteroids in a model of trigeminal pain. *Headache.* 1996;36(10):579–85.
218. Li JL, Ding YQ, Xiong KH, Li JS, Shigemoto R, Mizuno N. Substance P receptor (NK1)-immunoreactive neurons projecting to the periaqueductal gray: distribution in the spinal trigeminal nucleus and the spinal cord of the rat. *Neurosci Res.* 1998;30(3):219–25.
219. Sharp T, Barnes NM. Central 5-HT receptors and their function; present and future. *Neuropharmacology* [Internet]. 2020 [cited 2022 Nov 20];177 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32522572/>. doi:10.1016/J.NEUROPHARM.2020.108155.
220. Cologno D, Mazzeo A, Lecce B, et al. Triptans: over the migraine. *Neurological Sciences* 2012 33:1. 2012;33(1):193–8.
221. Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD. Migraine--current understanding and treatment. *N Engl J Med.* 2002;346(4):257–70.

222. Bruinvels AT, Landwehrmeyer B, Moskowitz MA, Hoyer D. Evidence for the presence of 5-HT_{1B} receptor messenger RNA in neurons of the rat trigeminal ganglia. *Eur J Pharmacol.* 1992;227(3):357–9.
223. Mitsikostas DD, Sanchez Del Rio M, Moskowitz MA, Waeber C. Both 5-HT_{1B} and 5-HT_{1F} receptors modulate c-fos expression within rat trigeminal nucleus caudalis. *Eur J Pharmacol.* 1999;369(3):271–7.
224. Nozaki K, Moskowitz MA, Boccalini P. CP-93,129, sumatriptan, dihydroergotamine block c-fos expression within rat trigeminal nucleus caudalis caused by chemical stimulation of the meninges. *Br J Pharmacol.* 1992;106(2):409–15.
225. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res.* 1999;31(6):577–96.
226. Ahmed AR, Ahmed M, Vun-Sang S, Iqbal M. Is Glyceryl Trinitrate, a Nitric Oxide Donor Responsible for Ameliorating the Chemical-Induced Tissue Injury In Vivo? *Molecules* 2022, Vol 27, Page 4362. 2022;27(14):4362.
227. Messlinger K, Suzuki A, Pawlak M, Zehnter A, Schmidt RF. Involvement of nitric oxide in the modulation of dural arterial blood flow in the rat. *Br J Pharmacol.* 2000;129(7):1397.
228. Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;176(176 Pt 1):213–54.
229. Edvinsson L, Mulder H, Goadsby PJ, Uddman R. Calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in the trigeminal ganglion: cerebral vasodilatation from trigeminal nerve stimulation involves mainly calcitonin gene-related peptide. *J Auton Nerv Syst.* 1998;70(1–2):15–22.
230. Toda N, Okamura T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol Rev.* 2003;55(2):271–324.
231. Casili G, Lanza M, Filippone A, et al. Dimethyl fumarate alleviates the nitroglycerin (NTG)-induced migraine in mice. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2020 [cited 2023 Mar 20];17(1) Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32066464/>. doi:10.1186/S12974-020-01736-1.
232. Chen H, Tang X, Li J, et al. IL-17 crosses the blood-brain barrier to trigger neuroinflammation: a novel mechanism in nitroglycerin-induced chronic migraine. *J*

- Headache Pain [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 20];23(1) Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34979902/>. doi:10.1186/S10194-021-01374-9.
233. Foudah AI, Devi S, Alqarni MH, et al. Quercetin Attenuates Nitroglycerin-Induced Migraine Headaches by Inhibiting Oxidative Stress and Inflammatory Mediators. *Nutrients* [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 20];14(22) Available from: </pmc/articles/PMC9695045/>. doi:10.3390/NU14224871.
234. Tfelt-Hansen PC, Koehler PJ. One Hundred Years of Migraine Research: Major Clinical and Scientific Observations From 1910 to 2010. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2011;51(5):752–78.
235. Jacob H, Braekow P, Schwarz R, et al. Ergotamine Stimulates Human 5-HT₄-Serotonin Receptors and Human H₂-Histamine Receptors in the Heart. *Int J Mol Sci*. 2023;24(5):4749.
236. Dale HH. On some physiological actions of ergot. *J Physiol*. 1906;34(3):163–206.
237. Tfelt-Hansen P, Saxena PR, Dahlöf C, et al. Ergotamine in the acute treatment of migraine: A review and European consensus. *Brain*. 2000;123(1):9–18.
238. Tynan D, Ahmad K, Thieben M. Long-term Ergotamine Derivative Therapy for Migraine Associated with Pachymeningitis and Sixth Cranial Nerve Palsy. *Neuro-Ophthalmology*. 2019;43(6):417.
239. Bigal M, Borucho S, Serrano D, Lipton R. The acute treatment of episodic and chronic migraine in the USA. *Cephalalgia*. 2009;29(8):891–7.
240. Curran DA, Hinterberger H, Lance JW, Joffe AD. Total plasma serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid and p-hydroxy-m-methoxymandelic acid excretion in normal and migrainous subjects. *Brain*. 1965;88(5):997–1010.
241. Kilinc E, Guerrero-Toro C, Zakharov A, et al. Serotonergic mechanisms of trigeminal meningeal nociception: Implications for migraine pain. *Neuropharmacology*. 2017;116:160–73.
242. Moreno-Ajona D, Chan C, Villar-Martínez MD, Goadsby PJ. Targeting CGRP and 5-HT_{1F} Receptors for the Acute Therapy of Migraine: A Literature Review. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2019;59(S2):3–19.
243. Villalón CM, Centurión D. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved

- and therapeutic implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2007;376(1–2):45–63.
244. Doenicke A, Brand J, Perrin VL. POSSIBLE BENEFIT OF GR43175, A NOVEL 5-HT₁-LIKE RECEPTOR AGONIST, FOR THE ACUTE TREATMENT OF SEVERE MIGRAINE. *The Lancet.* 1988;331(8598):1309–11.
245. Rubio-Beltrán E, Labastida-Ramírez A, Villalón CM, MaassenVanDenBrink A. Is selective 5-HT_{1F} receptor agonism an entity apart from that of the triptans in antimigraine therapy? *Pharmacol Ther.* 2018;186:88–97.
246. Adelborg K, Szépligeti SK, Holland-Bill L, et al. Migraine and risk of cardiovascular diseases: Danish population based matched cohort study. *BMJ.* 2018;360:k96.
247. de Vries T, Villalón CM, MaassenVanDenBrink A. Pharmacological treatment of migraine: CGRP and 5-HT beyond the triptans. *Pharmacol Ther.* 2020;211:107528.
248. Ramadan NM, Skljarevski V, Phebus LA, Johnson KW. 5-HT_{1F} receptor agonists in acute migraine treatment: a hypothesis. *Cephalalgia.* 2003;23(8):776–85.
249. González-Hernández A, Manrique-Maldonado G, Lozano-Cuenca J, et al. The 5-HT(1) receptors inhibiting the rat vasodepressor sensory CGRPergic outflow: further involvement of 5-HT(1F), but not 5-HT(1A) or 5-HT(1D), subtypes. *Eur J Pharmacol.* 2011;659(2–3):233–43.
250. Nelson DL, Phebus LA, Johnson KW, et al. Preclinical pharmacological profile of the selective 5-HT_{1F} receptor agonist lasmiditan. *Cephalalgia.* 2010;30(10):1159–69.
251. Edvinsson L, Chan KY, Eftekhari S, et al. Effect of the calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonist telcagepant in human cranial arteries. *Cephalalgia.* 2010;30(10):1233–40.
252. Hong P, Tan T, Liu Y, Xiao J. Gepants for abortive treatment of migraine: A network meta-analysis. *Brain Behav [Internet].* 2020 [cited 2023 Mar 24];10(8) Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32525262/>. doi:10.1002/BRB3.1701.
253. Iovino M, Feifel U, Yong CL, Wolters JM, Wallenstein G. Safety, tolerability and pharmacokinetics of BIBN 4096 BS, the first selective small molecule calcitonin gene-related peptide receptor antagonist, following single intravenous administration in healthy volunteers. *Cephalalgia.* 2004;24(8):645–56.

254. Olesen J, Diener H-C, Husstedt IW, et al. Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Antagonist BIBN 4096 BS for the Acute Treatment of Migraine. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030505>. 2004;350(11):1104–10.
255. Ho TW, Connor KM, Zhang Y, et al. Randomized controlled trial of the CGRP receptor antagonist telcagepant for migraine prevention. *Neurology*. 2014;83(11):958–66.
256. Marcus R, Goadsby PJ, Dodick D, Stock D, Manos G, Fischer TZ. BMS-927711 for the acute treatment of migraine: A double-blind, randomized, placebo controlled, dose-ranging trial. *Cephalalgia*. 2014;34(2):114–25.
257. Voss T, Lipton RB, Dodick DW, et al. A phase IIb randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ubrogepant for the acute treatment of migraine. *Cephalalgia*. 2016;36(9):887–98.
258. Reuter U, Ehrlich M, Gendolla A, et al. Erenumab versus topiramate for the prevention of migraine – a randomised, double-blind, active-controlled phase 4 trial. *Cephalalgia*. 2022;42(2):108.
259. Baumann A. Early development of therapeutic biologics--pharmacokinetics. *Curr Drug Metab*. 2006;7(1):15–21.
260. Bigal ME, Walter S, Rapoport AM. Therapeutic antibodies against CGRP or its receptor. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;79(6):886–95.
261. González-Hernández A, Marichal-Cancino BA, MaassenVanDenBrink A, Villalón CM. Side effects associated with current and prospective antimigraine pharmacotherapies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2018;14(1):25–41.
262. Oshima N, Narukawa Y, Takeda T, Kiuchi F. Collagenase inhibitors from *Viola yedoensis*. *J Nat Med*. 2013;67(1):240–5.
263. Garg SS, Gupta J, Sahu D, Liu CJ. Pharmacological and Therapeutic Applications of Esculetin. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 25];23(20) Available from: [/pmc/articles/PMC9604018/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39604018/). doi:10.3390/IJMS232012643.
264. Liang C, Ju W, Pei S, Tang Y, Xiao Y. Pharmacological Activities and Synthesis of Esculetin and Its Derivatives: A Mini-Review. *Molecules* 2017, Vol 22, Page 387. 2017;22(3):387.

265. Kadakol A, Sharma N, Kulkarni YA, Gaikwad AB. Esculetin: A phytochemical endeavor fortifying effect against non-communicable diseases. *Biomed Pharmacother.* 2016;84:1442–8.
266. Budzynska B, Boguszewska-Czubara A, Kruk-Slomka M, et al. Effects of imperatorin on scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2015;232(5):931–42.
267. Floege J, Lüscher B, Müller-Newen G. Cytokines and inflammation. *Eur J Cell Biol.* 2012;91(6–7):427.
268. Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell.* 2010;140(6):771–6.
269. Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, et al. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2016 [cited 2023 Mar 26];2016 Available from: /pmc/articles/PMC5075620/. doi:10.1155/2016/5276130.
270. Giuliani C, Bucci I, Napolitano G. The Role of the Transcription Factor Nuclear Factor-kappa B in Thyroid Autoimmunity and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9(AUG):471.
271. Lawrence T, Fong C. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(4):519–23.
272. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-κB puzzle. *Cell* [Internet]. 2002 [cited 2023 Mar 27];109(2 SUPPL. 1) Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11983155/>. doi:10.1016/S0092-8674(02)00703-1.
273. CHENG YJ, TIAN XL, ZENG YZ, et al. Esculetin protects against early sepsis via attenuating inflammation by inhibiting NF-κB and STAT1/STAT3 signaling. *Chin J Nat Med.* 2021;19(6):432–41.
274. Hong SH, Jeong HK, Han MH, Park C, Choi YH. Esculetin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators and cytokines by inhibiting nuclear factor-κB translocation in RAW 264.7 macrophages. *Mol Med Rep.* 2014;10(6):3241–6.
275. Jayakumar T, Huang CJ, Yen TL, et al. Activation of Nrf2 by Esculetin Mitigates Inflammatory Responses through Suppression of NF-κB Signaling Cascade in RAW 264.7 Cells. *Molecules* [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 27];27(16) Available from: /pmc/articles/PMC9412493/. doi:10.3390/MOLECULES27165143.

276. Jeong NH, Yang EJ, Jin M, et al. Esculetin from *Fraxinus rhynchophylla* attenuates atopic skin inflammation by inhibiting the expression of inflammatory cytokines. *Int Immunopharmacol.* 2018;59:209–16.
277. Riches DWH, Chan ED, Winston BW. TNF- α -induced regulation and signalling in macrophages. *Immunobiology.* 1996;195(4–5):477–90.
278. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* 2009;29(6):313.
279. Kim Y, Park Y, Namkoong S, Lee J. Esculetin inhibits the inflammatory response by inducing heme oxygenase-1 in cocultured macrophages and adipocytes. *Food Funct.* 2014;5(9):2371–7.
280. Zhu L, Nang C, Luo F, et al. Esculetin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammatory processes and depressive-like behavior in mice. *Physiol Behav.* 2016;163:184–92.
281. Wan M, Tang X, Stsiapanava A, Haeggström JZ. Biosynthesis of leukotriene B₄. *Semin Immunol.* 2017;33:3–15.
282. Ramachandran R, Bhatt DK, Ploug KB, et al. Nitric oxide synthase, calcitonin gene-related peptide and NK-1 receptor mechanisms are involved in GTN-induced neuronal activation. *Cephalalgia.* 2014;34(2):136–47.
283. Greco R, Gasperi V, Sandrini G, et al. Alterations of the endocannabinoid system in an animal model of migraine: evaluation in cerebral areas of rat. *Cephalalgia.* 2010;30(3):296–302.
284. Mohammadi Vosough E, Baradaran Rahimi V, Masoud SA, et al. Evaluation of protective effects of non-selective cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 against the nitroglycerine-induced acute and chronic animal models of migraine: A mechanistic study. *Life Sci.* 2019;232:116670.
285. Kilinc E, Tore F, Dagistan Y, Bugdayci G. Thymoquinone Inhibits Neurogenic Inflammation Underlying Migraine Through Modulation of Calcitonin Gene-Related Peptide Release and Stabilization of Meningeal Mast Cells in Glyceryltrinitrate-Induced Migraine Model in Rats. *Inflammation.* 2020;43(1):264–73.
286. Oshinsky ML, Sanghvi MM, Maxwell CR, et al. Spontaneous trigeminal allodynia in rats: a model of primary headache. *Headache.* 2012;52(9):1336–49.

287. Christensen SL, Rasmussen RH, Ernstsén C, et al. CGRP-dependent signalling pathways involved in mouse models of GTN- cilostazol- and levromakalim-induced migraine. *Cephalalgia*. 2021;41(14):1413–26.
288. Bates EA, Nikai T, Brennan KC, et al. Sumatriptan alleviates nitroglycerin-induced mechanical and thermal allodynia in mice. *Cephalalgia*. 2010;30(2):170–8.
289. Bree D, Levy D. Intact mast cell content during mild head injury is required for development of latent pain sensitization: implications for mechanisms underlying post-traumatic headache. *Pain*. 2019;160(5):1050–8.
290. Strecker T, Dux M, Messlinger K. Nitric Oxide Releases Calcitonin-Gen-Related Peptide from Rat Dura mater Encephali Promoting Increases in Meningeal Blood Flow. *J Vasc Res*. 2002;39(6):489–96.
291. Citak A, Kilinc E, Torun IE, Ankarali S, Dagistan Y, Yoldas H. The effects of certain TRP channels and voltage-gated KCNQ/Kv7 channel opener retigabine on calcitonin gene-related peptide release in the trigeminovascular system. *Cephalalgia*. 2022;42(13):1375–86.
292. Labastida-Ramírez A, Rubio-Beltrán E, Haanes KA, et al. Lasmiditan inhibits calcitonin gene-related peptide release in the rodent trigeminovascular system. *Pain*. 2020;161(5):1092–9.
293. Kilinc E, Ankarali S, Torun IE, Dagistan Y. Receptor mechanisms mediating the anti-neuroinflammatory effects of endocannabinoid system modulation in a rat model of migraine. *European Journal of Neuroscience*. 2022;55(4):1015–31.
294. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol*. 1990;28(2):183–7.
295. Fusayasu E, Kowa H, Takeshima T, Nakaso K, Nakashima K. Increased plasma substance P and CGRP levels, and high ACE activity in migraineurs during headache-free periods. *Pain*. 2007;128(3):209–14.
296. Frederiksen SD, Bekker-Nielsen Dunbar M, Snoer AH, Deen M, Edvinsson L. Serotonin and Neuropeptides in Blood From Episodic and Chronic Migraine and Cluster Headache Patients in Case-Control and Case-Crossover Settings: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Headache*. 2020;60(6):1132–64.

297. Gallai V, Sarchielli P, Floridi A, et al. Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally. *Cephalalgia*. 1995;15(5):384–90.
298. Greco R, Demartini C, Zanaboni AM, Tassorelli C. Chronic and intermittent administration of systemic nitroglycerin in the rat induces an increase in the gene expression of CGRP in central areas: potential contribution to pain processing. *J Headache Pain* [Internet]. 2018 [cited 2023 Sep 6];19(1) Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30003352/>. doi:10.1186/S10194-018-0879-6.
299. Levy D, Burstein R, Kainz V, Jakubowski M, Strassman AM. Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache. *Pain*. 2007;130(1–2):166–76.
300. Al-Hassany L, Goadsby PJ, Danser AHJ, MaassenVanDenBrink A. Calcitonin gene-related peptide-targeting drugs for migraine: how pharmacology might inform treatment decisions. *Lancet Neurol*. 2022;21(3):284–94.
301. Altamura C, Brunelli N, Marcosano M, Fofi L, Vernieri F. Gepants - a long way to cure: a narrative review. *Neurol Sci*. 2022;43(9):5697–708.
302. Offenhauser N, Zinck T, Hoffmann J, et al. CGRP release and c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis of the rat following glyceryltrinitrate infusion. *Cephalalgia*. 2005;25(3):225–36.
303. Vámos E, Fejes A, Koch J, et al. Kynurenate derivative attenuates the nitroglycerin-induced CamKII α and CGRP expression changes. *Headache*. 2010;50(5):834–43.
304. Pedersen SH, Ramachandran R, Amrutkar DV, Petersen S, Olesen J, Jansen-Olesen I. Mechanisms of glyceryl trinitrate provoked mast cell degranulation. *Cephalalgia*. 2015;35(14):1287–97.
305. Singh L, Kaur A, Garg S, Singh AP, Bhatti R. Protective Effect of Esculetin, Natural Coumarin in Mice Model of Fibromyalgia: Targeting Pro-Inflammatory Cytokines and MAO-A. *Neurochem Res*. 2020;45(10):2364–74.
306. Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia*. 2002;22(1):54–61.
307. Theoharides TC, Donelan J, Kandere-Grzybowska K, Konstantinidou A. The role of mast cells in migraine pathophysiology. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005;49(1):65–76.

308. Jain NK, Kulkarni SK, Singh A. Role of cysteinyl leukotrienes in nociceptive and inflammatory conditions in experimental animals. *Eur J Pharmacol.* 2001;423(1):85–92.
309. Noguchi K, Okubo M. Leukotrienes in nociceptive pathway and neuropathic/inflammatory pain. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(8):1163–9.
310. Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Noguchi K. Leukotriene synthases and the receptors induced by peripheral nerve injury in the spinal cord contribute to the generation of neuropathic pain. *Glia.* 2010;58(5):599–610.
311. Levine JD, Lau W, Kwiat G, Goetzl EJ. Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. *Science.* 1984;225(4663):743–5.
312. Wu KC, Chen YH, Cheng KS, et al. Suppression of voltage-gated Na(+) channels and neuronal excitability by imperatorin. *Eur J Pharmacol.* 2013;721(1–3):49–55.
313. Skalicka-Woźniak K, Orhan IE, Cordell GA, Nabavi SM, Budzyńska B. Implication of coumarins towards central nervous system disorders. *Pharmacol Res.* 2016;103:188–203.
314. Singhuber J, Baburin I, Ecker GF, Kopp B, Hering S. Insights into structure-activity relationship of GABAA receptor modulating coumarins and furanocoumarins. *Eur J Pharmacol.* 2011;668(1–2):57–64.
315. Yan J, Dussor G. Ion Channels and Migraine. *Headache: The Journal of Head and Face Pain.* 2014;54(4):619–39.
316. Gregory D. Meningeal Afferent Ion Channels and their Role in Migraine. *Neurobiological Basis of Migraine.* 2017;49–68.