



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EX-VİVO SIÇAN MENİNGEAL PREPARASYONLARINDA GEÇİCİ
RESEPTÖR POTANSİYEL KANALLARININ KALSİTONİN GEN-
İLİŞKİLİ PEPTİD SALINIMI ÜZERİNE ETKİLERİ VE
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Arzu ÇITAK

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mart 2018

BOLU



T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EX-VİVO SIÇAN MENİNGEAL PREPARASYONLARINDA GEÇİCİ
RESEPTÖR POTANSİYEL KANALLARININ KALSİTONİN GEN-
İLİŞKİLİ PEPTİD SALINIMI ÜZERİNE ETKİLERİ VE
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Arzu ÇITAK

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Ü. Erkan KILINÇ

Mart 2018

BOLU

Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

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

Dr. Öğr. Ü. Erkan KILINÇ*

(imza)

(Fizyoloji, AİBÜ)

Prof. Dr. Şerif DEMİR

(imza)

(Fizyoloji, Düzce Üniversitesi)

Dr. Öğr. Ü. Ayhan ÇETİNKAYA

(imza)

(Fizyoloji, AİBÜ)

...../...../2018

Bu tez ile AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Arzu ÇITAK'ın Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Erol AYAZ

(imza)

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

* Jüri Başkanı ve Tez Danışmanı

ÖZET

Ex-vivo sıçan meningeal preparasyonlarında geçici reseptör potansiyel kanallarının kalsitonin gen-ilişkili peptid salınımı üzerine etkileri ve mekanizmalarının araştırılması

Migren kısıtlayıcı etkileri olan bir nörovasküler hastalıktır. Dura mater migren baş ağrısının kaynaklandığı yer olarak kabul edilmektedir. Dural trigeminal duysal sinirlerin periferik uçlarından salınan CGRP nörojenik inflamasyona yol açarak migren patofizyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Dural afferentlerde bulunan geçici reseptör potansiyel (TRP) ve voltaja duyarlı potasyum (K^+) kanalları bu sinirlerin uyarılma eşiğini ve bunun sonucunda CGRP salınımını modüle ederek migren ağrısında fizyolojik bir görev üstlenebilir. Sunulan çalışmada, ex-vivo sıçan meningeal preparasyonlarında TRPV1, TRPV4, TRPA1, TRPM8 ve K^+ kanallarının CGRP salınımı üzerine etkileri ve mekanizmaları araştırılmıştır.

39 erişkin wistar erkek sıçan (78 hemiskull) 13 gruba bölündü (n=6 hemiskull). Ex-vivo meningeal hemiskull preparasyonları hazırlandı. Farklı gruplardaki bu preparasyonlara, TRPV1 (1 μ M,kapsaisin), TRPV4 (100 μ M,4 α PDD), TRPA1 (300 μ M,Cinnamaldehyde) ve TRPM8 (300, μ M Mentol) agonistleri ve antagonistleri (10 μ M kapsazepin, 10 μ M GSK-2193874, 50 μ M HC-030031 ve 10 μ M AMTB) ve K^+ kanal açıcı (10 μ M,Retigabine) uygulandı. Süperfüzatlardaki CGRP içeriği ELISA ile ölçüldü. Veriler paired t-testi ile analiz edildi.

TRPV1, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8 agonistleri meningeal preparasyonlarda CGRP salınımını anlamlı tetiklerken(P<0.05) bu etkiler antagonistleri olan kapsazepin, GSK-2193874, HC-030031 ve AMTB tarafından önledi. Ayrıca K^+ kanal açıcı Retigabine meningeal preparasyonlardaki bazal CGRP salınımını anlamlı azalttı(P<0.05) ve TRPV1, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8 reseptör agonistlerinin yol açtığı CGRP salınımını önledi.

Bulgularımız TRPV1, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8 kanallarının migren baş ağrısının fizyolojisindeki fonksiyonel işlevlerini ve K^+ kanallarının nosiseptif ateşlemeyi kontrol etmede önemli fizyolojik görevleri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Farmakolojik olarak uygun TRP reseptör antagonistleri ve K^+ kanal açıcılarının geliştirilmesi ileride migren tedavisinde yeni ve alternatif terapötik yaklaşımlar arasında yer alabilir.

Anahtar Kelimeler: Migren, dura mater, CGRP, TRP kanalları, K^+ kanal açıcı.

ABSTRACT

Investigation of effects and mechanisms of transient receptor potential channels on calcitonin gene-related peptide release in *ex-vivo* rat meningeal preparations

Migraine is a disabling neurovascular disease. Dura mater is regarded as origin of migraine. CGRP released from peripheral terminals of dural trigeminal sensory nerves plays key role in migraine pathophysiology by causing neurogenic inflammation. Transient-receptor-potential (TRP) and voltage-gated potassium (K^+) channels in dural afferents may have physiologic roles in migraine by modulating excitation threshold of the nerves and ultimately CGRP release. We investigated effects and mechanisms of TRPV1, TRPV4, TRPA1, TRPM8 and K^+ channels on CGRP release in *ex-vivo* rat meningeal preparations.

39 adult wistar male rats were divided into 13 groups (n=6 hemiskull). *Ex-vivo* hemisected meningeal preparations were made. Preparations were treated with TRPV1 (1 μ M, capsaicin), TRPV4 (100 μ M, 4 α PDD), TRPA1 (300 μ M, Cinnamaldehyde) and TRPM8 (300 μ M, Menthol) agonists and antagonists (10 μ M capsaizipine, 10 μ M GSK-2193874, 50 μ M HC-030031 and 10 μ M AMTB) and K^+ channel opener (10 μ M, Retigabine). CGRP contents in superfusates were measured using ELISA. Data were analyzed with paired t-test.

While agonists; TRPV1, TRPV4, TRPA1 and TRPM8 induced significantly CGRP release ($P < 0.05$), these effects were prevented by antagonists capsaizipine, GSK-2193874, HC-030031 and AMTB, respectively in meningeal preparations. K^+ channel opener, Retigabine alone decreased basal CGRP release ($P < 0.05$), and it prevented CGRP release induced by TRPV1, TRPV4, TRPA1 and TRPM8 receptors in meningeal preparations.

Results revealed that TRPV1, TRPV4, TRPA1 and TRPM8 channels have physiologic roles for migraine and K^+ channel opener has important roles to controlling nociceptive firing in migraine. Development of pharmacologic TRP receptor antagonists and K^+ channel openers may be one of novel and alternative therapeutic approaches in migraine treatment, in the future.

Keywords: Migraine, dura mater, CGRP, TRP channels, K^+ channel opener.

TEŞEKKÜRLER

Yüksek Lisans yapmama olanak sağlayan, öğrenimim boyunca tezimin planlanması, yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesi sürecinde yardımlarını esirgemeyen, eğitimim ve tez çalışmam süresince değerli bilgileriyle yoluma ışık tutan; her zaman desteğini gördüğüm, ayrıca kendisinden bilime ve hayata dair çok şey öğrendiğim, kendisi tarafından yetiştirilmekten gurur duyduğum çok değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Erkan KILINÇ' a çok teşekkür ederim.

Bugüne kadar benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bana olan inançlarını asla yitirmeyen, başarımda büyük paya sahip olan, sevgili annem Makbule ÇITAK'a ve babam Hulusi ÇITAK'a çok teşekkür ederim.

Beni her koşulda destekleyen, koruyup kollayan, varlığına şükrettiğim biricik kardeşim Osman Alper ÇITAK'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli amirim Spor Genel Müdür Yardımcısı Murat KOCAKAYA'ya çok teşekkür ederim.

Tezimin tamamlanma süresince psikolojik destek ve yardımlarını gördüğüm sevgili arkadaşlarım Gözde Damla ERTUĞRUL'a, Gülay YERLİ'e, Yeliz KÖRPE'ye, Işıl DOĞAN ÖNAL'a ve diğer çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER.....	vi
RESİMLER.....	vii
GRAFİKLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Migren.....	7
2.2. Migren patofizyolojisi.....	8
2.3. Kalsitonin gen-ilişkili peptid ve migren patofizyolojisindeki rolü.....	11
2.4. Dura mater	21
2.5. Dural afferentler.....	21
2.5.1. Dural afferentlerde bulunan iyon kanalları.....	23
2.6. TRP kanalları ve ağrı	27
2.7. Voltaj bağımlı potasyum kanalları.....	39
2.7.1. Voltaj bağımlı potasyum kanal açıcıları ve migren	40
2.8. Mevcut migren tedavileri.....	40
2.8.1. Migren tedavisinde yeni hedefler	41
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	45
3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler.....	45
3.2. Deney grupları ve uygulanan işlemler	45
3.2.1. Agonist gruplar	45
3.2.2. Antagonist gruplar	47
3.2.3. Retigabine grupları	49
3.3. Ex vivo çalışmalar için yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) hazırlanması. 51	
3.4. Sıçanlardan hemi kranyum (hemi skull) preparatlarının hazırlanması ve CGRP ölçümü için meningeal sıvı örneklerinin elde edilmesi.....	51
3.5. Meningeal sıvı örneklerindeki CGRP düzeylerinin ölçümü.....	55

3.6. Reaktiflerin hazırlanması	55
3.7. Uygulanan deney prosedürü	56
3.8. İstatistiksel analiz.....	57
4. BULGULAR	58
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
7. KAYNAKLAR	72
8. EKLER.....	87
9. ÖZGEÇMİŞ	89



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1. Meningeal trigeminal sinir terminallerinde nosisepsiyonun modülasyonunda TRP ve K ⁺ v kanallarının olası rolü.	5
2.1. Üç alt birimden oluşan CGRP reseptör kompleksi	14
2.2. CGRP aracılı vazodilatasyonun mekanizmaları	16
2.3. Migren ağrısının oluşmasındaki nosiseptif süreçlerde rol oynayan kranyal dura mater, trigeminal gangliyon ve spinal trigeminal çekirdekteki olayların şematik gösterimi.	17
2.4. Trigeminovasküler sistem.	20
2.5. Memeli duyu nöronları üzerindeki çeşitli nosiseptif geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanallarının spesifik aktivatörlerini ve modülatörlerini gösteren şema.	29
2.6. CGRP salınımının veya CGRP reseptör aktivasyonunun modülasyonu açısından antimigren ilaçların muhtemel etki mekanizmalarının şematik gösterimi.	34
2.7. Dura mater' deki TRPM8 aktivasyonunun pronosiseptif veya antinosiseptif olabileceğinin şematik gösterimi.	38

RESİMLER

Resim	Sayfa
3.1. Kranyumun sagittal düzlem boyunca ikiye bölünmesi.	52
3.2. Sağlam dura mater ve trigeminal gangliyona sahip hemi skull (hemi kranyum).	52
3.3. Hemi skull' un plastik küvette sürekli oksijenlendirilen yBOS ile yer çekimi hızında süperfüzyonu.	54
3.4. Hemi skull'ların içinde vazelin bulunan petri kaplarına fıkse edilip ilgili agonist veya antagonistlerle inkübe edilmesi.	54

GRAFİKLER

Grafik	Sayfa
4.1. TRPV1 reseptörleri ve K^+v kanal açıcısının meningeal preparasyonlarda trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımı üzerine etkileri.	58
4.2. K^+v kanal açıcısının meningeal preparasyonlarda trigeminal sinir uçlarından bazal CGRP salınımı üzerine etkisi.	59
4.3. TRPA1 reseptörleri ve K^+v kanal açıcısının meningeal preparasyonlarda trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımı üzerine etkileri.	60
4.4. TRPM8 reseptörleri ve K^+v kanal açıcısının meningeal preparasyonlarda trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımı üzerine etkileri.	61
4.5. TRPV4 reseptörleri ve K^+v kanal açıcısının meningeal preparasyonlarda trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımı üzerine etkileri.	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

4-AP: 4-aminopiridin

4 α PDD: 4 α -Phorbol 12,13-didecanoate

5-HT: Serotonin

α -DTX: α -dendrotoksin

AH: Anterior hipotalamik

AMPA: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoazolpropiyonik asit

ASIC: Asit algılayan iyon kanalları

BDNF: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör

BK: Bradikinin

cAMP: Siklik adenosin monofosfat

CCl: Kemokin ligandları

CGRP: Kalsitonin gen ilişkili peptit

CLR: Reseptör benzeri reseptör

CNP: C-tipi natriüretik peptid

CRF: Kortikotropin salıcı faktör

CRLR: Kalsitonin reseptörü benzeri reseptör

DRG: Dorsal kök ganglionu

eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz

GFR: Büyüme faktörü reseptörü

GPCR: G protein-kenetli reseptör

HMGB1: High-mobility grup box-1

IHS: uluslararası baş ağrısı derneği

IL: İnterlökinler

IL-6: İnterlökin-6

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

Kv⁺: Voltaj bağımlı potasyum kanalı

KYD: Kortikal yayılan depresyon

LH: Lateral hipotalamik (LH)

LM: Lipid araçları

LPA: Lisofosfatidik asit

LPO: Lateral preoptik nükleus

LTB4: Lökotrien B4

MMA: Orta meningeal arter

NGF: Sinir büyüme faktörü

NMDA: N-metil-D-aspartat

nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz (NOS)

NSAID: Steroidal olmayan anti inflamatuvar ilaçlar

P38 MAPK: P38 mitojenle aktive protein kinaz

PB: Parabraşiyal bölge

PeF: Periferik hipotalamik alanlar

Pf: Parafasiküler

PG: Prostaglandin

PKA: Protein kinaz A

PKC: Protein kinaz C

Po: Posterior

PTHrP: Paratiroid hormonu ile ilgili peptid

RAMP: Aktivite değiştirici proteinler

RNS: Reaktif azot türleri

ROS: Reaktif oksijen türleri

SP: P-Maddesi

SpVC: Spinal trigeminal çekirdek

Src: Src-tipi protein kinaz

TEA: Tetraetilamonyum

TNC: Trigeminal nükleus kaudalis

TRG: Trigeminal gangliyon

TRP: Geçici reseptör potansiyel

TRPA: Geçici reseptör potansiyel ankyrin

TRPC: Geçici reseptör potansiyel canonical

TRPM: Geçici reseptör potansiyel melastatin

TRPML: Geçici reseptör potansiyel mucolipin

TRPP: Geçici reseptör potansiyel polycystin

TRPV: Geçici reseptör potansiyel vanilloid

VPM: Ventral posteromedial

1. GİRİŞ

Kalsitonin gen ilişkili peptit (CGRP) sinir sisteminde büyük oranda sentezlenen 37 amino asitli bilinen en güçlü endojen vazodilatör bir nöropeptittir. İnsanlarda CGRP' nin α -CGRP ve β -CGRP olmak üzere iki izoformu vardır ve bu izoformlar benzer biyolojik etkilere sahiptir. Ancak α -CGRP vücut boyunca primer afferent sinir liflerinde bulunurken β -CGRP ekspresyonu başlıca enterik sinir sistemi ile sınırlıdır. İnsanda trigeminal gangliyon nöronlarının % 40' ı CGRP pozitifdir (1). CGRP etkilerini CGRP1 ve CGRP2 olmak üzere iki reseptörü üzerinden göstermektedir. Bu reseptörler G-protein kenetli reseptörler olup adenil siklaz enzimini aktive ederek hücre içi cAMP oluşumuna yol açarlar. CGRP kraniyal arterlerin beyin sapına uzanan perivasküler afferentlerinde bulunmaktadır. Trigeminal liflerin periferik ve merkezi terminallerinin uyarılması bu sinir uçlarından CGRP salınımına yol açar. Salınan CGRP kranyal kan damarlarını dilate eder ve duysal iletimi uyarır (2). Meningeal ve serebral damarlar başlıca CGRP içeren duysal sinirler ile innerve edilmiştir (3). Trigeminal meningeal duysal liflerin aktivasyonu sonucu salınan CGRP, dura materde bulunan mast hücrelerini degranüle ederek migren patofizyolojisinde rolü olan nörojenik inflamasyon oluşumuna katkıda bulunmaktadır (4).

Migren dünya genelindeki nüfusun yaklaşık % 15' inde görülen kompleks nörovasküler bir primer baş ağrısı hastalığıdır (5). Tek taraflı, zonklayıcı baş ağrısı, ışık ve sese aşırı duyarlılık, mide bulantısı ve kusma gibi semptomlarla karakterize olan migrenin patofizyolojisi hala tam olarak anlaşılamamıştır. Migren patofizyoloji hakkında çok sayıda teori ileri sürülmüştür ancak bunların ortak noktası migren atağı sırasında trigeminovasküler sistemin aktivasyonu ve bu aktivasyonu takiben CGRP salınımı ile serebral ve meningeal damarlarda vazodilatasyon ve nosisepsiyonun ortaya çıkmasıdır. Trigeminal duysal sinirlerin merkezi ve periferik dallarından CGRP salındığı ve CGRP' nin vazodilatör ve nosiseptif etkilerinin migren patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir (5, 2). Meninksler baş ağrılarının orijinlendiği (oluşumundan sorumlu tutulan) en önemli yapılardan biridir ve trigeminal sinirler tarafından innerve edilmiştir (6). Beyin parankiminde nosiseptörler bulunmamaktadır

ve baş ağrısının dura mater, dural ve serebral damarları innerve eden trigeminal duysal sinirlerin uyarılmasıyla başladığı kabul edilmektedir (7).

CGRP migren baş ağrısında nosisepsiyonun iletilmesini sağlayan trigeminoservikal kompleks yolağındaki nosiseptif iletimde önemli bir rol oynamaktadır (7,8). Yapılan çalışmalar, migren baş ağrısı fazında eksternal jugular vende CGRP seviyelerinin yükseldiğini ortaya çıkarmıştır (9). Artmış CGRP, migren ataklarına yol açan nörovasküler yolağı tetikleyerek, tipik zonklayıcı migren ağrısına yol açan, meningeal ve ekstrakraniyal damarlarda nörojenik inflamasyona ve vazodilatasyona neden olmaktadır. Ayrıca CGRP dura materdeki mast hücrelerini degranüle ederek mast hücrelerinden perivasküler boşluğa ağrıyı ve inflamasyonu tetikleyen mediyatörlerin salınımına yol açarak migren patofizyolojisinde dolaylı bir role de sahiptir (4,10). Akut migren atakları sırasında kraniyal dolaşımda CGRP miktarının arttığı ve triptan (migren tedavisinde kullanılan ilaç) uygulamasından sonra bunun normal seviyelerine döndüğü bildirilmiştir (11). Ayrıca intravenöz CGRP infüzyonunun da migrenli hastalarda baş ağrısına yol açtığı ve bunu takiben triptan uygulamasının ise CGRP seviyelerini normal düzeylerine döndürdüğü bilinmektedir (11). CGRP, akut migren atağı sırasında salınan şu anda güvenilebilir tek nörotransmitter olarak kabul edilmekte ve bu sebeple periferik kanda CGRP artışı, bir migren biyomarkörü olarak kabul edilmektedir (7,12,13).

Migren tedavisinde halen kullanılmakta olan triptanlar 5-HT_{1B}/1D/1F reseptör agonistleridir. Trigeminal gangliyon/duysal sinirler bol miktarda 5-HT_{1B}/1D reseptörleri ekprese etmektedir. Migren tedavisinde kullanılan triptanlardan sumatriptan dilate olmuş kraniyal arterleri 5-HT_{1B} reseptörleri aracılığıyla konstrikte ederken 5-HT_{1D} reseptörleri aracılığıyla trigeminal duysal sinirlerin periferik ve merkezi uçlarında CGRP salınımını ve nosiseptif iletimi bloke etmektedir (14). Ancak gün geçtikçe trigeminal duysal sinir terminallerinden CGRP salınımını tetikleyen veya bloke eden farklı mekanizmalar ortaya çıkarılmaktadır.

CGRP salınımını modüle eden fizyolojik mekanizmalardan biri de geçici reseptör potansiyel (transient receptor potential, TRP) iyon kanallarıdır. TRP kanalları membran iyon kanallarının geniş bir ailesi olup çeşitli endojen ve ekzojen uyarılara cevap verirler. Mediyatörler, ısı, ekstrasellüler ozmolarite ve pH değişiklikleri gibi iç

uyaranlar ve şili biberi gibi birçok doğal ürünlerden oluşan dış uyaranlara cevap verebilen bu iyon kanalları vücutta çeşitli ağrı durumları ile ilişkilidir. TRP kanallarının TRPC (kanonikal), TRPM (melastatin), TRPV(vanilloid), TRPA (ankirin), TRPP (polisistin) ve TRPML (mukolipin) olmak üzere 6 alt ailesi vardır. TRP kanalları non-selektif iyon kanallarıdır, hücre içine Na^+ ve Ca^{+2} girişine yol açarak membran depolarizasyonuna ve hücre içi ikinci haberci sinyal kaskadının aktivasyonuna katkıda bulunurlar. Görme, tat, işitme ve somatoduysal sistemlerde (ağrılı uyaranlar vb) bu duyuların algılanmasında önemli rolleri vardır. Bu fizyolojik fonksiyonlarının yanında baş ağrıların patofizyolojisinde TRP kanallarının rolü olduğuna dair kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır (15). TRP kanalları dural afferentlerin CGRP sentezleyen alt gruplarında ekspresse edilmektedir. TRP kanallarının aktivasyonu nosiseptif afferent liflerin eksitasyonunu güçlendirmektedir ve ağrıya yol açmaktadır. Duysal sinir terminallerinden CGRP ekzositoz ile salınmaktadır ve ekzositoz için membranın depolarize olması gerekmektedir. TRP kanalları hücre içine Na^+ ve Ca^{2+} girişine yol açarak membranın depolarizasyon süresini uzattığından dolayı bu kanalların aktivasyonu CGRP salınımına yol açabilir ve blokasyonu ise CGRP ekzositozunu önleyerek migren tedavisinde yeni bir seçenek olabilir.

TRP kanallarının çok sayıda alt tipi bulunmasına rağmen yapılan çalışmalar TRPV1, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8' in migren patofizyolojisinde rolü olabileceğini önermişlerdir (15). TRPV1 kanalı zararlı ısı ve şili biberinin acı ve yakıcı tadından sorumlu olan kapsaisin ile aktive edilmekte ve ağrılı yangı duyusuna neden olmaktadır. TRPV1 kanalı endojen moleküllerden anandamid, N-araşidonoil dopamin (NADA) ve lipoksijenaz yolağının çeşitli lipid ürünleri tarafından aktive edilmektedir (16). TRPV1 nosiseptif sinir liflerinin periferik ve merkezi terminallerinde ağrı geçişinin aktivasyonunu ve duyarlılığını güçlendirmektedir (17). Dural sinir liflerinde ve trigeminal gangliyondaki nöron gövdelerinde TRPV1 kanallarının olduğu gösterilmiştir. TRPV1 aktivasyonunun dural damarları dilate edebileceği ve ayrıca rat dura materine kapsaisin uygulamasının baş ağrısı ile uyumlu olarak trigeminal gangliyon nöronlarında ERK (ekstrasellüler sinyal ile düzenlenmiş kinaz) aktivasyonu ve davranışsal cevaplar oluşturduğu bildirilmiştir (18,19).

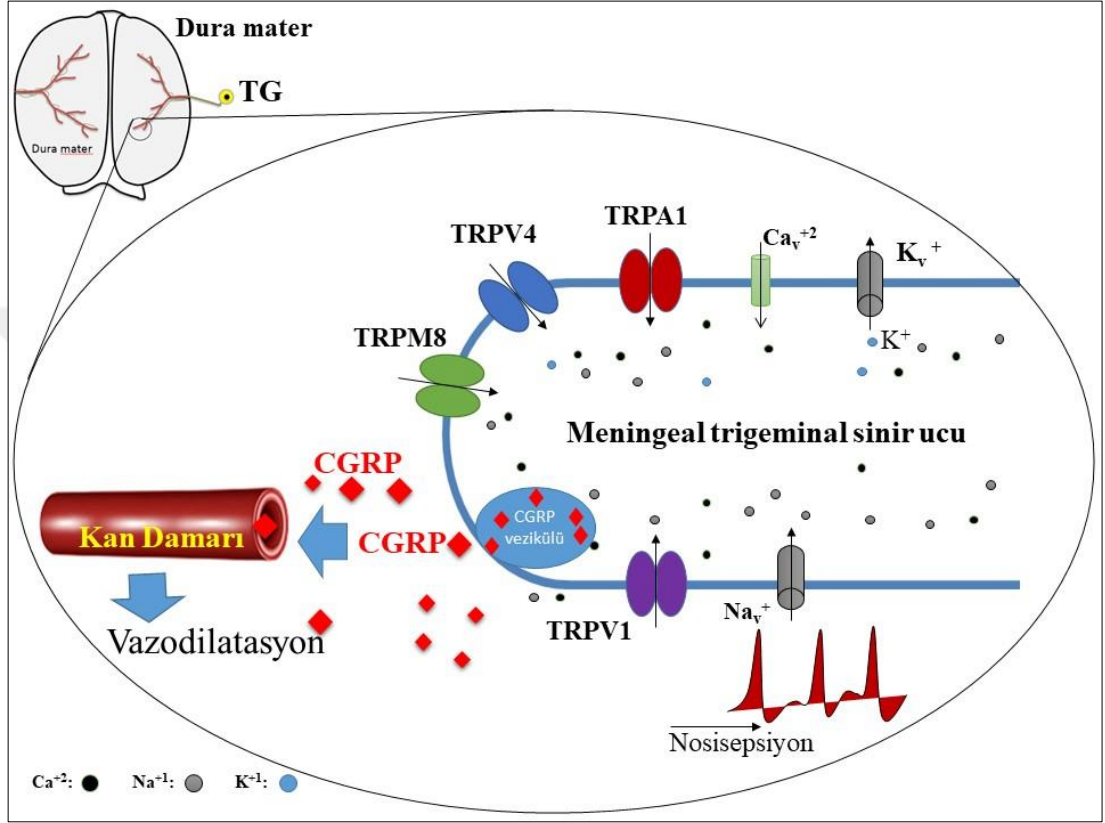
Dural afferent sinir liflerinde sentezlenen diğ er bir TRP kanalı olan TRPM8' in (transient receptor potential melastatin 8) migren hastalarında gen varyasyonları bulunmuştur ve migren patofizyolojisi ile ilişkili olduğı öne sürölmüştür (20). Ancak TRPM8' in migren baş ağrısı ile ilişkili dural afferentler üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir.

Migren ile ilişkili olduğı düşünölen en ilgi çekici TRP kanallarından biri olan TRPA1 (transient receptor potential ankyrin1) periferik duysal nöronlarda (dural trigemeninal afferentlerde) ve primer afferent liflerin merkezi terminallerinde bulunmaktadır. TRPA1 çok sayıda ekzojen ve endojen madde tarafından aktive edilmektedir, bunlar arasında çevresel iritanlar; formaldehit, akrolin, sigara dumanı, doğ al ürünler; izotiyosiyanatlar, sinnamaldehit, allisin ve endojen oksidatif ve nitratif stres ürünleri nitro-oleik asit, hidroksi nonenal ve reaktif prostaglandinler (16,21) bulunmaktadır ki bu ürünler aynı zamanda baş ağrısına da yol açmaktadır. TRPA1 kanallarının baş ağrıların ın patofizyolojisindeki rolüne dair gittikçe artan kanıtlar mevcuttur. Meningeal afferentler üzerindeki TRPA1 kanalları aktivasyonunun nörojenik vazodilatasyona ve baş ağrılarına katkıda bulunabileceğı bildirilmiştir (21).

TRP kanallarından TRPV4 ise mekanik uyarı ve ekstrasellöler ozmolaritedeki değışikliklerle aktive olmaktadır. Dural afferentler mekonosensitifdir (22) ve mekanik uyarılmanın trigeminal dural afferentlerde bulunan TRPV4 kanalı aracılığı ile olduğına dair çalışmalar mevcuttur (23). Migrendeki zonklayıcı tipteki ağrının bu sinirlerdeki TRPV4 kanallarının öksürme ve hareket etme sonucu mekanik olarak uyarılmasından kaynaklanabileceğı iddia edilmektedir (15). Farklı bir çalışmada hipotonik solösyonlar ve TRPV4 aktivatörü 4- PDD dural afferentlerde TRPV4 benzeri akımlar oluşturmuş ve ayrıca ratlarda dural TRPV4 aktivasyonu baş ağrısı ile uyumlu olan davranışların ortaya çıkmasına yol açmıştır (24). Bu bulgulara dayanılarak TRPV4' ün migren ağrısında rolü olabileceğı öne sürölmüştür (16).

Bunların dışında voltaj bağımlı potasyum (Kv^+) kanallarının da nöronal uyarılabilirlikle ilişkili olduğı bildirilmiştir (25). Kv^+ kanalları membran potansiyelleri ve aksiyon potansiyelinin önemli fizyolojik düzenleyicileridir (25). Bu durum özellikle nosiseptif duysal nöronlarda ağrının kontrolü için önemlidir. Trigeminal sinir terminallerinde bulunan Kv^+ kanallarının açılması membran

potansiyelini aniden düşürerek CGRP gibi nöropeptitlerin ekzositoz yoluyla salınımını bloke eder. Bu nedenle voltaj bağımlı potasyum kanal açıcı moleküller nöropatik ağrının giderilmesinde büyük öneme sahiptir.



Şekil 1. Meningeal trigeminal sinir terminallerinde nosisepsiyonun modülasyonunda TRP ve K^v kanallarının olası rolü.

Bu bilgiler doğrultusunda sunulan çalışmanın hipotezi şekil 1’ de şematize edildiği gibi meninksleri (kraniyal dura mater) innerve eden trigeminal duysal sinir terminallerinde bulunan TRPV1, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8 kanallarının aktivasyonunun bu sinir terminallerinden CGRP salınımına yol açarak migren patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabileceği ve bu aktivasyonun Kv⁺ kanallarının açılması ile önlenebileceği şeklindedir. Sunulan çalışmada, bu hipotez doğrultusunda sıçanlardan elde edilen ex-vivo meningeal preparasyonlara (hemikranyumlarda) TRPV1, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8’ in agonistleri, antagonistleri ve Kv⁺-kanalı

açıcısı topikal olarak uygulanarak meninksleri innerve eden trigeminal duysal sinirlerden CGRP salınımı üzerine etkileri ve mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Migren

Migren ışık ve sese aşırı duyarlılık, mide bulantısı, kusma ve sürekli tekrarlayan, genellikle tek taraflı, zonklayıcı rutin fiziksel aktivite ile uyarılarak kötüleşen ve birkaç saat hatta birkaç gün sürebilen baş ağrısı semptomları ile kendini gösteren nörovasküler bir hastalıktır (7,26,27) Genel toplumda prevalansı yaklaşık % 15-16 olup çoğunlukla 22 ile 55 yaşları arasındaki bireylerde ortaya çıkmaktadır (28). Çoğunlukla çocukluk çağına başlamasına rağmen, özellikle ergenlik çağına, erkeklere nazaran kadınlarda 3 katı daha fazla görülmektedir (29). Güncel verilere göre kadınların % 8' i ve erkeklerin % 6' sı migrenden muzdarip olup bu oran gün geçtikçe artmaktadır (27,30).

Uluslararası Baş Ağrısı Derneği (IHS) Baş Ağrısı Sınıflandırma Komitesinin yayımladığı baş ağrısı hastalıkları için sınıflama ve teşhis kriterlerine göre yaygın ve klasik migren olarak sınıflandırılan migren, kendi içerisinde de aurasız ve auralı migren olarak iki alt gruba ayrılmaktadır (31). Bazı durumlarda, baş ağrısı herhangi bir uyarı işareti vermeden başlar ve uyku ile sonlanır (27). Baş ağrısında prodromal fazda, ışığa, sese ve kokuya anormal duyarlılık, yorgunluk, öfori, depresyon, sinirlilik, yeme isteği, kabızlık, boyun tutulması, artan esneme gibi belirtiler görülebilmektedir (27,32,33) ve baş ağrısından önce veya ağrı ile aynı anda ortaya çıkan aura fazı bazı nörolojik semptomlara aracılık etmektedir.

Migrenin aura belirtileri yavaş yavaş ortaya çıkmakta olup, uyarıcı özelliği oluşturarak daha sonra tamamen kaybolur (27). Aura belirtileri pozitif (kazanılan) veya negatif (kaybedilen) fonksiyonlar şeklinde olmaktadır. Bu fonksiyonlar eğer görsel korteksi etkilerse parlak ışık ve skotom meydana gelebilmekte, somatosensoriyel korteks etkilendiğinde ise yüzde ve ellerde karıncalanma ve hissizlik duyusu oluşabilmektedir. Bazal ganglion veya motor korteks etkilenmesine bağlı olarak titreme ve tek taraflı kas zayıflığı gözlenirken konuşma alanı etkilendiğinde ise sözcükleri söylemekte zorluk (afazi) oluşmaktadır (34). Baş ağrısı ilerledikçe mide bulantısı, kusma, burun tıkanıklığı, burun akıntısı, lakrimasyon, pitozis, esneme, sık idrara çıkma ve ishal gibi otonom belirtiler; depresyon ve sinirlilik gibi duygusal belirtiler, dikkat eksikliği, kelimeleri bulmakta zorluk, geçici amnezi, tanıdık ortamları

bulmada zorluk gibi bilişsel belirtiler ve ayrıca fotofobi, osmofobi, kas gerginliği ve kutanöz allodini gibi duyuşsal belirtiler ortaya çıkmaktadır (35-37). Migren atağını yetersiz uyku, öğün atlama, stresli yada stres sonrası dönemler, hormonal dalgalanmalar, alkol, bazı yiyecekler, ışık, gürültü, yada bazı kokular gibi stresörler tetikleyebilmektedir (27).

2.2. Migren patofizyolojisi

Migren patofizyolojisini anlamaya yönelik çalışmalar uzun yıllardır devam etmektedir, ancak patofizyoloji tam olarak anlaşılamamıştır. Şu ana kadar yapılan çalışmalar migren ağrısının çok faktörlü olduğu ve migren patofizyolojisinin tek bir mekanizma ile açıklanamayacağı sonucuna varmışlardır (26,38). Ancak migren patofizyolojisinden sorumlu olduğu öne sürülen ve en çok kabul gören yaklaşımlar; vasküler, nörovasküler (nörojenik inflamasyon) ve kortikal yayılan depresyon teorileridir (38). İlk defa 1930' ların sonunda Wolff tarafından önerilen vasküler teoriye göre (39) migrenin nöbetlerarası döneminde önce serebral vazokonstriksiyon meydana gelmekte daha sonra ise vazokonstriksiyonun yerini vazodilatasyon almaktadır, böylece vasodilatasyon sırasında perivasküler sinirlerin uyarılmasıyla da ağrı başlamaktadır (38,39).

Wolff, migren hastalarının ekstrakraniyal (temporal) arterlerinin çaplarını ölçerek bunların genişlemiş olduğunu bulmuştur. Bu hastalar ağrıyı hafifleten ve hala günümüzde de migren tedavisinde kullanılan vazokonstriktörler (ergotamin) ile tedavi edilerek bu hastalarda arteriyel dilatasyonun azalması sağlanmıştır (40). Baş ağrısı ile sonuçlanan daha sonraki olaylar tam olarak anlaşılamamış olsa da artmış vasküler pulsasyon mekanoreseptörleri aktive edebilmektedir. Bu durum sonuç olarak ağrıya ve diğer ilişkili semptomlara neden olan CGRP' nin salınımına ve perivasküler sinirlerin aktivitesinin artmasına yol açmaktadır (41,42). Karotid arteriovenöz anastomozların dilatasyonunun migren patogeneğinde rol oynadığı bulgusu doğrultusunda, kranyoselektif vazokonstriksiyon oluşturan maddelerin migren tedavisinde potansiyel bir terapötik kullanıma sahip olabileceği düşünülmektedir. Anestezi altındaki köpekler ve domuzlarda ergot alkaloidleri (ergotamin ve

dihidroergotamin) ve triptanlar (sumatriptan ve ikinci nesil triptanlar) köpek ve domuz karotid damarlarında güçlü vazokonstriksiyon oluşturmaktadır (43). Karotid arteriovenöz anastomozlar ve temporal ve orta meningeal arterleri de içine alan daha ileri çalışmalar, 5-HT_{1B} reseptörlerinin sumatriptana cevap olarak kraniyal vazokonstriksiyona aracılık ettiğini göstermiştir (44). Sumatriptan günümüzde migren tedavisinde hala etkin bir şekilde kullanılan ilaçlar arasında yerini korumaktadır.

Migrenin nörovasküler (nörojenik) teorisine göre bazı patolojik değişiklikler öncelikle nöronal aktivasyona yol açmakta daha sonra ise buna bağlı vasküler değişiklikler gelişmektedir (45). Nöronal aktivasyon, meninksler gibi ağrıya duyarlı yapılardaki damarlarda dilatasyona, bu damarların genişlemesi ise onları innerve etmiş olan trigeminal duysal sinirlerin mekanik olarak aşırı bir şekilde uyarılmasına ve bu aktivasyon sonucu trigeminal duysal sinir uçlarından salınan CGRP ve SP gibi vazoaaktif ve pronosiseptif nöropeptitlerin nörojenik inflamasyona ve ağrıya yol açmasına neden olmaktadır (46).

Moskowitz (47) daha önce, pia mater ve dura mater damarlarındaki trigeminovasküler aksonlardan ağrı ve steril inflamasyona yol açan vazoaaktif peptitlerin salındığını göstermiştir. Bu nörojenik inflamasyon sırasında, trigeminal ganglion uyarılmakta ve bu uyarım plazma protein ekstrasvazasyonuna yol açmaktadır. Nörojenik teoriye göre, migren baş ağrısına yol açan nöronal bir fonksiyon bozukluğu vasküler değişikliklere yol açmakta ve bu değişiklikler özellikle beyni çevreleyen bir membran olan dura materin inflamasyonu ile sonuçlanmaktadır. Böylece meydana gelen nörojenik dural inflamasyonun, dural kan damarlarını innerve eden primer duysal sinir terminallerinden salınan inflamatuvar nöropeptidlerin etkinliği sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Beyni çevreleyen dura mater, intrakranyal ağrıyı taşıyan afferentlerin büyük çoğunluğu tarafından innerve edilmiştir. Bununla uyumlu olarak dural stimülasyonun insanda baş ağrısına yol açtığı bildirilmiştir (45). Duysal nöronların uyarılması veya inflamasyonu, inflamasyon peptidlerinin (dural dokuda CGRP ve SP) salınımına yol açar. Bu peptidler de lokal cevap olarak nörojenik inflamasyona yol açmaktadır. Nörojenik inflamasyon, meningeal duyu liflerinin uyarılması için gerekli olan nosiseptif uyarılma eşiğini düşürmektedir (48). Migrenin nörojenik dural inflamasyon teorisine göre migren sırasında dura materden salınan inflamatuvar nöropeptidler, vasküler sistem üzerinde vazodilasyona, plazma protein

ekstravazasyonuna, endotelyal değişikliklere, platelet kümeleşmesine ve daha sonra serotonin ve diğer mediyatörlerin salınmasına, lökositlerin adezyonuna ve böylece inflamasyonun gelişmesine yol açmaktadır (49). CGRP, nörojenik inflamasyonun bu basamaklarında inflamasyonu kolaylaştırıcı bir rol oynamaktadır (50). P maddesi, NK1 reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla ekstravazasyona neden olsa da, CGRP'nin salınımı, dural kan akımını arttırarak SP' nin etkilerini arttırmakta ve normal olarak SP' yi metabolize edebilen hücre dışı enzimi inhibe etmektedir. Bu nedenle, bu iki duysal nöropeptid, ağrılı dural nörojenik inflamasyonu oluşturma konusunda birlikte hareket etmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada, migren atağı sırasında CGRP'nin kranial venöz konsantrasyonunda artışların olduğu ve migren tedavisinde kullanılan serotonerjik agonistlerin, bu artmış CGRP konsantrasyonunu normale döndürdüğü bildirilmiştir (51). Bu teori, sumatriptan gibi serotonerjik agonistlerin, meninksleri innerve eden trigeminal duysal afferent nöronlardan SP ve CGRP' nin salınmasını önleyerek migrendeki akut ağrıyı hafiflettiği yönündeki bulguları desteklemektedir.

Kortikal yayılan depresyon teorisine göre ise serebral korteks veya diğer beyin alanlarındaki bir odakta, ekstrasellüler K^+ ve glutamat artışı ve ayrıca intrasellüler Na^+ ve Ca^{+2} artışı ile karakterize olan, nöronal ve glial depolarizasyon dalgası başlamakta ve bu dalga yavaş bir şekilde tüm serebral korteks boyunca bir kaç dakika süreyle ilerlemekte ve bunu uzun süreli olarak nöronal aktivitenin baskılanması izlemektedir (52,53). Kortikal yayılan depresyonun aynı zamanda migren aurasının altında yatan nörofizyolojik etken olduğu da düşünülmektedir. Dolayısıyla aura, beyinde yavaş bir şekilde yayılan ve nöronların aktivitesini geçici olarak baskılayan elektriksel bir anormallik olarak tanımlanmaktadır (54).

İnsanda KYD' yi başlatan mekanizma tam olarak bilinmezken; stres, uykusuzluk gibi fizyolojik veya duygusal olayların, KYD' nin oluşumunda rolü olabileceği ileri sürülmüştür. KYD' de, ekstrasellüler potasyum, glutamat, ATP ve hidrojen iyonlarındaki aşırı artışın, intrasellüler sodyum ve kalsiyum seviyelerindeki artış ile bağlantısı bulunmaktadır (27,38, 55). Yapılan bir çalışmada KYD'nin oluşturduğu metabolik strese bağlı olarak, nöron hücre membranındaki Panx1 isimli iyon kanallarının açıldığı ve inflamasyonun sinyal iletim yolağını harekete geçirdiği ortaya çıkarılmıştır (54). Açılan Panx1 kanalı sayesinde nöronlardaki bazı enzimler aktiflenerek proinflamatuvar mediyatörler sınıfında yer alan *high-mobility grup box-1*

(HMGB1) ve kaspaz-1 'in ekspresyonuna yol açmakta ve stres esnasında alarm görevi gören bu moleküller, başka bir dizi molekülü beyin damarları etrafındaki sinir uçlarına doğru salgılatarak trigeminal sinirin uyarılmasını sağlamaktadır (54). Bu da meningeal vazodilatasyona ve uzun süreli baş ağrısına yol açmaktadır.

Her ne kadar migrenin bu üç teorisi farklı zamanlarda migren ağrısının altında yatan mekanizmaları açıklamak için ayrı ayrı ortaya çıkmış olsa da son zamanlardaki çalışmalar, bu üç teorinin ortak noktasının migren ağrısından esas olarak trigeminovasküler sistemin aktivasyonunun sorumlu olduğunu öne sürmektedir. Dolayısıyla trigeminovasküler sisteminin aşırı aktivasyonuna yol açan endojen ve ekzojen faktörler migren ağrısını başlatmaktadır. Bu sebeple trigeminovasküler sistemin işleyişini anlamak migren patofizyolojisini anlamak ve migren tedavisi açısından oldukça önemlidir.

2.3. Kalsitonin gen-ilişkili peptid ve migren patofizyolojisindeki rolü

Kalsitonin peptid ailesi, kalsitonin, amilin, CGRP ve adrenomedullin olmak üzere en az beş üyeden oluşmaktadır (56). CGRP 37 amino asitli vazodilatör bir nöropeptittir. İnsanlarda CGRP' nin α -CGRP ve β -CGRP olmak üzere iki izoformu vardır ve bu izoformlar benzer biyolojik etkilere sahiptir. Ancak α CGRP vücut boyunca primer afferent sinir liflerinde bulunurken β CGRP ekspresyonu başlıca enterik sinir sistemi ile sınırlıdır. CGRP' nin bağlandığı CGRP1 ve CGRP2 olmak üzere iki reseptörü vardır. Bu reseptörler G-protein kenetli reseptörler olup adenil siklaz enzimini aktive ederek hücre içi cAMP oluşumuna yol açarlar. Trigeminal meningeal duysal liflerin aktivasyonu sonucu salınan CGRP, dura materde bulunan mast hücrelerini degranüle ederek migren patofizyolojisinde rolü olan nörojenik inflamasyon oluşumuna katkıda bulunmaktadır (5).

2.3.1. CGRP dağılımı ve lokalizasyonu

CGRP, periferik ve santral sinir sistemlerinde ve kardiyovasküler sistemde yaygın olarak bulunur (57). Periferik olarak, CGRP arka boynuz hücrelerinde bol

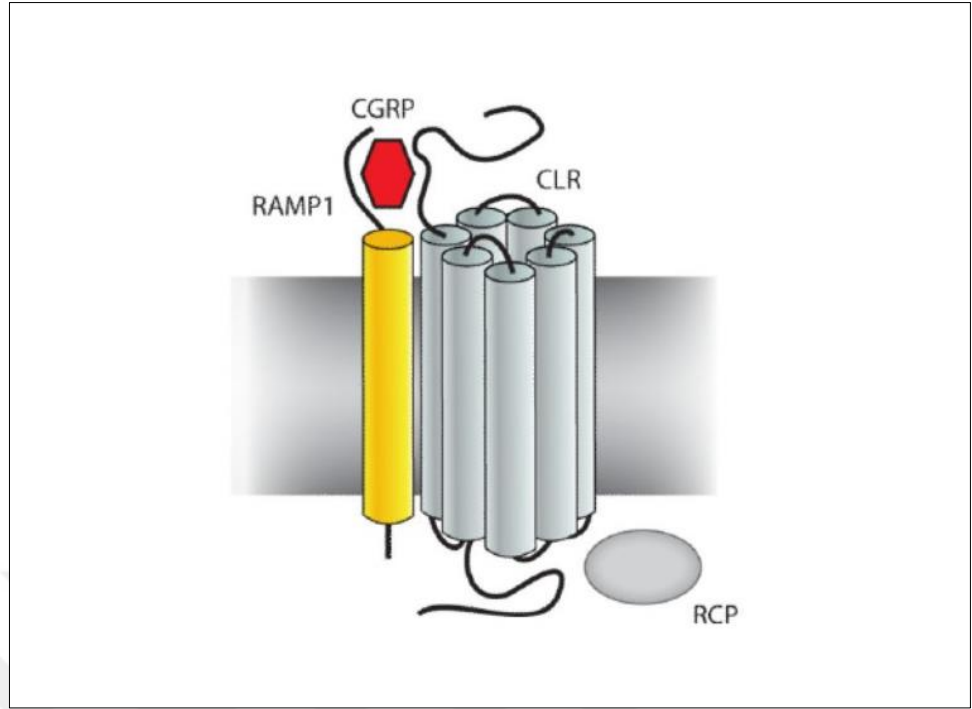
miktarda bulunur. Primer afferent nöronlarda, CGRP genellikle SP ile birlikte bulunurken, motor nöronlarda asetilkolin ile birlikte depolanmış olarak bulunmaktadır (58). Kardiyovasküler sistemde, CGRP içeren sinir lifleri arterlerin çevresinde daha çok bulunmakta ve çoğunlukla adventisya ve medyanın birleşiminde lokalize olmaktadır (57,59). Ayrıca CGRP içeren sinir lifleri atriyumlarda ventriküllerden daha fazladır; sağ atriumda sinoatrial düğüm, atriyoventriküler düğüm ve özel iletim sisteminde lokalizedir (57). Periferde CGRP' yi içeren sinir lifleri sıklıkla düz kaslar ile ilişkilidir: (i) parotid bezinin salgı kanalları dahil olmak üzere gastrointestinal sistemin büyük çoğunluğunda, midenin fundik bezlerinin epitelı üzerinde, endokrin hücreler (ii) akciğerler, (iii) tiroid bezi (C hücrelerine yakın), (iv) dalak damarı ve sinüzoidler, (v) insan derisi ve (vi) hipofiz bezinde bulunmaktadır (60-62).

2.3.2. CGRP'nin fizyolojik görevleri

CGRP içeren sinir liflerinin ve vücuttaki reseptörlerinin geniş dağılımı, CGRP' nin vücutun fizyolojik işlevlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Örneğin, kardiyovasküler sistemde, kalp hızı, kardiyak kasılma gücü, koroner kan akımı ve mikrovasküler geçirgenliği artırma ve kapasitans kan damarlarında vazodilatasyon oluşturma yeteneğine sahiptir (57,63,64). Vasküler tonusu ve anjiyogenezi düzenlemektedir. Merkezi sinir sisteminde, CGRP motor, duyuşal ve entegratif sistemleri modüle etmektedir (65). Buna göre, CGRP: (i) ağrı algılamasını modüle etmekte ve (ii) genel olarak, SP'nin ve aynı zamanda primer afferent liflerden eksitator amino asitlerin salımını arttırarak eksitator etkileri güçlendirmektedir (65-67). Efferent sinir liflerinde, CGRP, kolinerjik nöronlarda asetilkolin ile birlikte bulunmaktadır ve böylece asetilkolin yanıtının yanı sıra salınmasını da modüle etmektedir (67). CGRP' nin aracılık ettiğı ilave biyolojik fonksiyonlar şunlardır: (i) hipofiz hormon sekresyonunu düzenlenmek, (ii) pankreatik enzimleri salgılatmak, (iii) gastrik asit sekresyonunu kontrol etmek; (iv) gıda alımını azaltmak, (v) bazı insülin işlevlerinin antagonizması, (vi) büyüme faktörü benzeri fonksiyonlar, (vii) kemik yeniden şekillenmesi ve (viii) gebelik sırasında komplikasyonların önlenmesidir (58, 68).

2.3.3. CGRP reseptör yapısı

CGRP reseptörü bir heterotrimerdir. Kalsitonin reseptörü benzeri reseptör (CLR veya CRLR) olarak adlandırılan 7 bölgeli transmembran büyük bir peptide; aktivite değiştirici protein (RAMP1) olarak adlandırılan ve CGRP'ye özel ligand bağlanma bölgesini oluşturan küçük tek bir transmembran peptid eklenmiştir. Buna ek olarak reseptör protein bileşeni (RCP) olarak adlandırılan küçük bir hücre içi bileşen bu yapının hücre içi sinyal iletimi mekanizmasına bağlanması için gereklidir. Bu mekanizma işlem yapmak için esas olarak G proteini Gs ve adenilat siklazı kullanır, bunun sonucunda da cAMP seviyelerinde yükselme meydana gelir. Aktivite değiştirici proteinler (RAMP) birbirleriyle bağlantılı küçük (148-175 aminoasitli) proteinlerdir. Bu proteinler kalsitonin reseptör benzeri reseptörün (CLR) hücre yüzeyine çıkmasına, reseptördeki glikozilasyon durumunun saptanmasına ve CGRP için bu reseptörün göreceli olarak yakınlığının belirlenmesine olanak sağlar. Şekil 2.1' de CGRP reseptör yapısı gösterilmiştir (69). CGRP reseptörleri, migren patolojisinde önemli bir rolü olduğu düşünülen sinirlerde ve ayrıca kardiyovasküler ve immün sistem gibi farklı hücre çeşitlerinde bulunmaktadır. Bulunduğu yerler; damar genişlemesine neden oldukları serebral vasküler yumuşak kas doku, degranülasyonu tetiklediği dural mast hücreleri, CGRP' nin ikinci sıra nosiseptif nöronlarda bir modülatör olduğu trigeminal sinirin merkezi terminalleri, CGRP' nin taktıl (dokunsal) uyarıya karşı merkezi sensitizasyonda benzer rol oynadığı spinal trigeminal nükleus kaudalis ve omuriliğin dorsal boynuzu olarak sıralanabilir.

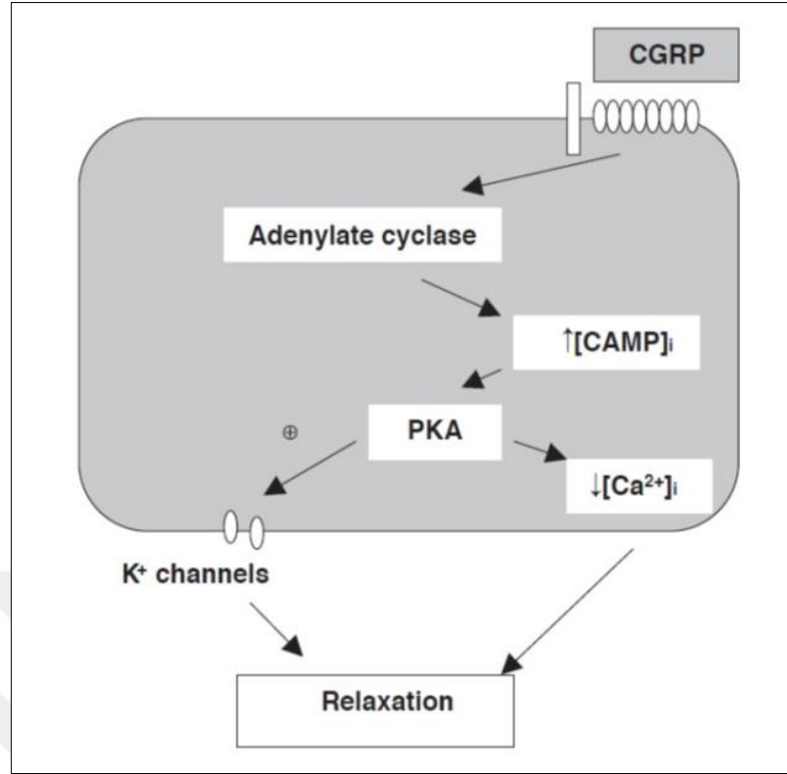


Şekil 2.1. Üç alt birimden oluşan CGRP reseptör kompleksi. Russo (69)' dan alınmıştır. CGRP, kalsitonin gen- ilişkili peptid; CLR: kalsitonin benzeri reseptör, RAMP1: reseptör aktivite-değiştirici protein 1, RCP: reseptör bileşen proteini.

Merkezi sinir sisteminde CGRP için yüksek ve düşük bağlanma bölgelerinin olduğu bildirilmiştir (70,71). Arka kök gangliyonunda ve diğer nöronlarda, CGRP reseptörleri, SP, noradrenalin, nöropeptit Y, vazomotor intestinal peptid gibi nörotransmitterler ve nöro-modulatorlerin reseptörleri ile birlikte bulunurlar (65,72). Ayrıca, nonadrenerjik ve kolinerjik olmayan lifler ve koroner damarlarda, CGRP reseptörleri sırasıyla taşikin ve SP reseptörleri ile birlikte bulunmaktadır (73). CGRP bağlanma bölgeleri en çok kalpte ve kan damarlarında bulunmaktadır (57). Kalpte, CGRP için yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri atriyal ve ventriküler alanlarda bulunmaktadır (57).

2.3.4. CGRP aracılı sinyal iletim mekanizmaları

CGRP'nin oluşturduğu vasküler cevaplar hem endotele bağımlı hem de endotelden bağımsız mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir (58). Endotel bağımlı yolda CGRP adenil siklaz isimli enzimi aktive eder ve böylece cAMP seviyelerini arttırır. cAMP seviyelerindeki bu artış nitrik oksit sentaz enzimini aktive eder ve bu da nitrik oksit seviyesini arttırmaktadır. Nitrik oksit, guanil siklaz'ı aktive ederek düz kas hücrelerine etki eden ve düz kas gevşemesine yol açan siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezine yol açar (58,74). Öte yandan, endotelden bağımsız yolda (örneğin insan iskelet kas arteri), CGRP endotele etki etmeden düz kas hücrelerindeki CGRP reseptörlerine direkt olarak bağlanır, adenil siklaz'ı aktive eder ve bunun sonucunda vasküler gevşemeye yol açan cAMP düzeylerini artırır (58). CGRP' nin oluşturduğu yanıtlar, cAMP, nitrik oksit-cGMP ve K^+ kanalları da dahil olmak üzere birden çok ikinci haberciyi kapsamaktadır (65,75). Bununla birlikte, ilgili ikinci haberciden bağımsız olarak, CGRP' ye bağılı vazodilatasyondan sorumlu olan mekanizma için son ortak yol olarak hücre içi kalsiyumun azalması önerilmiştir (58). Şekil 2.2' de CGRP aracılı sinyal iletim mekanizmaları gösterilmiştir (76).

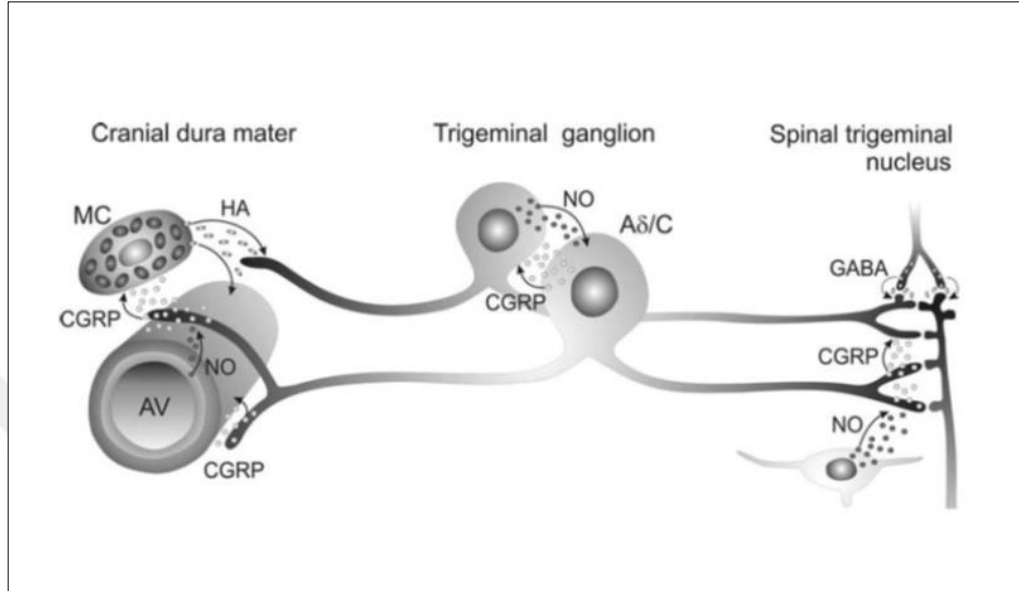


Şekil 2.2. CGRP aracılı vazodilatasyonun mekanizmaları. Arulmozhi ve ark. (76)' dan alınmıştır. Düz kas hücreleri üzerindeki CGRP reseptörlerinin aktivasyonu, adenilat siklaz aktivasyonu ile cAMP üretimine yol açar. Hücre içi cAMP konsantrasyonundaki artış daha sonra K^+ kanallarını açan ve sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu azaltan mekanizmaları aktive eden protein kinaz A'yı (PKA) uyarır.

2.3.5. Migren Baş Ağrısında CGRP

Serebral oligemiyi, arteryovenöz anastomozlar da dahil olmak üzere muhtemelen bu kan damarlarını sinirlendiren sinirlerdeki aktivite değişikliklerine bağlı olarak, kranyal kan damarlarının refleks ağrılı vazodilatasyonu takip eder (43,77). Bu nedenle migren ağrısı, ağrı oluşturan yapıların nosiseptörlerinin endojen ağrı kontrol yollarının işlevindeki azalma ile birlikte aktifleşmesinden kaynaklanmaktadır (14). Kan damarlarındaki bu nosiseptif bilgi, trigeminal nükleustaki merkezi nöronlara iletilir ve bu da ağrı sinyallerini baş ağrısı duyusunun algılandığı yüksek merkezlere iletir. Buna ek olarak, trigeminal sinirlerin stimülasyonu da CGRP salınımına yol açabilir ki bu durum nosiseptif uyarıları merkezi sinir

sistemine aktararak hali hazırda mevcut vazodilatasyonu güçlendirmektedir (41, 77, 78). Migrende CGRP aracılı ağrı iletimi şekil 2.3’ de gösterilmiştir (79).



Şekil 2.3. Migren ağrısının oluşmasındaki nosiseptif süreçlerde rol oynayan kranyal dura mater, trigeminal gangliyon ve spinal trigeminal çekirdekteki olayların şematik gösterimi, Messlinger (79)’ den alınmıştır. MC: mast hücresi, CGRP: kalsitonin gen-ilişkili peptid, HA: histamin, NO: nitrik oksit.

2.3.6. Migrende biyolojik bir markır olarak CGRP

Migren baş ağrısı trigeminovasküler sistemin aktivasyonu ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle trigeminal ganglion/duyu sinirlerinin çeşitli türlerde uyarılması (insanlar dahil), kranial kan damarlarını genişleten ve duysal sinir iletimini uyararak CGRP' nin salınmasına yol açmaktadır (3). Ayrıca CGRP benzeri immünreaktivite, trigeminal nükleusta ve miyelinsiz trigeminal duysal sinir liflerinde bol miktarda eksprese edilmektedir (78). Böylece, serebral damarların başlıca CGRP içeren duyu sinirleri tarafından innerve edildiği bilinmektedir (3). Migren atakları sırasında plazma nörotransmitter konsantrasyonlarını ölçmeyi amaçlayan klinik çalışmalar gerçekleştirilmiştir (3, 14). Böylece, migren baş ağrısı fazında, juguler venöz kanda

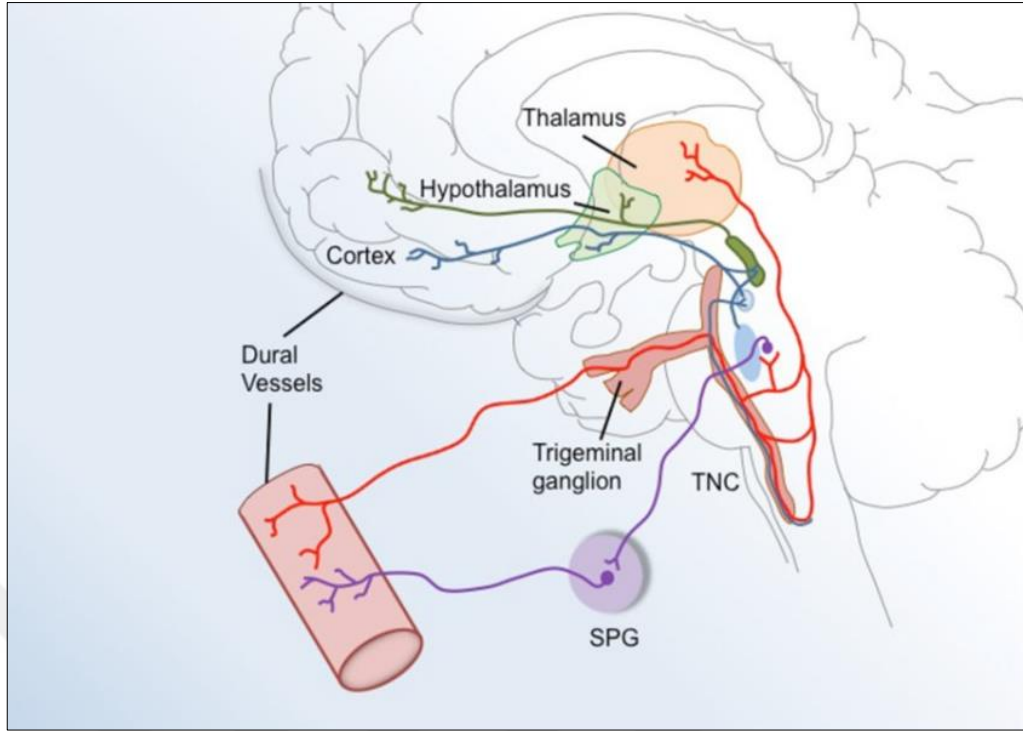
CGRP' nin plazma konsantrasyonları yükselmiş olarak bulunmuştur (14). Ayrıca yapılan çalışmalar; i) migren hastalarında plazma CGRP konsantrasyonları ile migren baş ağrısı arasında kuvvetli bir korelasyon bulunduğunu (ii) CGRP' nin intravenöz infüzyonunun migren benzeri bir baş ağrısı oluşturduğunu (iii) başlangıçtaki CGRP düzeylerinin belirgin olarak daha yüksek olduğunu ve (iv) migren atakları sırasında plazma CGRP düzeylerindeki değişikliklerin, baş ağrısı yoğunluğu ile anlamlı korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (12, 80). Son yıllardaki araştırmalar, migren baş ağrısı ile ilişkili güçlü bir vazodilatatör olan nitrik oksit CGRP ile güçlü bir korelasyona sahip olduğunu göstermiştir (12, 81, 82). Migrenliler nitrik oksite aşırı duyarlıdır ve nitrik oksit vasküler etkilerine kısmen trigeminal sinir liflerinden salınan CGRP aracılık etmektedir (82, 83). Ayrıca intravenöz nitrik oksit infüzyonu, plazma CGRP düzeylerinde bir artışa yol açan migren benzeri bir baş ağrısı oluşturmuştur (12). Dolayısıyla, yukarıdaki deliller, trigeminal sinirlerden CGRP salınımının venöz kan örneğinde ölçülebilen migren için güvenilir bir belirteç olduğu yönündeki kanıtları güçlendirmektedir. Buna göre, bu markördeki azalma, insanlarda migren ağrısının azaldığı yönündeki tahminlerin temelini oluşturmaktadır (3, 12).

2.3.7. Trigeminovasküler sistem

Trigeminovasküler sistem, hücre gövdeleri trigeminal gangliyonda bulunan ve serebral damarları innerve eden nöronlardan oluşmaktadır. Gangliyon, bipolar hücreler, perifer lifin damar ile oluşturduğu sinaptik bağlantı ve diğer kafa yapıları, özellikle de ağrı oluşumuna yol açan büyük serebral damarları ve ayrıca dura mater ve kaudal beyin sapını içine almaktadır. Migren atağının baş ağrısı fazının, piyel, araknoid ve dural kan damarlarını innerve eden nosiseptörlerin yanı sıra büyük serebral arterler ve sinüslerin aktivasyonundan da kaynaklandığı düşünülmektedir (84). Bu yapıların mekanik, elektriksel veya kimyasallarla (proenflamatuvar moleküller, kan veya enfeksiyon) uyarılarak aktive edilmesi, migren ağrısında ve baş ağrısında en sık görülen mide bulantısı, zonklama, fotofobi ve fonofobi gibi bulgulara çok benzer semptomlara yol açmaktadır. İntrakranial damarlar ve meninkslerin nosiseptif innervasyonu, SP ve CGRP gibi vazoaktif nöropeptitleri içeren, miyelinsiz

C-lifleri ve ince miyelinli A δ liflerinin aksonları tarafından sağlanmaktadır. Bunun için somaları trigeminal gangliyonda bulunan bu sinirler, trigeminal sinirin oftalmik dalından (V1) ve daha az oranda maksiller (V2) ve mandibular (V3) dallarından dura matere ulaşmaktadır (22, 85, 86). Dura materin ek innervasyonu üst servikal (C1-C2) dorsal kök gangliyonundaki nöronlar tarafından sağlanmaktadır (87).

Meningeal duysal afferentlerin merkezi uzantıları, trigeminal traktus üzerinden beyin sapına girer ve spinal trigeminal çekirdeği (SpVC) ve üst servikal spinal kord (C1-C3) terminallerinde sonlanarak kaudale geçmektedir. Anatomik ve elektrofizyolojik çalışmalar, A δ ve C nosiseptif primer afferentlerin büyük çoğunluğunun yüzeysel katmanlarda (lamina I ve II) sonlandığını ve bazı A δ liflerinin SpVC'nin V tabakasında sonlandığını göstermektedir (88-90). Bu meningeal nosiseptörler, bitişik deri ve kaslara ilave girdi alan trigeminovasküler SpVC nöronlarına yakındır (89). Trigeminovasküler sistemin ana bileşenleri şekil 2.4' de gösterilmiştir (69).



Şekil 2.4. Trigeminovasküler sistem. Russo (69)' dan alınmıştır. Trigeminal gangliyondaki primer afferent nöronların periferik uçları meningeal damarlarda, merkezi uçları ise trigeminal nükleus kaudalistedir. Trigeminal nükleus kaudalisteki ikinci sıra nöronları da posterior talamusa uzanırlar. Sfenopalatin gangliyon da meningeal damarların refleks parasempatik innervasyonunu sağlar. SPG: Sfenopalatin gangliyon, TNC: trigeminal nükleus kaudalis.

Baş ağrısının başlangıcından önce veya sonra, sinirlilik, yorgunluk, uyku hali, abartılı duygusal tepkiler, mide bulantısı ve iştah kaybı gibi migren baş ağrısı ile ilişkili birçok semptom ortaya çıkabilmektedir. Muhtemelen, migren başlangıcından önce ortaya çıkan semptomların (yani, prodromlar), kortikal, diensefalik ve/veya beyin sapı yapılarındaki anormal nöronal aktivite ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Aksine, migren başlangıcından sonra ortaya çıkan semptomların en muhtemel açıklaması (daha yaygın ve daha tutarlıdır), meninkslerden kaynaklanan intrakranyal ağrı sinyalleri ile duysal, duygusal, endokrin ve otonomik fonksiyonlarla ilişkili supramedüller beyin yapılarının uyarılmasıdır. Bu nosiseptif bilgi, SpVC' deki ikinci sıra trigeminovasküler nöronlara iletilmektedir. SpVC' den parabraşiyal bölgeye (PB), anterior hipotalamik (AH), lateral hipotalamik (LH) ve periferik (PeF) hipotalamik

alanlara, lateral preoptik nükleusa (LPO), zona incerta'ya ve ventral posteromedial (VPM), posterior (Po) ve parafasiküler (Pf) talamik çekirdeklere iletilmektedir (89).

2.4. Dura mater

Meninksler ağırlıklı olarak hücre gövdelerinin trigeminal gangliyonda bulunduğu afferentler tarafından sinirlendirilirler. Trigeminal sinir beyin sapından tek bir sinir kökü olarak çıkan, trigeminal gangliyonu geçen beşinci kranyal sinirdir ve gangliyondan ayrı sinir dalları olarak uzaklaşmaya devam etmektedir. Gangliyondan V1, V2 ve V3 alt bölümlerine ayrılarak çıkan üç ana dal vardır. Birinci bölüm, V1, oftalmik sinir olarak da adlandırılır ve burun, gözün üstündeki alanlar ve kafa derisini innerve etmektedir. İkinci bölüm V2 veya maksiller sinirdir ve gözün altındaki bölgeleri ve ağzın üstünde ve mandibulayı innerve etmektedir. Son olarak, V3, ağzı ve çene ve yüzün alt bölümlerini sinirlendiren mandibular sinirdir. V1 dalı migrenle en ilişkili olan trigeminal sinir bölümüdür, bu dal meninkslerin (dura ve kan damarlarının) innervasyonunun çoğunluğunu sağlamaktadır. Bu trigeminal afferentler, beyin sapına afferent girdilerini gönderir ve medulla içine inerek spinal trigeminal çekirdek veya trigeminal nükleus kaudalis (TNC) olarak bilinen dorsal medulla bölgesi içinde bulunan ikinci sıra nöronlar ile sinaps yapmaktadır. Nükleus kaudalis, beyin sapında obex'in altında bulunur ve trigeminal çekirdeğin en kaudal kısmıdır. (91). Nükleus kaudalisteki çoklu projeksiyonlar, aynı internöronları paylaşabilir ve afferentler arasındaki çapraz geçişe izin verebilir ve trigeminal sistemde iletilen ağrı için bir temel oluşturabilir (92). İkinci sıra nöronların aksonları trigeminotalamik yolu oluşturur ve sonra talamusun ventroposteromedial çekirdeğine ulaşarak yükselir. Daha sonra talamustan kortikal bölgelere uzantılar verirler.

2.5. Dural afferentler

Dura mater ile kafatası arasında migrene katkıda bulunan herhangi bir etkileşim olup olmadığı bilinmemektedir ancak dura materi innerve eden bazı afferentler özellikle de suturlarda kafatasına ulaşan dallar gönderir (93, 94). Dura

matere uygulanan irrite edici kimyasalların kemirgenlerde dural afferentleri duyarlılaştırdığı ve baş ağrısı davranışlarına neden olduğu gözlemlenmiş ve böylece dural innervasyonu sağlayan nöronların baş ağrısında potansiyel bir rol oynadığı gösterilmiştir (95, 96). Bu hücreler tarafından salınan faktörler arasında proinflamatuvar sitokinlerden interlökin-6 (IL-6) da bulunur. Dura mater ayrıca mast hücreleri ve makrofajlar gibi nöronal olmayan diğer hücre tiplerini de içermektedir. Dura materde çok sayıda arter vardır, en belirgin orta meningeal arter (MMA) ve bu arterden çıkan dallardır. Mast hücrelerinin çoğunlukla dura içindeki kan damarları etrafında toplandığı bilinmektedir ve migren patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (97-99). Mast hücreleri aynı zamanda dura içindeki afferentlerle doğrudan temas halinde bulunur ve bu da olası bir modülasyona izin verebilmektedir (97, 99). Meningeal mast hücrelerinin degranülasyonunun dural afferentleri aktive ettiği ve duyarlılaştırdığı daha önce gösterilmiştir (99, 100). Mast hücre degranülasyonu, insanlarda migren ile ilişkili olduğu bilinen faktörler (stres hormonu kortikotropin salıcı faktör (CRF), kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) salınımı ve nitrogliserin infüzyonu ve ayrıca estrogen) tarafından ortaya çıkarılmaktadır (100-102). Mast hücrelerinin degranülasyonu, dural afferentlerin duyarlılaşmasına katkıda bulunan histamin, serotonin ve protonlar gibi faktörlerin salınmasına neden olmaktadır. Dura matere inflamatuvar çorba adı verilen ve histamin, serotonin, bradikinin ve PGE2' den oluşan bir inflamatuvar mediyatör kokteyli uygulaması, kemirgenlerde yaygın kutanöz allodiniye neden olmaktadır (96, 103, 104).

Migren atağını başlatan olaylar bilinmemekle birlikte, atağın başlamasında trigeminovasküler sistemin nihai aktivasyonunun önemli olduğu bilinmektedir (96, 105, 106). Trigemiovasküler aktivasyon, dural kan damarlarının nörojenik vazodilatasyonuna, proinflamatuvar mediyatörlerin salınmasına, mast hücrelerinin degranülasyonuna ve plazma protein ekstrasvazasyonuna neden olan dural afferentlerin terminallerinden SP, nörokinin A ve CGRP' gibi çok sayıda eksitatör nörotransmitterin salınımını tetiklemektedir (96, 107-109). Meninksleri innerve eden bu primer nosiseptörlerin aktivasyonu ayrıca migrene katkıda bulunan merkezi devrelerdeki patolojik değişikliklere de yol açmaktadır. Migren atakları sırasında ataksız dönemlere kıyasla hastalarda IL-6 gibi sitokinlerin, CGRP gibi nöropeptitlerin ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) gibi büyüme faktörlerinin yüksek olduğu daha önceki

çalışmalarda gösterilmiştir (96, 110-112). Migren ağrısının, lokal, steril meningeal inflamasyon ve ardından intrakranyal damarları innerve eden trigeminal primer afferent nosiseptif nöronların aktivasyonu sonucu oluştuğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte, bu inflamatuvar hasarın kaynağı ve meningeal nosiseptörlerin aktivasyonuna katkıda bulunan endojen faktörler büyük ölçüde tartışmalı olarak kalmaktadır. Meningeal nosiseptörlerin anatomik, biyokimyasal ve elektrofizyolojik özelliklerinin anlaşılmasında kaydedilen ilerlemelere rağmen, bu nöronların bir migren atağı sırasında nasıl faaliyete geçtiği iyi anlaşılamamıştır. Ancak dural afferent sinir terminallerinde bulunan iyon kanallarının endojen maddeler aracılığı ile aktive edilerek noisepsiyonun başladığı kabul edilmektedir.

2.5.1. Dural afferentlerde bulunan iyon kanalları

2.5.1.1. Asit algılayan iyon kanalları (ASIC'ler)

ASIC'ler, hücre dışı proton konsantrasyonundaki artışlarla aktive edilen, voltaj-duyarsız katyonik kanallardır (113). ASIC ailesi, 4 üyeden (ASIC1-4) oluşur (114). Fonksiyonel ASIC kanalları, heteromerik veya homomültimerik kanallar olarak meydana gelirler. Bu kanalların farklı alt birimi bileşimi, farklı farmakolojiye, mevcut kinetik ve pH değişimlerine duyarlılığa neden olmaktadır (114). ASIC'ler sinir sisteminde yaygın olarak ekspresse edilmektedir. ASIC1a ve ASIC2 alt birimleri merkezi sinir sisteminde ekspresse edilirken, neredeyse tüm ASIC alt birimleri periferik duyu nöronlarında bulunur (115-117). Tüm alt birimler arasında, ASIC3 alt birimi, çeşitli nedenlerden dolayı özellikle ilgi çekicidir. ASIC3, nötr pH'da veya nötr pH civarında pH değerlerine yanıt vermesine izin veren bir hassaslık sergiler. Geçici pik akımına ek olarak ASIC3, fizyolojik açıdan ilgili bir pH' ya cevap olarak, duyarlılığı azaltan bir akım da üretir ve böylece uzun süreli ve yavaş asitlenmeyi tespit edebilir (118). ASIC3, duyu nöronlarında yüksek oranda ekspresse edilir ve çevresel dokulardaki pH değişimlerini belirleme rolüyle tutarlı olan çevresel etkiyle sınırlıdır (114, 119). ASIC3' ü ekspresse eden periferik duyu nöronları, kolon ve kalp gibi iskelet kasları dahil olmak üzere visceral organları innerve eder (120-123). ASIC3

kanallarının, angina, postoperatif ağrı, çeşitli GİS rahatsızlıkları ve kas ağrısı dahil olmak üzere bu dokularla ilişkili ağrılı durumları modüle ettiği düşünülmektedir (118, 120, 122-125). Migren ile ilgili olarak, dural afferentlerdeki ASIC'lerin dura materde azalmış hücre dışı pH'ının bir sensörü olduğu önerilmiştir (126). ASIC3 ekspresyonu çoğu trigeminal nöronda bulunur ve dural afferentlerin yaklaşık % 80'i ASIC3 içermektedir (127, 128).

2.5.1.2. P2X kanalları

P2X reseptörleri, hücre dışı ATP'nin bağlanmasına yanıt olarak aktive olan ligand kapılı iyon kanallarıdır (129). Yedi P2X alt tipi tanımlanmıştır ve bu fonksiyonel kanallar homomerik ve heteromüimerik olarak meydana gelirler (129). P2X3, 7 alt tip arasında, çeşitli ağrı koşullarında, periferik duysal afferentler tarafından yüksek oranda eksprese edildiğinden dolayı araştırmacılar tarafından yoğun bir şekilde çalışılmıştır (6, 130-133). Dural afferentlerin yaklaşık % 50'si P2X2 veya P2X3 veya her iki reseptörü eksprese etmektedir ve ayrıca trigeminal duysal sinir hücrelerinin % 40'ı P2X2 reseptörlerini ve heteromerik P2X2/3 reseptörlerini eksprese etmektedir (134). P2X3 eksprese eden trigeminal duysal nöronlar, dorsal kök ganglion nöronlarındaki özelliklere kıyasla bazı benzersiz nörokimyasal özellikler sergilemektedir. Dorsal kök gangliyonda (% 98-99) P2X3 ve IB4 hemen tamamen birlikte bulunurlar ancak, trigeminal gangliyonda P2X3 ifade eden nöronların sadece % 64'ü IB4 pozitifdir (134-137). Bu, P2X3 reseptörlerinin trigeminal gangliyonda peptiderjik afferentlerde eksprese edildiğini ve artmış CGRP salımına katkıda bulunduğu kabul edilmektedir.

2.5.1.3. Kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalı (BKCa veya MaxiK)

Dural afferent sinir uçlarında ifade edilen, noziseptif sinyalizasyonun aktivasyonunu doğrudan başlatabilen iyon kanallarına ek olarak, trigeminal sinyal yolağında eksprese edilen diğer kanallar da trigemino-servikal kompleksin hiperaktivitesine katkıda bulunabilmektedir. Buna örnek, BKCa veya MaxiK olarak

da bilinen büyük iletkenliğe sahip kalsiyum ile aktiveleştirilen potasyum kanallarıdır. MaxiK kanalı beyinde, hem de nöron gövdesinde, hem de dendritler ve aksonal terminallerde eksprese edilmektedir (138). En yüksek ekspresyon seviyesi aksonal terminallerde gözlenir ve sinaptik terminallerde nöronal MaxiK proteininin en bol olduğu kabul edilmektedir (138). Nöronal hücre gövdesinin aktivasyonu sonucu aktive olan MaxiK kanalları, nöronların hiperpolarizasyonunu tetikler ve böylece nöronal eksitasyonu azaltır (138). Buna ek olarak, aksonal terminallerde yer alan MaxiK'nin, Ca^{2+} girişinin modülasyonu yoluyla hassas bir şekilde ayarlanmış nörotransmitter modülasyonunu sağladığı bulunmuştur (138). Presinaptik voltaj kapılı kalsiyum kanallarına çok yakın yerleşim gösteren MaxiK kanallarının, aktive olduğunda presinaptik aksiyon potansiyelini sınırlandırdığı ve bu nedenle presinaptik Ca^{2+} girişini azalttığı ve bunun da nörotransmitter salınımını azalttığı düşünülmektedir (139). Böylece, MaxiK, merkezi sinir sisteminin periferik merkezden yüksek merkezlerine ağrı iletimi modülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Migren ile ilgili olarak, MaxiK'nin aktivasyonunun, hem sinaptik terminaller hem de hücre gövdeleri üzerinde, nörotransmitter salınımını ve daha sonra dorsal boynuz sinir hücrelerinin aktivasyonunu önleyerek nöronal ateşlemeyi azaltmak için çalıştığı varsayılmaktadır (140).

2.5.1.4. Geçici reseptör potansiyel kanalları (TRP kanalları)

TRP kanalları, ısı, ozmolarite değişiklikleri, protonlar ve çeşitli doğal ürünler de dahil olmak üzere çeşitli uyarılara cevap veren endoplazmik retikulumun yanı sıra hücrel membranda sentezlenen bir grup iyon kanallarıdır (141-143). Memeli TRP kanalları; TRPK, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPM olarak altı ana gruba ayrılmaktadır (144). TRP kanallarının aktivasyonu hücre içine Ca^{2+} ve Na^{+} akışı sağlayarak bunun sonucunda hücrenin depolarizasyonuna yol açar (141). TRP kanallarının görsel, tatlı, koku, işitsel, mekanik, termal, ozmotik uyarılar ve çevresel irritanların algılamasında önemli bir rol oynadıkları bildirilmiştir (145). Dolayısıyla, TRP kanalları, migren patofizyolojisinde zararlı uyarıları ağrı duyusuna dönüştürme konusunda özellikle önemlidirler.

2.5.1.5. Geçici reseptör potansiyel ankyrin-1 (TRPA1)

Migrenle alakalı olarak, baş ağrısı patofizyolojisinde en çok rol alan TRP kanalı TRPA1'dir. TRPA1, çevresel irritanlar olan akrolein, klor, formaldehit ve sigara dumanı, sinnamaldehit, izotiyosiyanatlar ve allisin gibi doğal ürünler ve 4-hidroksinonenal, nitro-oleik asit ve reaktif prostaglandinler gibi endojen maddeler de dahil olmak üzere çeşitli maddeler ile aktive edilmektedir. Bunların birçoğu genellikle migrenin tetikleyicisidir (146-148). Preklinik çalışmalar, TRPA1'in baş ağrısı patofizyolojisine katkıda bulunduğunu önermektedir. TRPA1, kemirgenlerde dural afferentlerde ekspresse edilmektedir (104). Akrolein de dahil olmak üzere TRPA1 agonistleri nazal mukozaya uygulandığında, meningeal kan akımında ve CGRP düzeylerinde bir artışa yol açtığı ve bunun TRPA1 antagonisti tarafından bloke edilebildiği gösterilmiştir (149).

2.5.1.6. Geçici reseptör potansiyel vanilloid 1 kanalı (TRPV1)

TRPV1, trigeminal ve dorsal kök gangliyon nöronlarında, miyelinsiz C lifleri ve ince miyelinli A lifleri üzerinde bulunmaktadır ve doğrudan kapsaisin ve zararlı sıcaklıklarla (42 °C'nin üstünde) aktive edilmektedir (150-152). Ek olarak, ekstraselüler protonlar, artrit, inflamasyon ve diğer yaralanma şekillerindeki gibi ortaya çıkan doku asidozu TRPV1'in kapsaisin'e ve zararlı sıcaklığa cevabını önemli ölçüde güçlendirmektedir (153). Birçok çalışma, migrenin oluşumu ve patofizyolojisinde TRPV1'in rolüne odaklanmıştır. Fonksiyonel çalışmalar ayrıca TRPV1 ile CGRP'nin salınımı arasındaki etkileşimi de aydınlatmaktadır. Afferent aktivasyon üzerine sinir terminallerinden salınan CGRP, migren baş ağrısının oluşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Güçlü bir vazodilatatördür olan CGRP' nin infüzyonu migren atağını tetiklemektedir (154). Kapsaisin' in bolus şeklinde enjeksiyonunun TRPV1 aracılı CGRP salınımı yoluyla dural damar genişlemesine yol açtığı daha önce bildirilmiştir (155).

2.5.1.7. Geçici reseptör potansiyel vanilloid 4 kanalı (TRPV4)

Dural afferentlerin mekanik uyarılara ve ekstrasellüler ozmolarite değişimlerine karşı duyarlı olmaları (156) mekanik ve ozmotik duyarlı TRPV4 kanallarını eksprese ettiklerini göstermektedir (157-160).

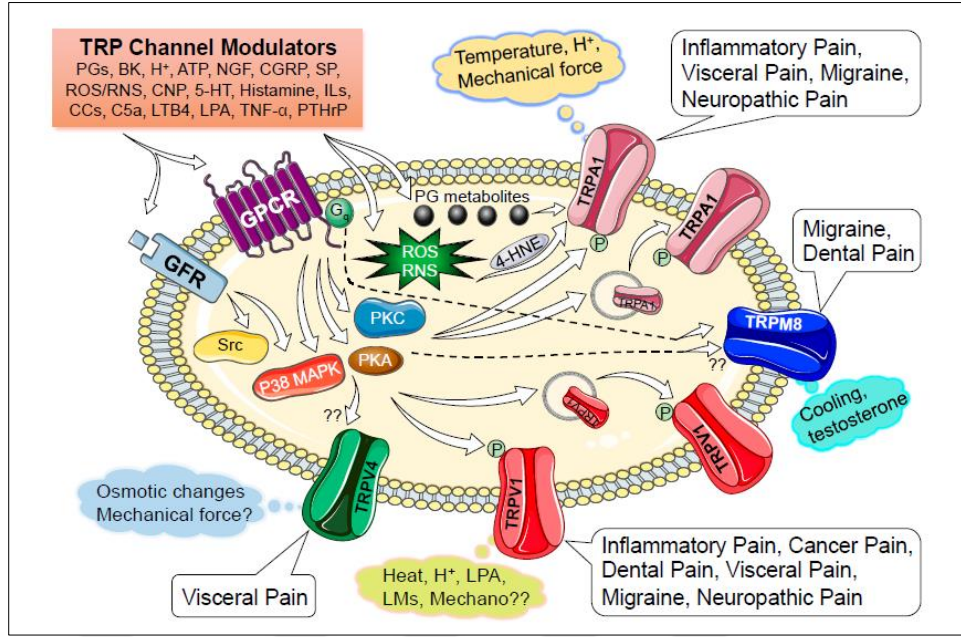
2.5.1.8. Geçici reseptör potansiyel melastatin 8 (TRPM8)

TRPM alt ailesi sekiz üyeden oluşmaktadır: TRPM1-M8. TRPM8 kanalı, hem soğuk sıcaklığa, hem de mentol gibi soğukluk hissi uyandıran kimyasal maddelere duyarlıdır (161-163). TRPM8 kanalları, mentol, icilin ve 26 °C' nin altındaki sıcaklıkları içeren kimyasal soğutucu ajanlar tarafından aktive edilmektedir ve bu nedenle soğuk uyarıların algılanması ile ilgili olduğu önerilmektedir. Bu hipotezi destekleyen bazı çalışmalar, TRPM8 geninden yoksun farelerin, soğuk uyarılara yanıt olarak ciddi davranışsal eksiklikler gösterdiğini bildirmişlerdir; bunlar arasında, arka pençeye aseton uygulamasına verilen cevapların azalması, ılık ve soğuk yüzeyleri ayırt etme yeteneği ve icilin kaynaklı sıçramada azalma sayılabilir (164-166).

2.6. TRP kanalları ve ağrı

Geçici Reseptör Potansiyeli (TRP) ailesine ait membran proteinleri olan bu kanallar, moleküler detektör/dönüştürücülerin ana grubunu oluşturur. TRP' ler, nispeten yüksek Ca^{2+} geçirgenliğe sahip selektif olmayan katyon kanallarıdır ve hem plazma zarında hem de hücre içi organel membranlarında çok çeşitli hücre / doku tiplerinde eksprese edilirler (167,168). Aynı zamanda, voltaja duyarlı K^{+} kanallarına benzeyen 6-transmembran (6-TM) segment polipeptid alt birimlerinin tetramerlerinden oluşan özdeş zar topolojisini paylaşırlar. Altı alt aileden oluşan bu kanallar; kanonikal (TRPC), vanilloid (TRPV), ankirin (TRPA), melastatin (TRPM), polisistinin (TRPP) ve mukolipin (TRPML) olarak sınıflandırılmıştır (167, 168). Genel olarak, TRP kanalları, görme, işitme, koku alma, tat ve dokunma, zararlıdan zehirli

uyaranlara kadar geniş bir yelpazedeki en çok bilinen duyuşal modalitelerin birincil dönüştürücüleridir ve bu nedenle duyuşal biyolojide en çok çalışılan reseptör ailelerinden biridir (168-170). TRP kanallarındaki çeşitlilik esas olarak bunların sitoplazmik N- ve C-terminalindeki en büyük amino asit dizisi farklılık düzeyine bağılıdır. Belirli nosiseptif modaliteleri algılama ve dönüştürme kabiliyetlerine dayanarak, yalnızca üç TRP alt ailesi, TRPV, TRPA ve TRPM üyeleri "nosiseptif TRP kanalları" kategorisine dahil edilmiştir. Belirli zararlı ve/veya ağrı üreten uyarılara göre nosiseptif TRP kanallarının harekete geçirilmesi, ağrının fizyolojik ve patofizyolojik koşullar altında transdüksiyonunun belirlenmesinde temel bir yöntemdir. Buna ek olarak, kanal fonksiyonunun yanı sıra, nosiseptif TRP kanallarının gen ekspresyonundaki değişiklikler, çok çeşitli patolojik koşullar altında periferik nosiseptif ve ağrı işlenmesinde kritik olduğu düşünülmektedir. Ağrı ve migren patolojisinde nosiseptif TRP kanallarının rolünü tanımlamak için çok sayıda kapsamlı çalışmalar yapılmış olduğundan, bunlar yeni nesil analjezikler ve anti-migren ilaç geliştirme konularında cazip hedefler oluşturmaktadır (170-176).



Şekil 2.5 Memeli duyu nöronları üzerindeki çeşitli nosiseptif geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanallarının spesifik aktivatörlerini ve modülatörlerini gösteren şema. Mickle ve ark. (177)' dan alınmıştır. 5-HT: serotonin, ATP: adenozin trifosfat; BK: bradikinin, CGRP: kalsitonin gen-ilişkili peptid; CNP: C-tipi natriüretik peptid, GFR: büyüme faktörü reseptörü; GPCR: G-protein kenetli reseptör, IL: interlöki, LM: lipid araçları, LPA: lisofosfatidik asit, LTB4: lökotrien B4; NGF: sinir büyüme faktörü, P38MAPK: p38 mitojenle aktive protein kinaz, PG: prostaglandinler, PKA: protein kinaz-A, PKC: protein kinaz-C, PTHrP: paratiroid hormonu ile ilgili peptid, ROS: reaktif oksijen türleri, RNS: reaktif azot türleri, SP: P-madde, Src: Src-tipi protein kinaz, TRPA1, geçici reseptör potansiyeli ankirin-1, TRPM8: geçici reseptör potansiyeli melastatin-8, TRPV1: geçici alıcı potansiyel vanilloid-1; TRPV4: geçici reseptör potansiyeli vanilloid-4.

TRPV1, TRPA1, TRPV4 ve TRPM8' i incelemek için genetik knockdown ve knockout stratejileri kullanılmıştır. Ağrı araştırması açısından, TRP kanal sahasındaki odağın büyük kısmı, duyu nöronlarında ifade edilen kanalların işlevsel etkinliği üzerinde olmuştur. Mekanik olarak, bu odak, sıcaklık sensörleri ve doğal madde etkilerinin araçları gibi TRP kanallarında büyük ölçüde yer almıştır. Bununla birlikte, TRP kanallarının, kalsiyum salınımıyla aktive edilmiş akımların mediatörleri olarak erken tanımı da dahil olmak üzere, diğer TRP kanal fonksiyonları tanımlanmıştır. Buna ek olarak, TRP kanalları merkezi sinir sisteminin hücrelerinde ve ağrı

sinyallerinin üretilmesi, algılanması ve işlenmesine katılan çeşitli, non-nöronal hücre tiplerinde bulunmaktadır.

2.6.1. TRP kanalları ve mekanik ağrı

TRP kanal ailesinin üyeleri, periferik duysal mekanotransdüserlerin önemli bir bölümünü temsil etmektedir (178). *Drosophila* ve insanla yapılan çalışmalarda TRP kanal süper ailesinin mekanotransdüksiyonda ve ağrı benzeri durumlarda potansiyel olarak mekanik noisepsiyon veya aşırı duyarlılıkta rol oynadığını düşündürmektedir (179). Ancak, bugüne kadar yapılan ve memelilerin çalışmalarından elde edilen kanıtlar tam değildir. Bazı çalışmaların sonuçları, mekanik noisepsiyonda TRPA1'in rolünü ileri sürse de, diğer raporlar bu rolün net olmadığını ve daha fazla açıklığa kavuşturulması gerektiğini göstermektedir (180-182). TRPA1 ve TRPV4'ün işitsel tüy hücrelerinde birer transdüserler olduğu düşünülmektedir (183,184). Sinyal entegratörleri olarak, bazı fizyolojik uyarılar bir kanalın diğer uyarılara aktarımını etkileyebilmektedir. Örneğin sıcaklık, TRPV4'ün kimyasal, ozmotik ve mekanik uyarılarla uyarılması kanalın cevabını etkilemektedir (kanal oda sıcaklığından 37 °C' de bu uyarılara daha fazla tepki verir) (185, 186). Şimdiye kadar yapılan herhangi bir çalışma, TRPV1'in doğrudan mekanik aktivasyonunu göstermemiştir. Bununla birlikte, ilginç anatomik ve fizyolojik kanıt, TRPV1'in mekanik olarak uyarılan cevaplara dahil olabileceğini ileri sürmektedir. Düşük eşik mekano-duyarlı tepkilere aracılık ettiği önerilen Meissner korpusküllü, TRPV1 immün-reaktivitesi gösteren duysal liflerde bulunmaktadır. Bu gözlem, TRPV1 eksprese eden liflerin mekanik aşırı duyarlılıkla ilgili olabileceğine dair bazı kanıtlar sağlamaktadır (187). TRPV1 antagonistleri ve TRPV1 antisens oligonükleotidi inflamasyon ve sinir hasarıyla uyarılan mekanik aşırı duyarlılıkta etkinlik göstermektedir (188-190).

2.6.2. Ortopedik periferik ve spinal proseslerde TRP kanallarının rolleri

Nosiseptif yolların aktivasyonu, tekrarlayan uyarılara bağlı olarak yanıtta ilerleyici bir artış olarak ortaya çıkan bir faaliyete bağlı olarak modifiye edilebilmektedir. Buna genellikle aktiviteye bağlı plastisite veya sensitizasyon denir

(191). Genellikle ağrı sistemleri ile ilgili iki tür duyarlılık vardır bunlar; nosiseptör sinir terminallerinin otosensitizasyonu ve dorsal boynuz nöronlarının hassaslaşması ve sinyalizasyon. Her iki tür hassasiyet de TRP ailesinin üyeleri için geçerlidir. Nosiseptör otosensitizasyonu TRPV1'in yukarıda açıklandığı gibi bütünleştirici özelliklerinden dolayı merkezdedir. TRPV1 ayrıca, nosiseptörlerin depolarizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. TRPV1 kanallarının aktivasyonu lokalize sodyum ve kalsiyum iyon akışı ile sonuçlanır ve bu da yayılımsız nöronal jeneratör potansiyellerine neden olmaktadır (192). Bu gibi jeneratör potansiyelleri yeterince güçlü olduğunda, nöronal depolarizasyon oluşmaktadır. Bu moleküler entegrasyon, kendiliğinden kanal duyarlılığıyla (diğer bir deyişle yukarıda tarif edildiği gibi fosforilasyon ile) birleştirildiğinde, hiperaljezik durumda nosiseptif nöronal transmisyon ile yakından bağlantılı görülmektedir. Hardal yağı uzun süredir C-liflerinin selektif aktivatörü olarak kullanılmaktadır ve TRPA1 kanallarının seçici bir etkinleştiricisidir (193). TRPA1 ve TRPV1'in birlikte ekspresse edildiği duyu nöronlarında TRPA1 kanallarının hem termal hem de mekanik aşırı duyarlılıkla ilgili merkezi sensitizasyonda önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir.

2.6.3. İnflamatuvar ağrıda TRP kanallarının potansiyel rolü

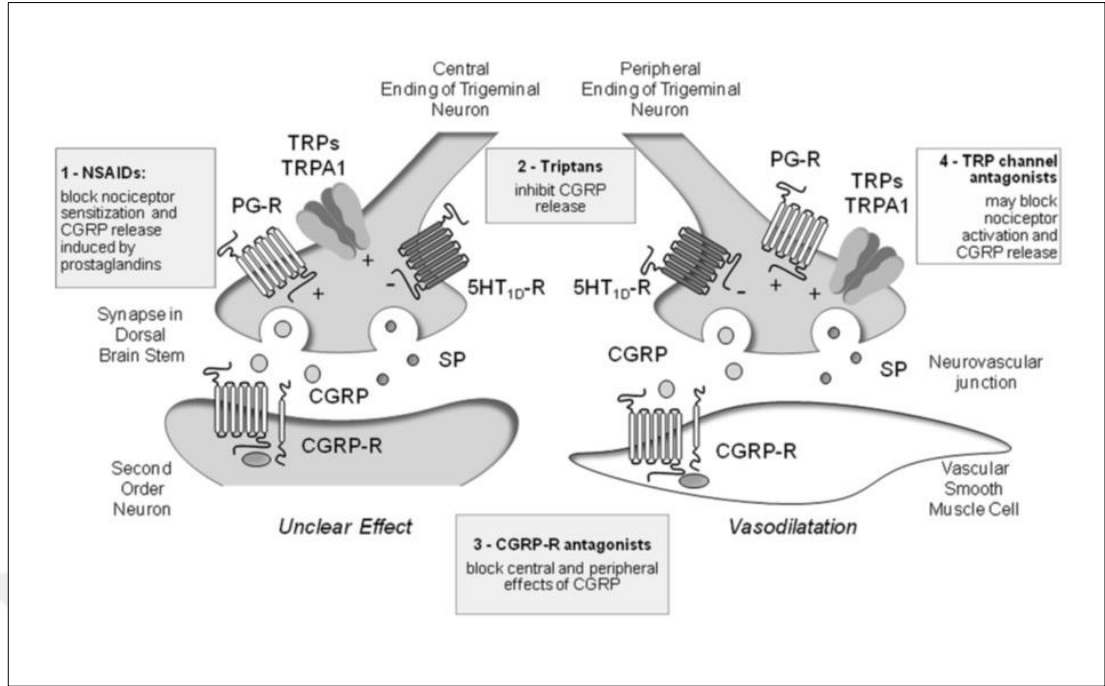
TRP kanalları ve ağrı üzerine yapılan araştırmalar büyük oranda nosiseptif işleme yönlerine odaklanmıştır. Bununla birlikte, duysal nöronlar, nörojenik inflamasyonda da rol oynamaktadır. SP ve CGRP gibi nöropeptidlerin, periferik vazodilatasyon ve bağışıklık hücreleri üzerindeki etkileri sonucunda duysal liflerin periferik ucundan salınması ve bu yanıtların, trigeminal ganglion nöronlarının periferik sinir uçlarından salınan CGRP' nin progesteronun etkilerine aracılık ettiği ve migreni de içeren bazı bozukluklara katkıda bulunduğu düşünülmektedir (194). Kapsaisin deneysel nörojenik inflamasyonu tetiklemek için yaygın olarak kullanıldığından, TRPV1 bu süreçte önemli bir rol oynamaktadır (195). TRPV1 antagonisti olan kapsazepin bir enterit modelinde inflamasyon gelişimini önemli ölçüde inhibe etmiştir (196). TRPV1 mast hücrelerinde de (197) sentezlenir ve duyu nöronlarında olduğu gibi TRPV1 sensitizasyonunun bu hücrelerin aktivasyonuna

aracılık edebileceği düşünülmektedir. Mast hücrelerinden histamin, serotonin ve proteazların salınması, artmış lokal kan akımı veya ödem aracılığıyla ve nosiseptörleri harekete geçirerek hiperaljeziye katkıda bulunabilmektedir.

2.6.4. Migren patofizyolojisinde TRP kanallarının rolü

TRPV1, TRPM8 ve TRPA1 kanallarının migren patofizyolojisi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Trigeminal nöronlarda TRPV1'in ifadesi ve işlevinin modülasyonu, bu kanalın migren patofizyolojisinin gelişmesinde rol aldığını önermektedir (173). Nöronlarda TRPV1 aktivasyonu trigemino-vasküler uyarımın oluşmasında önemli bir nöropeptid olan CGRP'nin salınmasına yol açmaktadır (173). Ayrıca TRPV1 antagonistlerinin sıçanlarda migren benzeri semptomların hafifletilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (198). Bu temel ve preklinik bulgulara dayanarak, migren baş ağrısı durumları için klinik araştırmalarda bir dizi TRPV1 modülatörü araştırılmıştır. Şu ana kadar, teşvik edici sonuçlar veren tek ilaç, epizodik küme baş ağrısı durumları için, kanal agonisti olan zikapsaisin olmuştur (199). Diğer taraftan TRPM8' in bir gen varyantının kadınlarda migren duyarlılığı ile pozitif bir korelasyon gösterdiği bulunmuştur (200). Bununla birlikte, bu varyantın TG nöronlarında herhangi bir işlevsel ve nosiseptif değişikliğe neden olup olmadığı bilinmemektedir ve migren patofizyolojisine doğrudan katılımı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. TRPA1, trigeminal nöronlarda sentezlenmekte ve dural afferentlerde lokalize olmaktadır ve TRPA1 aktivasyonunun farelerde baş ağrısı benzeri davranışlara neden olduğu bildirilmiştir (104, 201). Bir NO donörü olan nitrogliserin gibi deneysel ilaçlar, migreni tetikleyici özellikleri nedeniyle kapsamlı olarak incelenmiştir. Hem insanlarda hem de hayvanlarda, NO, TRPA1'i doğrudan S-nitrozilasyon yoluyla aktive eder ve dolayısıyla trigeminal uyarılma ve migren için bir mekanizma görevi görebilmektedir (171). Başka bir yeni çalışma, kemirgenlerde trigeminal sinir-sıkıştırma yaralanması modeli altında monosit/makrofaj kaynaklı oksidatif stres koşulları yoluyla TRPA1 aktivasyonunun önemli rolünü göstermiştir (202). Dolaylı olarak, küme tipi baş ağrısı ve migrende TRP kanallarının rolünü öne süren ilk bulgulardan biri, kapsaisin'in nazal mukoza üzerine topikal olarak

uygulanmasının ağrıya karşı duyarsızlaştırıcı etkisi olduğunu göstermiştir (203, 204). Kapsaisin tedavisi tekrar tekrar uygulandıktan sonra hem kanal aktivasyonundan gelen aferent yolu, hem de nosiseptif sinyaller gönderdiği "duysal nöropeptid salınımına" yol açan "efferent" fonksiyonunu desensitize etmektedir (205). Trigeminal sinirde, kapsaisin, duyarsızlaşmaya, periferik ve muhtemelen santral sinir uçlarının işlevsizleşmesine neden olmaktadır, böylece dura mater' deki SP/NKA' ya bağlı plazma protein ekstrasvazasyonu, meningeal arteriollerin CGRP bağımlı dilatasyonu ve afferent nosiseptif uyarıların önlenmesi sağlanır. TRPV4 plazma membranının gerilmesine ve mekanik distansiyona neden olan hipoozmotik uyarılar tarafından uyarılır. Bu etki ilke olarak baş ağrısı atakları sırasında migren hastalarında sıkça rastlanan zonklama ağrısı ile ilişkilendirilebilirse de baş ağrısı modelinde TRPV4'ü destekleyen hiçbir kanıt bildirilmemiştir. Buna karşılık, TRPA1 ile migren arasında olası bir ilişki hakkında son zamanlarda bir dizi gözlemsel bulgu elde edilmiştir. Bu açıdan, sigara dumanı, amonyum klorür, formaldehit, klor, sarımsak ve diğerleri gibi yakın geçmişte TRPA1 agonistleri olarak tanımlanan bazı bileşiklerin duyarlı kişilerde migren ataklarını tetikledikleri bildirilmiştir (206-209).



Şekil 2.6. CGRP salınımının veya CGRP reseptör aktivasyonunun modülasyonu açısından antimigren ilaçların muhtemel etki mekanizmalarının şematik gösterimi. Benemei ve ark. (171)' dan alınmıştır.

2.6.5. Geçici reseptör potansiyeli V1 (TRPV1)

TRPV1 periferik nosiseptörlerde aşırı derecede eksprese edilir (150, 151). Nöronal TRPV1 ekspresyonunun, primer duyu gangliyonundaki nosiseptörlerle sınırlı olduğu ve merkezi sinir istemindeki ekspresyonunun kaudal hipotalamus dahil sadece ayrı beyin bölgeleri ile sınırlı olduğu ve bu kanalın termoregülasyonda rolü olduğu bildirilmiştir (210). TRPV1 kanalı, zararlı ısı ve insanlarda yanma hissi oluşturan biberlerin özü olan kapsaisin gibi kimyasal maddeler tarafından aktive edilir (152). Etkinliği, düşük hücre dışı pH ile güçlenmekte ve bu kanalın iskemik ve inflamatuvar olaylara bağlı olarak ağrıya neden olduğu düşünülmektedir (153). Dolayısıyla TRPV1 kanalları, ağrı oluşturan nosiseptörlerin aktivasyonuna neden olabilecek uyarıların dönüştürücüleridir (211). TRPV1 kanalı aynı zamanda nosiseptif sinyalizasyonun bir moleküler integratörüdür. TRPV1'in, nosiseptif liflerin merkezi terminallerinde bulunduğu ve aktivitesinin, postsinaptik ağrı aktarım yollarının aktivasyonunu ve

duyarlılığını arttırdığı bilinmektedir (212). Klinik olarak, dural sinir liflerinde ve aynı zamanda dura materden geriye dönük olarak etiketli trigeminal gangliyon hücresi gövderlerinde TRPV1 gösterilmiştir (213). Kapsaisin, dural damarları TRPV1 aracılığıyla genişletmekte (155) ve kapsaisin'in sıçan dura materine uygulanması, trigeminal ganglion nöronlarında ERK aktivasyonuna yol açmakta ve baş ağrısı ile tutarlı davranışsal tepkiler oluşturmaktadır (18, 19, 214). Sumatriptan TRPV1 kanalını da inhibe edebilmektedir (215). Bu nedenle TRPV1'in modülasyonu, sumatriptanın migren için etkinliği olan mekanizmalar arasında sayılabilir. TRPV1, anandamid gibi endokannabinoidler, N-araşidonil dopamin (NADA) gibi endovanilloidler ve lipoksijenaz yolağının çeşitli lipid ürünleri ile de aktive edildiği ve ayrıca bradikinin, sinir büyüme faktörü ve prostaglandinlerle modüle edildiği bilinmektedir TRPV1'i hedef alan potansiyel terapiler arasında ağrı, idrar kaçırma dürtüsü, astım, öksürük, irritabl bağırsak sendromu ve diğerleri sayılabilir (216). TRPV1'in aktivasyonu başlangıçta ısı ve ağrı hissi oluşturur, ancak devamında nosiseptif sinyalleri ileten aferent liflerin uzun süre devam eden duyarsızlaşmasına neden olabilmektedir. Bunun sonucu olarak, desensitizasyon stratejisi, kapsaisin kremi (Zostrix) ve yüksek konsantrasyon yamaları (Qutenza) gibi kapsaisin içeren ajanlar, TRPV1 terapisinde kullanılmıştır. Bunlara ek olarak alternatif bir strateji ise kanaldaki transdüksiyonu antagonistlerle engellemektir. Desensitizasyon yoluyla tüm nosiseptörde işlevin inhibisyonunu teşvik eden agonistlerin aksine, TRPV1 antagonistleri sadece kanalın aktivasyonunu bloke eder ve diğer potansiyel pronosiseptif mediatörlerin etkilerini engellemezler. TRPV1 antagonistleri olarak birçok molekül geliştirilmiş ve bunların bazıları insan denemelerine geçmiştir (217). Bununla birlikte, migren için TRPV1'e dayalı tedaviler geliştirilmiştir. Burun için TRPV1 agonisti Sivamid, migrende etkili olmuş ve küme baş ağrısı atakları sıklığını azaltmıştır (218). Ayrıca intranazal kapsaisin uygulaması migren için de etkili olmuştur. Bununla birlikte, burun boşluğundaki TRPV1 aktivasyonuna bağlı gelişen yan etkiler sonuçta bu ajanların klinik potansiyelini sınırlandırmaktadır (219). TRPV1 antagonistleri, baş ağrısı ile ilgili birçok klinik öncesi modelde de test edilmiştir, ancak sonuçlar tutarsız olmuştur. Sistemik olarak verilen bir TRPV1 antagonisti SB-705498, mekanik, elektriksel ve kimyasal uyarılarla duranın uyarımını takiben nükleus kaudalis'teki nöronal aktiviteyi azaltırken diğer bir TRPV1 antagonisti kapsazepin aracılığıyla, kapsaisinin

oluşturduğu dural damar genişlemesi önlenmiştir (155, 213). Buna karşılık, başka bir TRPV1 antagonisti olan A993610' un sistemik uygulanması, benzer deneylerde hiçbir etkiye sahip değildir (220).

2.6.6. Geçici reseptör potansiyeli V4 (TRPV4)

Dural afferentler mekanik uyarıya duyarlı oldukları ve ekstrasellüler ozmolarite değişiklikleri ile uyarılabildiğinden, baş ağrısına katkıda bulunan süreçlerde, dural afferentlerde bulunan mekano ve ozmo-duyarlı TRPV4 kanalının migren baş ağrısı ile ilişkili olabileceği birçok araştırmada vurgulanmıştır (84,156). TRPV4 mRNA' sı, trigeminal gangliyon nöronlarında eksprese edilmektedir ve TRPV4 aktivasyonunun fonksiyonel etkileri trigeminal nöronlarda in vitro olarak gösterilmiştir (221). Çalışmalarda TRPV4'ten yoksun olan fareler hem ozmotik hem de basınç hissinde bir kayıp sergilemiştir (23, 222). TRPV4, proinflamatuvar mediatörler tarafından duyarlı hale getirilebilir ve inflamasyon koşullarında mekano-duyarlılığı artırılabilir. Baş ağrısında TRPV4'ün rolünü destekleyen en doğrudan kanıt, TRPV4'ün hipotonik solüsyonlara ve TRPV4 aktivatörü 4aPDD'ye cevaben retrograd olarak işaretli dural afferentler üzerinde meydana gelen akımlara benzer, potansiyellere yol açtığını gösteren çalışmadan gelmiştir (24). Dural TRPV4'ün sıçanlarda aktifleştirilmesi de baş ağrısıyla tutarlı davranış cevaplarına yol açmıştır (24). Ozmolaritede değişikliklerin baş ağrısına katkıda bulunup bulunmadığı bilinmemekle birlikte, öksürük, hapsirme, rutin fiziksel aktivite veya pozisyonda veya duruşta basit değişikliklerle birlikte ani baş hareketlerini takiben intrakraniyal basınçta meydana gelen değişikliğin duranın mekanik uyarımına yol açarak migren hastalarında baş ağrısını kötüleştirdiği bilinmektedir (223). TRPV4 bu yanıtlara katkıda bulunabilir ve bu nedenle TRPV4 temelli tedaviler, migren hastalarında mekanik olarak uyarılan ağrıyı hafifletebilir.

2.6.7. Geçici reseptör potansiyeli A1 (TRPA1)

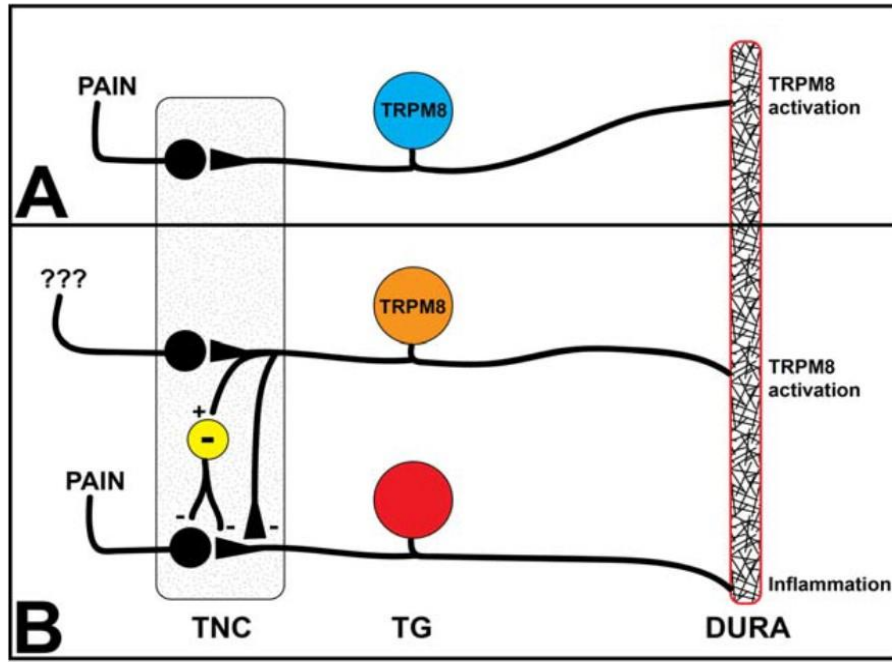
Migren ile ilişkili olduğu önerilen en ilgi çekici TRP kanallarından biri TRPA1'dir. TRPA1, kolonu innerve eden sinirler de dahil olmak üzere periferik duyu

nöronlarında ve solunum sisteminin tahrişini bildiren solunum yollarını innerve eden nöronlarda eksprese edilmektedir (224). TRPV1 ile duyu nöronlarında sıklıkla eksprese edilmektedir ve ayrıca TRPV1 gibi TRPA1' in aktivasyonu da SP ve CGRP salınmasına yol açabilir (172). TRPA1'i aktive edebilen mediatörler primer afferentlerin merkezi terminallerinde eksprese edilebilir. Periferik duyu sinir hücrelerinin aktivasyonunun hem lipoksigenaz hem de sitokrom P450-epoksijenaz ürünlerini merkez terminallerde serbest bıraktığı ve her ikisinin de TRPA1'i aktive edebileceği düşünülmektedir (225). TRPA1 antagonistlerinin birçok preklinik ağrı modelinde etkinliği gösterilmiştir (254). Kanalin aktivasyonu, çevresel iritanlar olan formaldehit, akrolein, klor ve sigara dumanı özütü, izotiyosiyanatlar, sinnamaldehit ve allisin gibi doğal ürünler ve oksidatif endojen yan ürünler gibi çeşitli dışsal ve endojen maddeler tarafından ve nitro-oleik asit, 4-hidroksinonenal ve reaktif prostaglandinler tarafından uyarılmaktadır (207, 221). Bu TRPA1 aktive edicilerin bazılarının migrenin tetiklenmesinde rol oynayabileceği ve aslında çevresel TRPA1 aktivatörlerinin bazılarının iyi bilinen migren tetikleyicileri olduğu sonucuna varılmıştır (146-148). Baş ağrısı patofizyolojisinde TRPA1'in rolü olduğunu kanıtlayan preklinik çalışmalar gittikçe artmaktadır. Kemirgenlerde tespit edilen dural afferentlerde TRPA1 immünreaktivitesi ve fonksiyonel TRPA1 benzeri akımlar bulunmuştur (104, 226).

2.6.8. Geçici reseptör potansiyeli M8 (TRPM8)

Farelerde, trigeminal gangliyon (TG) ve dorsal kök gangliyonunda (DRG) primer afferent nöronlardaki TRPM8 ekspresyonu, embriyonik 14.5 gün civarında başlamakta ve 18.5 güne kadar erişkin primer afferent nöronlarda bulunan seviyeye ulaşmaktadır (227). Yetişkin farelerde TRPM8, küçük çaplı primer afferent nöronların farklı bir popülasyonunda bulunur. Bununla birlikte, TRPM8 içeren primer afferent nöronların yalnızca küçük bir yüzdesi, CGRP ve TRPV1 kanallarını eksprese etmektedir (164). TRPM8' i eksprese eden TG popülasyonunda, nöronların yaklaşık yarısı TG'nin V3 bölümünde lokalizedir ve geriye kalan yarısı V1 ve V2 bölümleri arasında eşit olarak dağılmıştır (197, 226). TRPM8 superior servikal ganglionun sempatik nöronlarında eksprese edilmemektedir (228). TRPM8 kanallarını eksprese

eden primer afferent nöronlar düzenli olarak cilt, ağız boşluğu, dişler, tat tomurcuğu ve kornea da dahil olmak üzere soğuk uyaranlara sahip birçok periferik dokuyu innerve eder. Dudaklar, çiğneme kasları ve temporomandibular eklemler çoğunlukla TRPM8 eksprese eden liflerden yoksundurlar. TRPM8, kalın bağırsak ve mesane gibi derin dokulara uzanan primer afferent nöronlarda da eksprese edilir (229).



Şekil 2.7. Dura mater' deki TRPM8 aktivasyonunun pronosiseptif veya antinosiseptif olabileceğinin şematik gösterimi. Dussor ve Cao (20)' dan alınmıştır. TNC: trigeminal nükleus.

2.7. Voltaj bağımlı potasyum kanalları

Voltaja bağımlı/duyarlı iyon kanallarının birden fazla tipi nöronal uyarılma ile ilişkilidir. Bunlar arasında, voltaja duyarlı potasyum (K^+v) kanalları, nosiseptif duyu nöronları gibi eksitasyonun meydana geldiği dokularda membran potansiyelleri ve aksiyon potansiyelinin önemli fizyolojik düzenleyicileridir (230, 231). Dorsal kök ganglionu (DRG) ve trigeminal gangliyon (TRG) nöronları, yavaş inaktive edici, hızlı inaktive edici ve yavaş olmak üzere üç farklı K^+v kanalını değişik miktarlarda sentezlerler. Sırasıyla tetraetilamonyum (TEA), 4-aminopiridin (4-AP) ve α -dendrotoksin (α -DTX) K^+v kanallarını bloke etmektedir (232, 233). Periferik sinir yaralanması ve inflamasyon, K^+v kanallarının yoğunluğunu belirgin şekilde düşürmekte ve nöropatik / inflamatuvar ağrı gelişiminde rol oynamaktadır. K^+v kanallarının açılması hücre zarının hiperpolarizasyonu ve hücre eksitabilitesinde sonuçta bir düşüşe yol açtığı için, bu tür ağrı yolları için çeşitli K^+v kanalları potansiyel hedefler olabilirler. Çeşitli ağrı modelleri kullanılarak yapılan son çalışmalar, nöropatik ve inflamatuvar ağrıda, voltaj kapılı KCNQ / Kv7 kanalı açıcı ve kalsiyum ile aktive edilen (KCa) veya ATP'ye duyarlı potasyum (KATP) kanallarının potansiyel terapötik hedefler olduğunu bildirmiştir (234, 235). Primer afferentlerdeki aksiyon potansiyellerinin soma ve periferik ve merkezi terminallerden salınan nörotransmitter miktarını etkilediği iyi bilinmektedir (233, 234). Aksiyon potansiyeli süresi ve ateşleme frekanslarının artması, voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının açık kalma süresini uzatır ve hücre gövdelerinden ve/veya periferik ve merkezi terminallerden salınan nörotransmitter miktarında bir artışa neden olmaktadır. Bu nedenle, merkezi terminallerden salınan nörotransmitter miktarının artırılması muhtemelen trigeminal spinal nükleus nöronlarında ikinci sıra nosiseptif nöronların aşırı aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır (236, 237). Ayrıca TG nöronlarının hücre gövdesinden salınan nörotransmitter / nöromodülatörlerin (örneğin SP) parakrin veya otokrin mekanizma ile artırılması, komşu TG nöronlarını aktive edebilir.

2.7.1. Voltaj bağımlı potasyum kanal açıcıları ve migren

Levcromakalim ve pinasidil gibi sentetik K_{ATP} kanal açıcıları, klinik çalışmalarda olumsuz yan etki olarak baş ağrısına neden olmaktadır. Bununla birlikte, nöronal K_{ATP} kanallarının açılmasının, ağrı hayvan modellerinde antinosiseptif mekanizmalarda yer alan bir olay olduğunu göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, kromakalim ve pinasidil'in merkezi olarak uygulanmasının subkutan morfinin tetiklediği antinosisepsiyonu güçlendirdiği bildirilmiştir (238-240). Buna ek olarak, morfin ve metadon da dahil olmak üzere güçlü antinosiseptif ajanların, supraspinal, spinal ve periferik seviyelerde K_{ATP} kanallarının aktivasyonu yoluyla nöronal eksitabilitiyi azalttığı gösterilmiştir (238, 241). Ayrıca çalışmalardan gelen bilgiler, K_{ATP} kanal açıcılarının antinosiseptif etkilere orta derecede endojen opioid salınımıyla aracılık edebileceğini de önermektedir (242, 243). Böylece, klinik deneyler sırasında verilen sentetik K_{ATP} kanal açıcıları, muhtemelen duysal nöronal K_{ATP} kanallarıyla doğrudan etkileşimi içermeyen bir mekanizma ile baş ağrısı oluşturmaktadır. Bu nedenle antinosisepsiyonu sadece periferik olarak değil de merkezi olarak uygulandığında oluşturabilirler. Fizyolojik koşullar altında bu kanal açıcıların kan-beyin bariyerini geçemedikleri önerilmektedir (243, 244). Diğer taraftan trigeminal sistemin nöronal yapıları arasında TG, kan-beyin bariyerinin dışında bulunur ve klasik K_{ATP} kanal açıcıları için serbestçe erişilebilirdir.

2.8. Mevcut migren tedavileri

Migrenin henüz tam olarak iyileşme sağlayan etkin bir tedavisi bulunmamaktadır (245-250). Mevcut migren tedavisi tipik olarak abortif ve profilaktik şeklindedir. Baş ağrısı başlangıcında veya aura fazında abortif ajanların ağrıyı durdurduğu veya azalttığı kabul edilmektedir. Profilaktik terapilerde ise 5 in üzerinde olan aylık atak sayıları düşürülmektedir (96). Abortif terapilerde en yaygın kullanılan ilaçlar triptanlar ve nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlardır (NSAID) (251-253). 5HT_{1b} ve 5HT_{1d} agonist ailesini içeren triptanlar mevcut olup bunların da sumatriptan, zolmitriptan, rizatriptan, eletriptan, ve naratriptan gibi üyeleri bulunmaktadır. Migren için yazılan reçetelerin %80 den fazlasını, tek başına bu

triptanlar oluşturmaktadır (248-250). Triptanlar bu kadar yaygın olarak kullanılmalarına rağmen tamamen etkili olamamaktadır. Örneğin; 10 mg rizatriptan alan hastaların %40'ında ve 2.5 mg frovatriptan alan hastaların %12'sinde ağrının 2 saat sonra ancak kaybolabildiği bildirilmiştir (251). Ayrıca, triptanlar vazokonstriktif özelliğe sahip oldukları için hastalarda yan etki olarak anormal kan basıncına ve kardiyovasküler komplikasyonlara yol açtıklarından dolayı kullanımı azaltılmak istenmektedir (252). Bir diğer sorun ise baş ağrılarında aşırı doz triptan kullanılmasıdır. Triptanın aşırı kullanımı ile baş ağrısı daha da kötüleşmekte veya etkisi geçtikten sonra baş ağrısı frekansında artma olmaktadır (248, 253, 254). Bundan dolayı, akut tedavide triptanların günlük kullanım için koruyucu ajan olarak kullanılması tavsiye edilmemektedir (96). Baş ağrılarında aşırı kullanılan ilaçların yanı sıra, NSAİİ'ler veya asetaminofen gibi ilaçlar da migren hastaları tarafından kullanılmaktadır (255, 256). Yukarıda belirtildiği gibi, profilaktik migren tedavisinde migren ataklarını önlemek için ya da frekansı azaltmak için günlük olarak verilmektedirler. Sık kullanılan profilaktik ajanlar arasında antiepileptikler de vardır. Bunlar topiramat, gabapentin, valproat veya propranolol gibi beta blokörlerdir. Ayrıca amitriptilin gibi antidepresanlar da kullanılmaktadır. Hastaların %40-50'sinde propranolol, valproate ve topiramatin kullanımı migren sıklığında %50 azalmaya neden olabilmektedir (251). Ancak, profilaktik tedavide kullanılan ilaçlara (propranolol haricinde) bağlı olarak çok sayıda olumsuz yan etki olmasından dolayı hastalar tarafından genellikle iyi tolere edilememektedir. Bu yan etkiler arasında bilişsel fonksiyonlarda önemli ölçüde azalma, bulantı, kusma, kilo artışı ve yoksunluk belirtileri bulunmaktadır (96, 246, 249). Her iki ajan türü için de yukarıda belirtilen istatistikler dikkate alındığında birçok hastada rahatlama gözlemlenmektedir.

2.8.1. Migren tedavisinde yeni hedefler

2.8.1.1. CGRP antagonistleri

CGRP mekanizmasını bloke edici, antagonistler, "gepanlar" ya da monoklonal antikörler, gelişmekte olan tedaviler içerisinde bazı avantajlara sahip olan bir ilaç grubunu oluşturmaktadır. Bu avantajlardan birincisi, serebral veya koroner vasküler

hastalığı olan hastalar tarafından diğer migren terapilerinin kullanılmasını engelleyen vazokonstriktör etkileri bulunmamaktadır. İkincisi, antihipertansifler, anti-depresanlar ve antiepileptikleri içeren önleyici tedbirlerin aksine belirli bir migren mekanizmasını hedeflemektedirler. Üçüncüsü, CGRP'yi veya reseptörünü hedef alan hem akut hem de önleyici tedavi için geliştirilen çeşitli ajanların en verimli sınıfı olarak görülmektedirler (255).

2.8.1.2. Serotonin 5HT1F agonistleri

Triptanlar, 5-HT1B reseptörleri vasıtasıyla vazokonstrüksiyona yol açabilen güçlü serotonin 5-HT1B /1D reseptör agonistleridir. 5-HT1F reseptörlerinin aktivasyonu, vasküler etkileri olmayan trigeminal nukleus kaudalinde, nöronal aktivasyonun bir belirteci olan c-Fos ekspresyonunu azaltmaktadır. Böylece, seçici 5-HT1F reseptör agonistleri, kontrendikasyonları triptanlara eşlik etmeyen başka bir akut migren tedavi sınıfında yer almaktadır. LY333470'in akut migren için etkili olmasına rağmen baş dönmesi ve uyuşukluk gibi yüksek merkezi sinir sistemi ile ilişkili yan etkileri bulunmaktadır (256).

2.8.1.3. Aside duyarlı iyon kanalları

Aside duyarlı iyon kanalları (ASIC'ler) protonlara cevap veren ve aktiflendiğinde Na^+ veya Ca^{2+} geçişini sağlayan nöronal kanallar olarak tanımlanmaktadır. ASIC1 mekanik iletimden nöroproteksiyona kadar uzanan çeşitli süreçlerde görev alan ve merkezi sinir sisteminde bulunan bir aside duyarlı kanaldır (257, 258). Amilorid, kortikal yayılan depresyonu bloke eden nonspesifik bir sodyum kanalı inhibitörüdür, migren patofizyolojisinde önemli olan uzun süreli baskılanmayı takiben oluşan uyarı dalgası bir ASIC1 mekanizması vasıtasıyla gerçekleşmekte ve ASIC1 gen delesyonlu farelerde bu durum ortadan kalkmaktadır (259).

2.8.1.4. Glutamat reseptör antagonistleri

Glutamat beynin başlıca eksitatör nörotransmitteridir ve metabotropik ve iyonotropik reseptörleri vardır. Bunlardan N-metil-D-aspartat (NMDA), a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izozolpropionik asit (AMPA) ve kainat iyonotropik reseptörlerindendir. Glutamat, trigeminal gangliyonda 5-HT/1D/1F reseptörlerini sentezleyen nöronlardan salınır ve trigeminovasküler aktivasyon, merkezi duyarlaşma ve kortikal yayılan depresyon da dahil olmak üzere hem migren hem de aura patofizyolojisinde rol oynamaktadır (260-263).

2.8.1.5. Nitrik oksit sentaz inhibitörleri

Nitrik oksit sentaz (NOS), trigeminovasküler liflerde CGRP salınımına neden olabilen gaz formundaki vazodilatatör nitrik oksit (NO) üretilmesine aracılık eden bir enzimdir (263). NO donörü olan nitrogliserin infüzyonları, insanlarda spontan ataklara benzeyen baş ağrısını tetikleyebilmektedir (264). Üç farklı NOS tanımlanmıştır bunlar; endotelial (eNOS), nöronal (nNOS) ve indüklenebilir (iNOS) formlardır. Bir iNOS inhibitörü olan GW274150' nin migrenin akut veya önleyici tedavisi için etkinlik göstermede başarısız olduğu bildirilmiştir (263-266).

2.8.1.6. Geçici reseptör potansiyel kanalları (TRP)

Geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanalları, ısı, soğuk veya kapsaisin gibi belirli kimyasal maddeleri de içeren bir dizi uyarıya yanıt veren iyon kanallarının süper ailesinin üyeleri içinde yer almaktadır. Trigeminal gangliyonda CGRP ile birlikte bulunan vaniloid (TRPV1) ve ankirin (TRPA1) reseptörlerini içeren bir takım alt tipleri vardır (149, 267). Bu kanallardan TRPV1, TRPA1, TRPV4 ve TRPM8' in migren patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığına dair çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Mevcut bulgular TRP antagonistlerinin ileride migren tedavisi için umut vadeci ajanlar olduğuna dikkat çekmektedir. Ancak bu konudaki çalışmalar henüz

çok yeni ve sayıca yetersiz olduğundan TRP kanalları antagonistlerinin migren tedavisinde kullanılabilmeleri için çok sayıda deneysel ve klinik çalışmaya ihtiyaç vardır.



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Sunulan çalışmada 39 adet 180-200 gram ağırlığında wistar erkek sıçan kullanılmıştır. Her bir örnek için kranyum iki yarıya bölündüğünden sonuçta çalışma 78 örnek üzerinden gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar ve çalışmada kullanılan sarf malzemeler Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenen 2017.08.02.1212 nolu proje kapsamında temin edilmiştir. Çalışma için Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu'ndan etik onay alınmıştır (karar no: 2017/09). Çalışmada kullanılan sıçanlar, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden satın alınmıştır ve ex-vivo çalışmalar Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalında bulunan Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

TRPV1 agonisti Capsaicin, TRPM8 agonisti Menthol, TRPA1 agonisti Cinnamaldehyde, TRPV4 agonisti 4 α -Phorbol 12,13-didecanoate (4 α PDD), TRPV1 antagonist Capsazepine, TRPA1 antagonist HC-030031, TRPM8 antagonist AMTB, TRPV4 antagonist GSK-2193874 ve voltaj kapılı K^v⁺-kanal açıcısı Retigabine Sigma-Aldrich firmasından (Schnelldorf, Germany) ve CGRP Elisa Kitler ise ELABscience (Wuhan, P.R. China) firmasından satın alındı.

3.2. Deney grupları ve uygulanan işlemler

3.2.1. Agonist gruplar

1. TRPV1 grubu (n=3 sıçan=6 hemikranyum): Bu gruptaki sıçanlardan elde edilen ex vivo hemiskull (n=6) preparasyonlarına önce yıkama yapılmak amacıyla (stabilizasyon için) 300 μ l yBOS konularak 15 dakika boyunca +37 °C' de inkübe edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve yıkama işlemi sonrasında bu sıvı

atıldı. Yeniden yBOS (kontrol için, 300 µl) uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi, bu sıvı ependorf tüpe alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı, aynı preparasyona TRPV1 agonisti olan Capsaicin (1µM, 300 µl) (329) uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve daha sonra bu sıvı da alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı. Bu grubun oluşturulmasındaki amaç, TRPV1 kanalının meninkslerde total CGRP salınımına etkisini araştırmaktır.

2. TRPA1 grubu (n=3 sıçan =6 hemikranyum): Bu gruptaki sıçanlardan elde edilen ex vivo hemiskull (n=6) preparasyonlarına önce yıkama yapılmak amacıyla (stabilizasyon için) 300 µl yBOS konularak 15 dakika boyunca +37 °C' de inkübasyon yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve yıkama işlemi sonrasında bu sıvı atıldı. Yeniden yBOS (kontrol için, 300 µl) uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi, bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı, aynı preparasyona güçlü bir TRPA1 agonisti olan Cinnamaldehyde (300 µM, 300 µl) (149) uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve daha sonra bu sıvı da alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı. Bu grubun oluşturulmasındaki amaç, TRPA1 kanalının meninkslerde total CGRP salınımına etkisini araştırmaktır.

3. TRPM8 grubu (n=3 sıçan =6 hemikranyum): Bu gruptaki sıçanlardan elde edilen ex vivo hemiskull (n=6) preparasyonlarına önce yıkama yapılmak amacıyla (stabilizasyon için) 300 µl yBOS konularak 15 dakika boyunca +37 °C' de inkübasyon yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve yıkama işlemi sonrasında bu sıvı atıldı. Yeniden yBOS (kontrol, 300 µl) uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı aynı preparasyona TRPM8 agonisti olan Menthol (300 µM, 300 µl) (330) uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve daha sonra bu sıvı da alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı. Bu grubun oluşturulmasındaki amaç, TRPM8 kanalının meninkslerde total CGRP salınımına etkisini araştırmaktır.

4. TRPV4 grubu (n=3 sıçan =6 hemikranyum): Bu gruptaki sıçanlardan elde edilen ex vivo hemiskull (n=6) preparasyonlarına önce yıkama yapılmak amacıyla (stabilizasyon için) 300 µl yBOS konularak 15 dakika boyunca +37 °C' de inkübasyon yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve yıkama işlemi sonrasında bu sıvı atıldı. Yeniden yBOS (kontrol, 300 µl) uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe

edildi bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı, aynı preparasyona güçlü TRPV4 agonisti olan 4 α -Phorbol 12,13-didecanoate (4 α PDD, 100 μ M, 300 μ l) (331) uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve daha sonra bu sıvı da alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı. Bu grubun oluşturulmasındaki amaç, TRPV4 kanalının meninkslerde total CGRP salınımına etkisini araştırmaktır.

3.2.2. Antagonist gruplar

1. Capsazepine + TRPV1 grubu (n=3 sıçan =6 hemikranyum): Bu gruptaki sıçanlardan elde edilen ex vivo hemiskull (n=6) preparasyonlarına önce yıkama yapılmak amacıyla (stabilizasyon için) 300 μ l yBOS konularak 15 dakika boyunca +37 °C' de inkübasyon yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve yıkama işlemi sonrasında bu sıvı atıldı. Sonra bir TRPV1 antagonisti olan Capsazepine (10 μ M, 300 μ l) (329) uygulandı 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi TRPV1 reseptörü bloke edildi ve bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı, bu işlem de 2 kez tekrarlandı sonrasında aynı preparasyona Capsazepine (10 μ M) ve TRPV1 agonisti Capsaicin (1 μ M) (329) birlikte uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve ardından bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı. Böylece meninkslerden muhtemel total CGRP salınımının TRPV1 reseptörü iyon kanalları üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediği doğrulanacaktı.

2. HC-030031 + TRPA1 grubu (n=3 sıçan =6 hemikranyum): Bu gruptaki sıçanlardan elde edilen ex vivo hemiskull (n=6) preparasyonlarına önce yıkama yapılmak amacıyla (stabilizasyon için) 300 μ l yBOS konularak 15 dakika boyunca +37 °C' de inkübasyon yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve yıkama işlemi sonrasında bu sıvı atıldı. Sonra bir TRPA1 antagonisti olan HC-030031 (50 μ M, 300 μ l) (149) uygulandı 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi TRPA1 reseptörü bloke edildi ve bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı, bu işlem de 2 kez tekrarlandı sonrasında aynı preparasyona HC-030031 (50 μ M) ve TRPA1 agonisti Cinnamaldehyde (300 μ M, 300 μ l) (149) birlikte uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve ardından bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de

saklandı. Böylece meninkslerden muhtemel total CGRP salınımının TRPA1 reseptörü iyon kanalları üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediği doğrulanacaktı.

3. AMTB + TRPM8 grubu (n=3 sıçan =6 hemikranyum): Bu gruptaki sıçanlardan elde edilen ex vivo hemiskull (n=6) preparasyonlarına önce yıkama yapılmak amacıyla (stabilizasyon için) 300 µl yBOS konularak 15 dakika boyunca +37 °C' de inkübasyon yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve yıkama işlemi sonrasında bu sıvı atıldı. Sonra bir TRPM8 antagonisti olan AMTB (10 uM) (332) uygulandı 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi TRPM8 reseptörü bloke edildi ve bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı, bu işlem de 2 kez tekrarlandı sonrasında aynı preparasyona AMTB (10 uM) ve TRPM8 agonisti Menthol (300 µM, 300 µl) (330) birlikte uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve ardından bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 C de saklandı. Böylece meninkslerden muhtemel total CGRP salınımının veya blokasyonunun (TRPM8 reseptörü CGRP salınımının aktivasyonun aksine blokasyonuna da yol açabilir) TRPM8 reseptörü iyon kanalları üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediği doğrulanacaktı.

4. GSK-2193874 + TRPV4 grubu (n=3 sıçan =6 hemikranyum): Bu gruptaki sıçanlardan elde edilen ex vivo hemiskull (n=6) preparasyonlarına önce yıkama yapılmak amacıyla (stabilizasyon için) 300 µl yBOS konularak 15 dakika boyunca +37 °C' de inkübasyon yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve yıkama işlemi sonrasında bu sıvı atıldı. Sonra bir TRPV4 antagonisti olan GSK-2193874 (10 µM, 300 µl) (333) uygulandı 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi TRPV4 reseptörü bloke edildi ve bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı, bu işlem de 2 kez tekrarlandı sonrasında aynı preparasyona GSK 2193874 (10 µM) ve TRPV4 agonisti 4αPDD (100 µM, 300 µl) (331) birlikte uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve ardından bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı. Böylece meninkslerden muhtemel total CGRP salınımının TRPV4 reseptörü iyon kanalları üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediği doğrulanacaktı.

3.2.3. Retigabine grupları

1. Retigabine (n=3 sıçan =6 hemikranyum): Bu gruptaki sıçanlardan elde edilen ex vivo hemiskull (n=6) preparasyonlarına önce yıkama yapılmak amacıyla (stabilizasyon için) 300 µl yBOS konularak 15 dakika boyunca +37 °C' de inkübe edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve yıkama işlemi sonrasında bu sıvı atıldı. Yeniden yBOS (kontrol için, 300 µl) uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi, bu sıvı kontrol olarak ependorf tüpe alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı. Daha sonra voltaj kapılı Kv+ kanalı açıcısı olan Retigabine (10 µM, 300 µl) (334) uygulandı 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı. Bu grubun oluşturulmasındaki amaç, Kv+ kanal açıcısı Retigabine' in menisklerdeki trigeminal sinir uçlarından salınan CGRP' nin bazal salınımı üzerine etkisini araştırmaktır.

2. Retigabine + TRPV1 grubu (n=3 sıçan =6 hemikranyum): Bu gruptaki sıçanlardan elde edilen ex vivo hemiskull (n=6) preparasyonlarına önce yıkama yapılmak amacıyla (stabilizasyon için) 300 µl yBOS konularak 15 dakika boyunca +37 °C' de inkübasyon yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve yıkama işlemi sonrasında bu sıvı atıldı. Sonra voltaj kapılı Kv+ kanalı açıcısı olan Retigabine (10 µM, 300 µl) (334) uygulandı 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı. Bu işlemde 2 kez tekrarlandı. Aynı preparasyona Retigabine (10 µM) ve TRPV1 agonisti Capsaicin (1 µM) (329) birlikte uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı. Bu grubun oluşturulmasındaki amaç, muhtemel TRPV1 reseptörlerinin aktivasyonu ile sinir terminali içinde oluşan pozitif yük artışının Retigabine' in aktiflediği Kv+ kanalı aracılığıyla azaltılması ve böylece CGRP ekzositozunun önlenmeye çalışılmasıydı.

3. Retigabine + TRPA1 grubu (n=3 sıçan =6 hemikranyum): Bu gruptaki sıçanlardan elde edilen ex vivo hemiskull (n=6) preparasyonlarına önce yıkama yapılmak amacıyla (stabilizasyon için) 300 µl yBOS konularak 15 dakika boyunca +37 °C' de inkübasyon yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve yıkama işlemi sonrasında bu sıvı atıldı. Sonra voltaj kapılı Kv+ kanalı açıcısı olan

Retigabine (10 μ M, 300 μ l) (334) uygulandı 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı.Bu işlemde 2 kez tekrarlandı.Aynı preparasyona Retigabine (10 μ M) ve TRPA1 agonisti olan Cinnamaldehyde (300 μ M, 300 μ l) (149) birlikte uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı. Bu grubun oluşturulmasındaki amaç, muhtemel TRPA1 reseptörlerinin aktivasyonu ile sinir terminali içinde oluşan pozitif yük artışının Retigabine' in aktiflediği Kv+ kanalı aracılığıyla azaltılması ve böylece CGRP ekzositozunun önlenmeye çalışılmasıydı.

4. Retigabine + TRPM8 grubu (n=3 sıçan =6 hemikranyum): Bu gruptaki sıçanlardan elde edilen ex vivo hemiskull (n=6) preparasyonlarına önce yıkama yapılmak amacıyla (stabilizasyon için) 300 μ l yBOS konularak 15 dakika boyunca +37 °C' de inkübasyon yapıldı.Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve yıkama işlemi sonrasında bu sıvı atıldı.Sonra voltaj kapılı Kv+ kanalı açıcısı olan Retigabine (10 μ M, 300 μ l) (333) uygulandı 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı.Bu işlemde 2 kez tekrarlandı.Sonra aynı preparasyona Retigabine (10 μ M) ve TRPM8 agonisti olan Menthol (300 μ M, 300 μ l) (330) birlikte uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi ve bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı. Bu grubun oluşturulmasındaki amaç, muhtemel TRPM8 reseptörlerinin aktivasyonu ile sinir terminali içinde oluşan pozitif yük artışının Retigabine' in aktiflediği Kv+ kanalı aracılığıyla azaltılması ve böylece CGRP ekzositozunun önlenmeye çalışılmasıydı.

5. Retigabine + TRPV4 grubu (n=3 sıçan =6 hemikranyum): Bu gruptaki sıçanlardan elde edilen ex vivo hemiskull (n=6) preparasyonlarına önce yıkama yapılmak amacıyla (stabilizasyon için) 300 μ l yBOS konularak 15 dakika boyunca +37 °C' de inkübasyon yapıldı.Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve yıkama işlemi sonrasında bu sıvı atıldı.Sonra voltaj kapılı Kv+ kanalı açıcısı olan Retigabine (10 μ M, 300 μ l) (334) uygulandı 37 C' de 15 dakika inkübe edildi ve bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı.Bu işlemde 2 kez tekrarlandı.Aynı preparasyona Retigabine (10 μ M) ve TRPV4 agonisti olan 4aPDD (100 μ M, 300 μ l) (331) birlikte uygulanıp 37 °C' de 15 dakika inkübe

edildi ve bu sıvı alınarak CGRP analizi için -80 °C de saklandı. Bu grubun oluşturulmasındaki amaç, muhtemel TRPV4 reseptörlerinin aktivasyonu ile sinir terminali içinde oluşan pozitif yük artışının Retigabine' in aktiflediği Kv+ kanalı aracılığıyla azaltılması ve böylece CGRP ekzositozunun önlenmeye çalışılmasıydı.

****Tüm gruplardaki hemiskull preparasyonlarından elde edilen sıvı örnekleri, sıvı örneğinin içerisinde bulunan CGRP içeriklerinin degradasyona uğramaması için içerisinde proteaz inhibitör kokteyli bulunan ependorf tüplere alınmıştır.**

3.3. Ex vivo çalışmalar için yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) hazırlanması

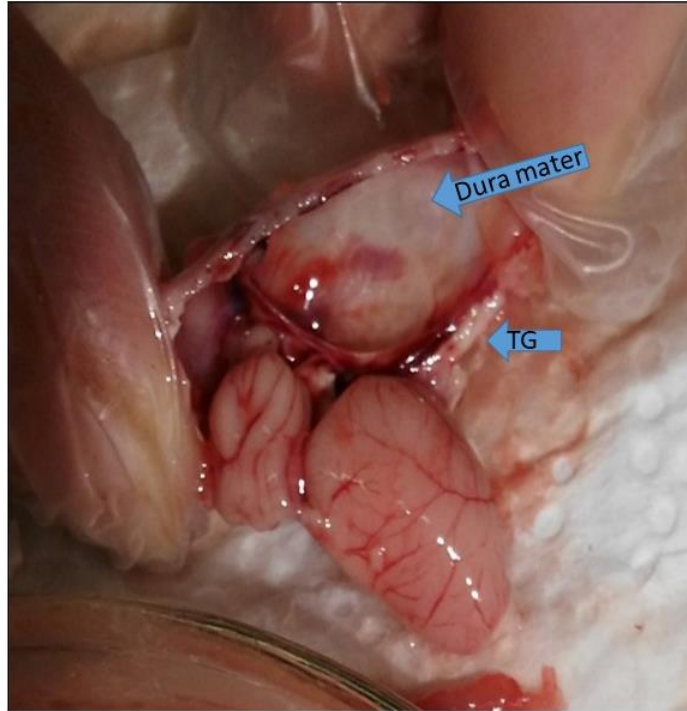
KCl (2,5 mM), NaHCO₃(30 mM), Glikoz (11 mM), Na₂HPO₄ (1mM), MgCl₂ (2 mM), NaCl (119 mM) , CaCl₂ (2 mM) maddeleri hassas terazide tartıldı ve distile su içerisinde çözülerek pH: 7,3' e ayarlandı ve solüsyon çalışma boyunca oksijenlendirildi.

3.4. Sıçanlardan hemi kranyum (hemi skull) preparatlarının hazırlanması ve CGRP ölçümü için meningeal sıvı örneklerinin elde edilmesi

Deney gruplarında hemi skull preparasyonlardan CGRP ölçümü için meningeal sıvı örneklerinin elde edilmesi için ketamin (90 mg/kg, i.p.) ile anestezi edilen sıçanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek kafaları kesildi ve elde edilen kafalar hemen buz içine kondu ve CGRP ölçümü için sıvı örneklerinin elde edileceği laboratuvar bölümüne getirildi. Burada kafa derisi yüzüldü ve yBOS içinde kafatası üzerindeki kaslar uzaklaştırılarak temizlenmesi sağlandı. Daha sonra kafa sagittal düzlem boyunca ortadan ikiye kesildi (resim 3.1) böylece kafatasına yapışık sol ve sağ yarım dura mater' ler ve trigeminal gangliyonlar zarar görmeden her bir sıçandan 2 adet hemi skull elde edilmiş oldu (resim 3.2). Her bir grup için 3 sıçan yani 6 örnek (hemi skull) kullanıldı.



Resim 3.1. Kranyumun sagittal düzlem boyunca ikiye bölünmesi.

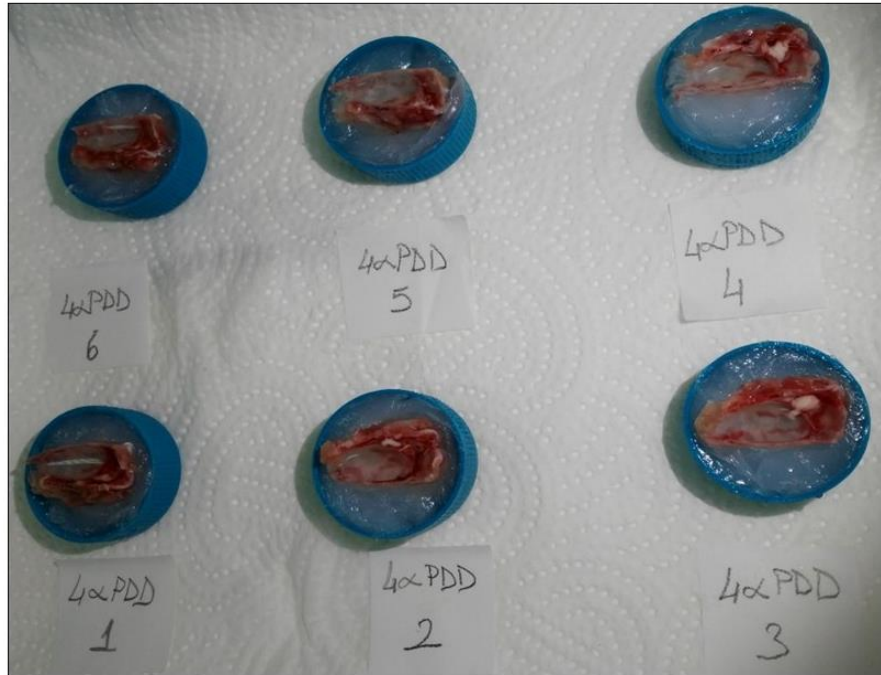


Resim 3.2. Sağlam dura mater ve trigeminal gangliyona sahip hemi skull (hemi kranyum), TG: trigeminal gangliyon.

Her bir deney grubu için 6 hemi skull hazırlandı ve yapay beyin omurilik sıvısı ile sürekli perfüze olan ve sürekli oksijenlenen plastik küvet içerisinde 30 dakika boyunca süperfüzyon işlemine tabi tutuldu (resim 3.3). Daha sonra bu hemiskull preparasyonları ilgili agonist ve antagonistlerin uygulanması için içinde vazelin bulunan petri kaplarına fikse edildiler (resim 3.4). Hemi skull boşluğuna ilk olarak trigeminal sinir uçlarındna salınan CGRP' nin stabilizasyonunu sağlamak ve kontrol şartlarına getirmek amacıyla 300 µl yBOS konularak 15 dakika boyunca +37 °C' de inkübasyon yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve bu işlemler sonrasında hemikranyum boşluğundaki sıvı atıldı. Ardından hemi skull boşluğuna bazı gruplarda (A-Agonist Grubu) kontrol olarak 300 µl yBOS tek başına uygulanırken, bazı gruplarda (B-Antagonist grubu ve C-Retigabine grubu) ise kontrol olarak 300 µl yBOS içinde çözülmüş ilgili antagonistler veya Kv⁺ kanal açıcısı uygulanarak 15 dakika +37 °C' de inkübe edildi ve işlem sonrasında hemi kranyumlardan alınan meningeal sıvılar eppendorf tüplere alınarak ELISA yöntemi ile CGRP tayin yapılana kadar -80 °C 'de saklandı. Kontrol grupları için yapılan bu işlem 2 kez tekrarlandı. Devamında ise farklı deney gruplarında bahsedilen agonistler, agonist+antagonistler ve Retigabine+agonistler ayrı ayrı uygulanarak +37 °C' de 15 dakika inkübe edildikten sonra hemi kranyumlardan alınan meningeal sıvılar eppendorf tüplere alınarak ELISA yöntemi ile CGRP tayini yapılana kadar -80 °C 'de saklandı. Agonistler için uygulanan protokolde TRPV1 kanal agonistti olarak 1µM Capsaicin, TRPA1 kanal agonistti olarak 300µM Cinnamaldehyde, TRPM8 kanal agonistti olarak 300µM Menthol, TRPV4 kanal agonistti olarak 100µM 4αPDD kullanılarak her bir agonist için ayrı ayrı gruplar oluşturuldu. Antagonistler için uygulanan protokolde TRPV1 kanal antagonistti olarak 10 µM Capsazepine, TRPA1 kanal antagonistti olarak 50 µM HC-030031, TRPM8 kanal antagonistti için 10 µM AMTB, TRPV4 kanal antagonistti olarak 10 µM GSK-2193874 kullanıldı. Bir diğer protokol de bir voltaj kapılı Kv⁺-kanalı açıcısı olan Retigabine ile uygulandı. Bu protokolün kontrolü için her bir gruba 10 µM Retigabine uygulandı. Daha sonra Retigabine (10 µM) ile hazırlanan aynı preparasyon üzerine, her ayrı grup için TRPV1, TRPA1, TRPM8, TRPV4 kanallarının agonistleri olan Capsaicin, Menthol, Cinnamaldehyde ve 4αPDD ayrı ayrı uygulandı.



Resim 3.3. Hemi skull' un plastik küvette sürekli oksijenlendirilen yBOS ile yer çekimi hızında süperfüzyonu.



Resim 3.4. Hemi skull'ların içinde vazelin bulunan petri kaplarına fıkse edilip ilgili agonist veya antagonistlerle inkübe edilmesi.

3.5. Meningeal sıvı örneklerindeki CGRP düzeylerinin ölçümü

Deney gruplarından elde edilen meningeal sıvı örneklerinin CGRP içeriklerinin ölçümü için meningeal trigeminal sinir uçlarından salınan ve böylece örneklerde bulunan immünoreaktif CGRP içeriği kullanıldı. Assay protokolü, kiti üreten firmanın yönergelerine göre yapıldı. ELISA kiti, serum, plazma ve diğer biyolojik sıvılarda sıçan CGRP konsantrasyonlarının in vitro kantitatif tayininde uygulanmak için üretilen bir kitti.

3.6. Reaktiflerin hazırlanması

1-Kullanmadan önce tüm reaktifler ve optik yoğunluk ölçümü öncesinde Mikroplate okuyucu 15 dakika önceden oda sıcaklığına getirildi (18 ~ 25 °C).

2-Yıkama solüsyonu: 750 ml Yıkama solüsyonu hazırlamak için 30 ml konsantre yıkama tamponu ile distile su (1:25) oranında seyreltildi.

3-Standart CGRP solüsyonu: Toz halinde gelen CGRP standart 10,000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. 1.0 mL referans standartı ve numune seyreltici ilave edildi, tamamen çözünmesi sağlandı. Bu işlemle 1000 pg / mL CGRP içeren standart stok çözeltisi oluşturuldu. Ardından seri dilüsyon yapıldı. Seyreltme derecesi: 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.8 pg / mL olacak şekilde oluşturuldu (resim3.5). Seyrelmek için 7 ependorf tüp alındı, her tüpe 500 µL referans standart solüsyon eklendi. İlk tüpe 1000 pg / mL stok solüsyonundan 500 µL pipetle alındı ve 500 pg / mL stok çözeltisi oluşturmak için karıştırıldı. Son tüpe kadar aynı işlem seri dilüsyonlarla tekrarlandı.

4-Biotinlenmiş Deteksiyon Ab çalışma solüsyonu: Bu seyreltme adımdan 15 dakika önce Biotinlenmiş Deteksiyon Ab (1: 100) oranında seyreltildi. 100 × Konsantre Biotinlenmiş Deteksiyon Ab'i, Biotinlenmiş Deteksiyon Ab Seyrelticiyle 1 × çalışma solüsyonuna seyreltildi. Daha sonra Konsantre HRP Konjugat çalışma solüsyonu bu adımdan 15 dakika önce (1: 100) oranında sulandırıldı.

5-Konsantre HRP Konjugat çalışma solüsyonu: Deneyden önce gerekli miktarı hesaplandı ($100 \mu\text{L}$ / çukur).Hazırlık aşamasında $100 \sim 200 \mu\text{L}$ daha fazla hesaplandı. $100 \times$ Konsantre HRP'yi sulandırıldı Konsantre HRP Eşlenik Seyrelticiyle $1 \times$ çalışma solüsyonuna eşlendi.

3.7. Uygulanan deney prosedürü

1-İlk iki sütuna yarıya azalan konsantrasyonlarda CGRP standart içeren solüsyon, diğer kuyucuklara ise numuneler eklendi, her kuyucuk için $100 \mu\text{L}$ kullanıldı. Plaka, kitin içinden çıkan kaplayıcı membranla kapatıldı. 37°C 'de 90 dakika inkübe edildi.

2-90 dk sonunda her kuyucuğun sıvısı aspire edildi ve yıkama yapıldı. Hemen, $100 \mu\text{L}$ Biotinlenmiş Deteksiyon Ab çalışma solüsyonu eklendi ve sıkıca kapatıldı ve hafifçe karıştırılarak 37°C 'de 1 saat inkübe edildi.

3-Bu aşamadan sonra kuyucuklardaki sıvı aspire edilerek boşaltıldı, her kuyucuğa $350 \mu\text{L}$ yıkama tamponu ilave edildi. $1 \sim 2$ dakika kadar yıkandı ve tekrar her bir kuyucuktan çözelti aspire edilerek boşaltıldı. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.

4-Yıkama işleminden sonra her kuyucuğa $100 \mu\text{L}$ HRP konjugat çalışma solüsyonu ilave edildi. kaplayıcı membranla kapatıldı. 30 dk. 37°C de inkübe edildi.

5-Kuyucuklardan sıvı aspire edilerek boşaltıldı, yıkama işlemi 3. adımda gerçekleştirildiği gibi 5 kez tekrarlandı.

6-Her kuyucuğa $90 \mu\text{L}$ substrat reaktif eklendi. Yeni bir kaplayıcı membranla kapatılarak 37°C 'de yaklaşık 15 dakika inkübe edildi.

7-Her kuyucuğa $50 \mu\text{L}$ stop solution eklendi.

8-450 nm'ye ayarlanmış bir mikro-plak okuyucu (Epoch BioTek Instruments, Inc. Highland Park, Winooski, VT, USA) ile aynı anda her kuyunun optik yoğunluğu belirlendi.

CGRP minimum limiti ~2 pg/ml olarak kabul edildi. Üreticinin tanımladığı standart CGRP konsantrasyonlarına göre optik yoğunluk eğrisi çizildi ve örneklerin CGRP konsantrasyonları hesaplandı.

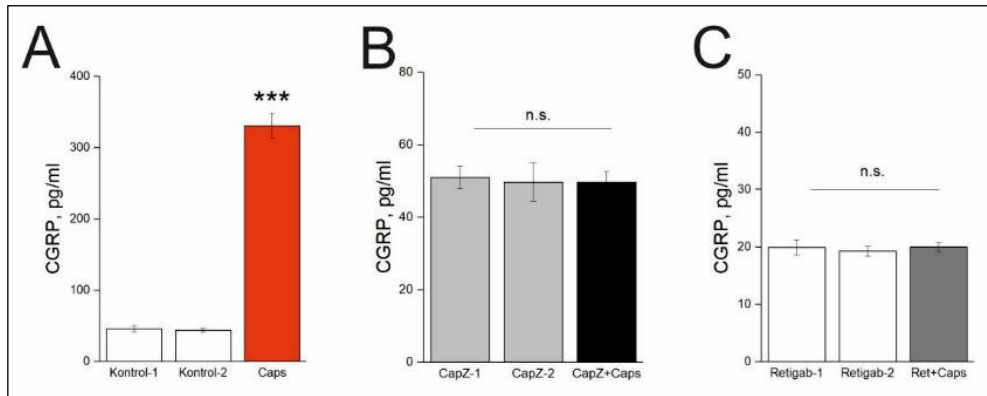
3.8. İstatistiksel analiz

Deney gruplarından elde edilen veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edildi ve paired t-testi ile SPSS 17.0 kullanılarak analiz edildi. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



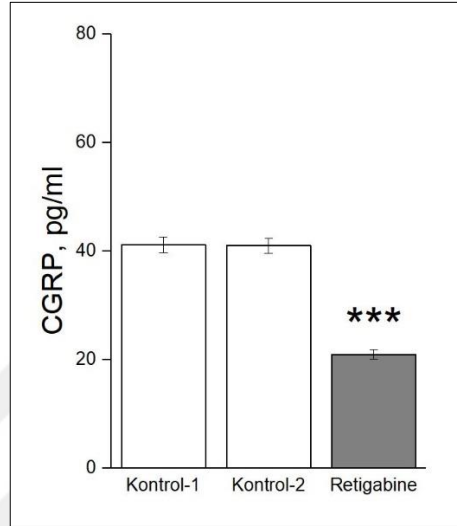
4. BULGULAR

TRPV1 agonisti kapsaisin uygulaması (1 μ M) meningeal trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımını kontrole göre anlamlı olarak artırdı (43.7 $\pm$ 2.8 pg/ml' den 330.8 $\pm$ 17.2 pg/ml' ye, P=0.0001), diğer taraftan bu etkinin gerçekten kapsaisin tarafından tetiklendiğini doğrulamak amacıyla farklı preparasyonlara kapsaisin ve bir TRPV1 antagonisti olan Capsazepine birlikte uygulanıldı, bunun sonucunda TRPV1 antagonisti olan Capsazepine uygulaması (10 μ M) kapsaisinin CGRP salınımı üzerine tetikleyici etkisini bloke ederek meningeal sinir uçlarından CGRP salınımı kapsaisinin tetiklediğini doğruladı (Capsazepine ve Capsazepine+Capsaicin uygulamaları karşılaştırıldığında sırasıyla; 49.63 $\pm$ 5.2 pg/ml ve 49.67 $\pm$ 2.9 pg/ml, P=0.995). Bunlara ek olarak meningeal trigeminal sinir uçlarında bulunan ve aktive olduğunda K⁺ çıkışı yoluyla nöronun hiperpolarizasyonuna yol açarak sinir uçlarındaki voltaj kapılı Ca⁺² kanallarının açık kalma süresini kısaltan K⁺ kanalı açılmasının, kapsaisin varlığında trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımı üzerine etkisini araştırmak amacıyla ayrı preparasyonlara kapsaisin ve bir K⁺ kanalı açıcısı olan Retigabine (10 μ M) birlikte uygulanmıştır. Böylece Retigabine varlığında kapsaisin trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımını tetikleyememiştir (Retigabine ve Retigabine+Capsaicin uygulamaları karşılaştırıldığında sırasıyla; 19.25 $\pm$ 0.8 pg/ml ve 20.01 $\pm$ 0.7 pg/ml, P=0.642, grafik 1A, B ve C).



Grafik 4.1. TRPV1 reseptörleri ve K⁺ kanal açıcısının meningeal preparasyonlarda trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımı üzerine etkileri. ***P<0.001. Caps: kapsaisin, CapZ: kapsazepin ve Ret: retigabin.

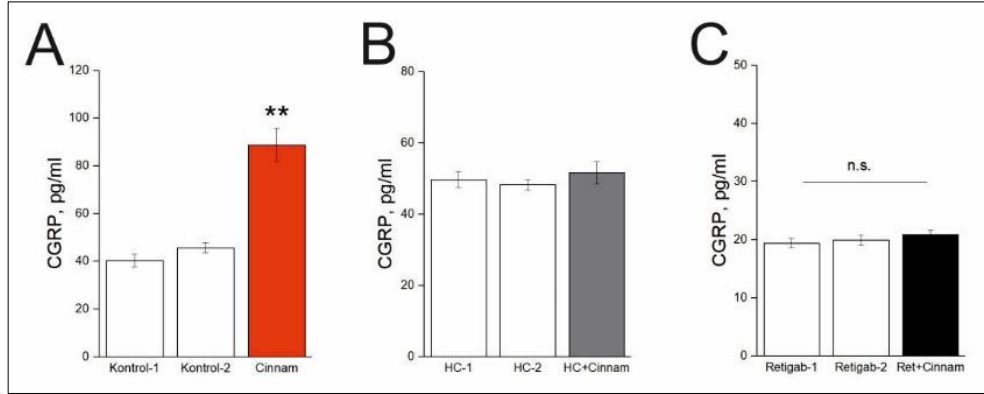
Farklı preparasyonlarda tek başına Retigabine uygulamasının (10 μ M) trigeminal sinir uçlarından CGRP' nin bazal salınımını önemli ölçüde azaltması da bu etkiyi ayrıca doğrulamıştır (yBOS (kontrol) ve Retigabine uygulamaları karşılaştırıldığında sırasıyla; 40.95 ± 1.4 pg/ml ve 20.88 ± 0.8 , $P=0.0001$, grafik 2).



Grafik 4.2. K^+_{ν} kanal açıcısının meningeal preparasyonlarda trigeminal sinir uçlarından bazal CGRP salınımı üzerine etkisi. * $P<0.001$.**

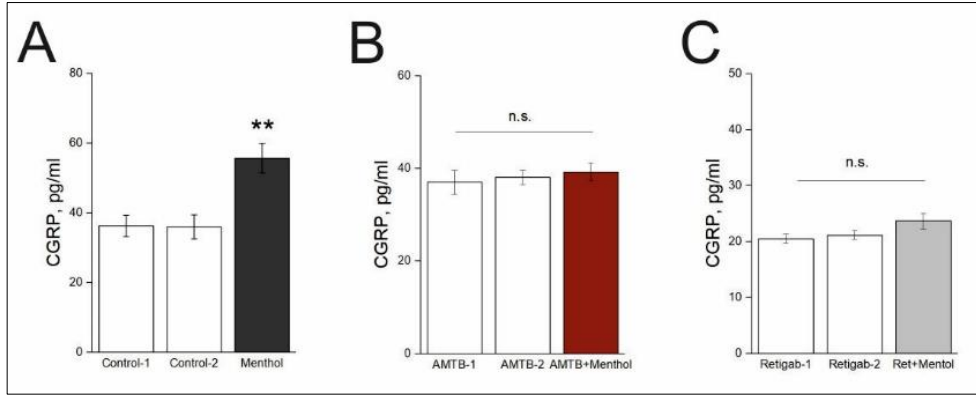
Farklı preparasyonlarda TRPA1 agonisti olan Cinnamaldehyde uygulaması (300 μ M) da kapsaisine benzer şekilde meningeal trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımını kontrole göre anlamlı olarak artırdı (45.63 ± 2.0 pg/ml' den 88.63 ± 6.9 pg/ml' ye, $P=0.0011$), ancak kapsaisin CGRP salınımı üzerine tetikleyici etkisi Cinnamaldehyde' in etkisinden çok daha güçlüydü. Diğer taraftan Cinnamaldehyde uygulamasının meningeal trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımını tetikleyici etkisini doğrulamak için farklı preparasyonlara Cinnamaldehyde ve bir TRPA1 antagonisti olan HC-030031 (50 μ M) birlikte uygulandı. Bunun sonucunda HC-030031 varlığında Cinnamaldehyde meningeal trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımını uyaramadı (Cinnamaldehyde ve HC-030031+Cinnamaldehyde uygulamaları karşılaştırıldığında sırasıyla; 48.21 ± 1.5 pg/ml ve 51.55 ± 3.14 pg/ml, $P=0.325$). Buna ek olarak, farklı preparasyonlarda K^+_{ν} kanalı açıcısı olan Retigabine varlığında TRPA1 agonisti Cinnamaldehyde meningeal trigeminal sinir uçlarından

CGRP salınımını tetikleyemedi (19.88 ± 0.88 pg/ml ve 20.87 ± 0.76 pg/ml, $P=0.518$, grafik 3A, B ve C).



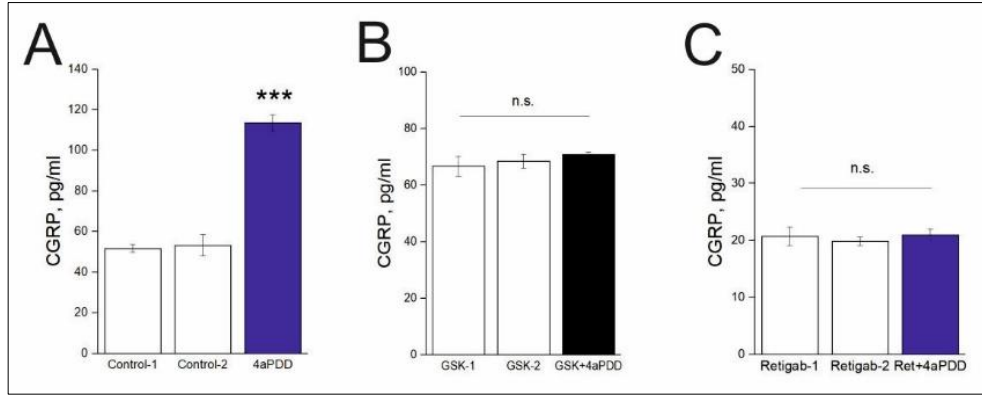
Grafik 4.3. TRPA1 reseptörleri ve K^+ kanal açıcısının meningeal preparasyonlarda trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımı üzerine etkileri. ** $P<0.01$. Cinnam: Cinnamaldehyde, HC: HC-030031 ve Ret: retigabin.

Farklı preparasyonlarda TRPM8 agonisti menthol uygulaması ($300 \mu\text{M}$) da kapsaisin ve cinnamaldehyde uygulamalarına benzer şekilde kontrole göre meningeal trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımını anlamlı olarak artırdı (35.92 ± 3.44 pg/ml' den 55.62 ± 4.31 pg/ml' ye, $P=0.0061$). Mentol uygulamasının meningeal trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımı üzerine bu tetikleyici etkisi farklı preparasyonlarda TRPM8 antagonisti olan AMTB ($10 \mu\text{M}$)' nin mentol ile birlikte uygulanması ile bloke edildi (Mentol ve AMTB+Mentol uygulamaları karşılaştırıldığında sırasıyla; 38.03 ± 1.48 pg/ml ve 39.23 ± 1.89 pg/ml, $P=0.582$). Ayrıca önceki grublardakine benzer şekilde, farklı preparasyonlarda K^+ kanalı açıcısı olan Retigabine uygulaması Mentol uygulamasının meningeal trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımı üzerine bu tetikleyici etkisini bloke etti (Retigabine ve Retigabine+Mentol uygulamaları karşılaştırıldığında sırasıyla; 21.13 ± 0.79 pg/ml ve 23.64 ± 1.4 pg/ml, $P=0.148$, grafik 4A, B ve C).



Grafik 4.4. TRPM8 reseptörleri ve K^+ kanal açıcısının meningeal preparasyonlarda trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımı üzerine etkileri. ** $P < 0.01$. Ret: retigabin.

Diğer bir grupta farklı preparasyonlarda TRPV4 agonisti olan 4αPDD uygulaması (100 μ M) kontrole göre meningeal trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımını anlamlı olarak artırdı (53.19±5.24 pg/ml’ den 113.60±4.05 pg/ml’ ye, $P=0.0001$). Diğer taraftan TRPV4 agonisti 4αPDD uygulamasının meningeal trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımı üzerine bu tetikleyici etkisini doğrulamak amacıyla, farklı preparasyonlara 4αPDD ve bir TRPV4 antagonisti olan GSK-2193874 (10 μ M) birlikte uygulandı ve böylece TRPV4 antagonisti GSK-2193874’ ün 4αPDD’ nin etkisini bloke ettiği görüldü (4αPDD ve GSK-2193874+ 4αPDD uygulamaları karşılaştırıldığında sırasıyla; 68.40±2.41 pg/ml ve 70.82±0.83 pg/ml, $P= 0.472$). Bununla birlikte farklı preparasyonlarda K^+ kanalı açıcısı Retigabine uygulaması da TRPV4 agonisti 4αPDD uygulamasının meningeal trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımı üzerine bu tetikleyici etkisini bloke etti (Retigabine ve Retigabine+4αPDD uygulamaları karşılaştırıldığında sırasıyla; 19.83±0.73 pg/ml ve 20.94±1.01 pg/ml, $P=0.441$, grafik 5A, B ve C).



Grafik 4.5. TRPV4 reseptörleri ve K^+ kanal açıcısının meningeal preparasyonlarda trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımı üzerine etkileri. *P<0.001. Ret: retigabin.**

5. TARTIŞMA

Migren baş ağrısının başlatılması ve devam ettirilmesinde, trigeminovasküler sistemin aktivasyonu sonucu trigeminal duysal sinir terminallerinden salınan CGRP ve SP nöropeptitlerinin yol açtığı dural nörojenik inflamasyon önemli bir rol oynamaktadır. Dura mater trigeminal duysal sinir lifleri ile yoğun bir şekilde innerve edilmiştir. Dolayısıyla trigeminovasküler sistemin aktivasyonu dura materini innerve etmiş olan trigeminal duysal sinirlerin periferik uçlarından dura materine CGRP ve SP'nin salınımına yol açmaktadır. CGRP ve SP ise dura materdeki kan damarlarında vazodilatasyona ve plazma protein ekstrasvazasyonuna yol açarak dural nörojenik inflamasyonu başlatmaktadır. Bununla birlikte CGRP ve SP dura materde yerleşik olan mast hücrelerinde degranülasyonu da tetiklemektedir (4, 102). Degranülasyon sonucu mast hücrelerinden salınan histamin, serotonin, adenosin, ATP, SP, CGRP, bradikinin, nitrik oksit, vazoaaktif intestinal peptid, tümör nekroz faktör α (TNF- α) ve protonlar bir taraftan meningeal damarlarda vazodilatasyona ve permeabilite artışına yol açarken diğer taraftanda dural afferentleri sensitize etmektedir. Böylece dural mast hücrelerinden salınan proinflamatuvar mediyatörlerin de sürece katılmasıyla dura materdeki nörojenik inflamasyon güçlenmektedir. Meningeal trigeminal duysal sinir uçlarındaki nosiseptörlerde aktivasyona yol açan bu dural nörojenik inflamasyon migren patofizyolojisinin esas mekanizmasını oluşturmaktadır. Ancak domino taşları gibi bir biri ardınca giden bu seri olaylarda trigeminovasküler sistemin aktivasyonunu başlatan endojen veya ekzojen olaylar farklılık gösterebilmektedir. Dolayısıyla migren patofizyolojisi ve tedavisine yönelik yapılan deneysel ve klinik çalışmaların bir kısmı trigeminovasküler sistemin aktivitesi üzerine yoğunlaşırken diğer kısmı ise bu aktivasyondan sonra harekete geçen ve ağrının iletilmesinde rolü olan yapılar ve fizyolojik olaylar üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Beyin dokusu ağrı duyusunu algılayacak nosiseptör içermediğinden başın ağrı duyusu, büyük oranda, bol miktarda nosiseptör içeren dura mater ve az oranda ise bazı ekstrakraniyal yapılardan kaynaklanmaktadır. Migren baş ağrısını dindirmek veya ağrı başlamadan önce önlemek için kullanılan ilaçların büyük bir kısmı, ağrı impulslarını, ağrının iletim yollarında bloke ederek etki göstermektedirler. Ancak ağrı impulslarının ilk oluştuğu yerde yani dura materde nosisepsiyon için gereken depolarizasyon

dalgalarının önlenmesi migren profilaksisi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple sunulan çalışmada, migren baş ağrısının esas kaynağı olan dura mater ve onu innerve eden trigeminal sinirin nosiseptör ihtiva eden periferik uçları hedef alınmıştır.

Güçlü bir vazodilatör nöropeptid olan CGRP artık iyi bilinen bir migren biyomarkeri olarak kabul edilmektedir (5, 13, 109, 268). Daha önce yapılan klinik çalışmalar kronik migrenli hastalarda migren atakları sırasında eksternal jugular vende CGRP düzeylerinin kontrollere göre anlamlı artışlar gösterdiğini bildirmişlerdir (109, 269). Ayrıca migren hayvan modelleri kullanılarak yapılan çok sayıda deneysel çalışmada gliseriltrinitrat ile oluşturulan migren sıçan modelinde periferik kanda CGRP seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (7, 270). Önceki çalışmalar ve bulgularla uyumlu olarak sunulan çalışmada migren patofizyolojisi ile ilişkili trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımını hedef alan mekanizmalar çalışılmıştır. CGRP öncelikle trigeminovasküler sistem aktivasyonu sonucu trigeminal nöronların merkezi ve periferik uçlarından salınmaktadır. Trigeminal sinirin periferik uçlarında salınan CGRP daha sonra dura materdeki mast hücrelerinden de CGRP salınmasını uyarmaktadır. Böylece migren ağrısının başlaması ve iletilmesinde önemli bir role sahip olan CGRP kendi salınımını güçlendirmektedir. Bu sebeple dural trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımının modülasyonu migren tedavisinde oldukça önemlidir.

Dural trigeminal duysal sinir uçlarında bulunan ve aktiflendiğinde hücre içi depolarizasyona katkıda bulunan TRP kanalları, CGRP salınımının modülasyonu için önemli hedeflerdir. Çünkü CGRP ekzositozu için nöron gövdesinde oluşan aksiyon potansiyelinin sinir terminallerindeki voltaja duyarlı kalsiyum kanallarını aktive etmesi gerekmektedir. TRP kanalları birer katyon kanalı oldukları ve aktiflendiğinde nöron/sinir içine sodyum ve kalsiyum geçişini sağladıkları için bu kanalların aktivasyonu nöron/sinir içi depolarizasyon süresini uzatarak ve/veya nöron/sinirde aksiyon potansiyeli oluşumu için aşılması gereken voltaj eşiğini düşürerek voltaja duyarlı kalsiyum kanallarınının açık kalma süresinin uzamasına katkıda bulunmaktadır. Böylece dural trigeminal sinir terminallerindeki voltaja duyarlı kalsiyum kanallarının açık kalma süresi uzadıkça sinir terminalinden içeriye giren kalsiyum artışının bir sonucu olarak bu sinir uçlarından CGRP ekzositozu da artmaktadır (Şekil 1). Bu hipotezimizle uyumlu olarak, sunulan çalışmada TRPV1 agonisti kapsaisin ex vivo meningeal preparasyonlarda, dural trigeminal sinir

terminallerinden CGRP salınımını müthiş derecede uyarmıştır. Aynı zamanda kapsaisinin CGRP salınımı üzerine bu tetikleyici etkisi TRPV1 antagonisti kapsazepin ile önlenerek bu fizyolojik olayın TRPV1 aracılığı ile gerçekleştiği doğrulanmıştır. Sunulan çalışmadaki bu bulgular, kapsaisinin duysal sinirlerden CGRP salınımı üzerine etkileri ile ilgili daha önce yapılmış olan deneysel çalışmalarla da uyumludur. Örneğin yapılan bazı deneysel çalışmalar, kapsaisinin sıçanların gastrik afferent innervasyonunu sağlayan duysal sinir liflerinden CGRP salınımı tetiklediğini bildirmiştir (271). Buna ek olarak, son zamanlarda yapılan çalışmalar, kapsaisin uygulamasının sıçanlarda meninksleri innerve eden trigeminal sinirlerde uzun süreli nosiseptif ateşlemeyi tetiklediği (17) ve trigeminal gangliyon ve trigeminal nükleus kaudalinde CGRP sentezini artırdığını (272) bildirmiştir. TRPV1 polimodal bir reseptör olup 43 °C' nin üstündeki sıcaklık, asidoz ve alkoloz, anandamid, N-araşidonil dopamin, okside linoleik asit metabolitleri, esansiyel yağlar ve kapsaisin, reziniferatoksin piperin ve kafur gibi keskin kokulu (acı) bitki ürünleri tarafından aktive edilmektedir (217). TRPV1 reseptörlerinin ağrı, hiperaljezi ve antinosisepsiyondaki fonksiyonlarına dair yapılan çalışmalar farklı sonuçlar bildirmişlerdir. Bununla ilgili çalışmaların bir kısmı bu reseptörlerin pronosisseptif olduğunu ve ağrı duyusunun başlamasına aracılık ettiğini hatta bu reseptörden yoksun hayvanların ağrıya diğer hayvanlardan daha az duyarlı olduğunu ve kapsaisinle uyarılan ağrı davranışlarında azalma olduğunu bildirmiştir (272). Diğer taraftan kapsaisinin pro-nosisepsiyona zıt olarak bazı ağrılı olgularda antinosisseptif etki gösterdiği bildirilmiştir (273). Bununla ilgili olarak kapsaisin içeren kremler kas ve eklem ağrıların hafifletilmesinde klinik kullanıma sahiptir (217). Bu durum TRPV1 reseptörlerinin antinosisepsiyona aracılık ettiğini düşündürebilir ancak bu doğru değildir. Çünkü yüksek doz kapsaisin uygulaması veya kapsaine uzun süre maruz kalınması ile TRPV1 reseptörlerinde desensitizasyonun geliştiği ve buna bağlı olarak ağrı duyusunda hafifleme olduğu yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (274). Dolayısıyla topikal uygulanan kapsaisinin analjezik etkisi TRPV1 reseptörlerinin antinosisseptif etkilerinden değil aksine desensitize olmaları sonucu ağrıyı iletememelerinden kaynaklanmaktadır.

Meningeal trigeminal duysal sinirleri de içene alan primer duysal afferentlerde bulunan diğer bir önemli TRP kanalı TRPA1' dir. Bu reseptörler sarımsak ve hardal

bitkileri, akrolin ve formaldehit gibi çevresel iritanlar ve hidrojen peroksit gibi vücutta oluşan reaktif oksijen türleri tarafından aktive edilmektedir. Sigara ve egzoz dumanı gibi çevresel iritanların inhaslasyonunun baş ağrısını tetiklediği bilinmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar TRPA1 reseptör aktivasyonunun baş ağrısında önemli bir fizyolojik rol oynayabileceğini önermektedir. Bu çalışmaların birinde insüline dirençli obez sıçanlarda acrolin' in meningeal afferentlerden TRPA1 reseptörleri aracılığıyla CGRP salınımını artırdığı gösterilmiştir (275). Benzer şekilde diğer bir çalışmada hidrojen peroksitin TRPA1 aracılığıyla sıçanlarda meningeal trigeminal sinirlerde nosiseptif ateşlemeyi artırdığı ve izole dorsal kök gangliyonu nöronlarından CGRP salınımını uyardığı gösterilmiştir (276). Bu çalışmalar ile uyumlu olarak sunulan çalışmada, TRPA1 agonisti Cinnamaldehyde ex vivo meningeal preparasyonlarda başın ağrı duyusunu taşıyan trigeminal duysal sinirlerin periferik uçlarından CGRP salınımını tetiklemiştir, ayrıca bu etki TRPA1 antagonisti olan HC-030031 ile bloke edilerek TRPA1 aktivasyonunun CGRP salınımı üzerine uyarıcı etkisi doğrulanmıştır. Bu bulgular TRPA1 reseptörlerinin, CGRP salınımı aracılığıyla, migren gibi primer baş ağrılarının fizyolojik mekanizmasının önemli bir bileşeni olabileceğini ve bu reseptörlerin aşırı aktivasyonunun migren patofizyolojisinde rol oynayabileceğini önermektedir.

Dura materi innerve eden trigeminal duysal sinirlerin periferik uçları mekanik uyarılara duyarlıdır ve ayrıca ozmolaritedeki değişiklikler de bu afferent sinirlerin uyarılmasına yol açmaktadır. TRPV4 reseptörlerinin trigeminal gangliyon nöronlarında eksprese edildiği bilinmektedir ve TRPV4 aktivasyonunun fonksiyonel etkileri trigeminal nöronlarda in vitro olarak gösterilmiştir (16, 203, 204). Ayrıca bazı deneysel çalışmalarda TRPV4'ten yoksun olan farelerin hem ozmotik hem de basınç hissinde bir kayıp olduğu görülmüştür (23, 206). Bu bilgiler, dura materin mekanik olarak uyarılmasına büyük oranda, mekanik ve ozmolarite değişikliği ile uyarılan TRPV4 kanallarının aracılık ettiğini göstermektedir. Bu bilgiler ile uyumlu olarak migren baş ağrısı ile ilgili öne sürülen vasküler teoriye göre, migren atakları sırasında dural kan damarlarını innerve eden bu perivasküler sinir uçlarının vazodilatasyona (damar çapındaki genişleme sonucu) bağlı olarak uyarılması nosisepsiyona yol açmaktadır (38, 39). Bununla birlikte her ne kadar ozmolarite değişikliklerinin migren ağrısındaki rolüne ilişkin henüz doğrudan bir kanıt bulunmasa da dural kan

damarlarının vazodilatasyona bağı mekanik uyarımının migren baş ağrısının zonklayıcı karakteristiğini oluşturduğu kabul edilmektedir. Bununla ilgili olarak öksürük, hapşıрма, rutin fiziksel aktivite ve postür değişikliklerine bağı olarak ani baş hareketlerini takiben dura materin mekanik uyarımı nedeniyle intrakraniyal basınçtaki değişikliğin migren hastalarında baş ağrısını kötüleştirdiği bildirilmiştir (207). Hipotonik solüsyon uygulaması safenöz sinirin C-liflerinin % 54' ünü aktive etmiştir (277) ve sıçanların arka pençesine enjekte edilen hipertonic solüsyonun konsantrasyona bağı olarak TRPV4 aracılığıyla ağrı ile ilgili davranışlara yol açtığı bildirilmiştir (278). TRPV4 agonistlerinin primer spinal afferent nöronlardan CGRP ve SP salınımını tetiklediği gösterilmiştir (279). Bu çalışmalarla uyumlu olarak, sunulan çalışmada TRPV4 agonisti 4aPDD dural trigeminal sinir uçlarından CGRP salınımını tetiklemiştir ve bu etki TRPV4 antagonisti GSK 2193874 ile inhibe edilmiştir. Bu bulgular TRPV4 reseptörlerinin baş ağrısındaki fizyolojik rolünün sadece mekanik uyarılara cevapla sınırlı olmadığını buna ek olarak dural afferentlerden CGRP salınımını tetikleyerek nörojenik inflamasyonu yol açan mekanizmalar aracılığıyla da baş ağrısına katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Meninksleri innerve eden duysal afferentlerde ekspresse edilen diğr bir TRP kanalı olan TRPM8, 26 °C' nin altındaki ısı, mentol ve icilin ile aktive edilmektedir (20). TRPM8' in endojen liganları iyi bilinmemekle birlikte çeşitli lipit mediyatörler (fosfoinsitol bi fosfat, PIP2), testosteron ve bir büyüme faktörü olan artemin tarafından uyarılabileceği ileri sürülmektedir (280). Deneysel bir çalışmada TRPM8 antagonisti olan AMTB' nin sıçanlarda mesane gerilmesi ile tetiklenen nosiseptif refleksi önemli derecede azalttığı bildirilmiştir (281). Bu çalışma TRPM8 kanal aktivasyonunun visseral ağrılarda önemli bir fizyolojik rol oynadığını göstermektedir. TRPM8 kanallarının baş ağrısındaki rolüne dair şu ana kadar yapılan çalışmalar ise büyük oranda kanalın dural afferentlerde ekspresyonu üzerine yoğunlaşmış olup, kanalın işlevi üzerine fonksiyonel çalışmalar yok denecek kadar azdır. Diğr taraftan TRPM8 kanalının migren ile ilişkisi olduğuna dair en önemi bulgular migrenli hastalardan alınan örneklerle gerçekleştirilen gen çalışmalarından gelmektedir. Buna göre migrende TRPM8 kanallarının rolüne dair gerçekleştirilen gen temelli çalışmalarda, üç farklı migren hastası grubundan yapılan analizler, migren hastalarında TRPM8 gen vasyasyonları bulunduğunu ve bu varyasyonların, bu bireylerin migrene yatkınlığını

artırdığını göstermiştir (200). Bununla birlikte az sayıdaki fizyolojik çalışmalardan gelen bilgiler TRPM8 kanallarının migren ağrısında ikili rol oynadığını dolayısıyla hem ağrıya yol açabileceğini hem de ağrıyı önleyebileceğini öne sürmektedir (20). Bu çalışmaların birinde, TRPM8 aktivatörü icilin' in dura matere uygulanmasının sıçanlarda kutanöz allodiniye neden olduğu ve bunun antimigren ilacı sumatriptan tarafından önlendiği bildirilmiştir (282). Bu çalışma TRPM8 aktivasyonunun pronosiseptif etkiler oluşturduğunu göstermektedir. Bu çalışmanın aksine, diğer bir deneysel çalışmada, dural TRPM8 kanalının mentol ile aktivasyonunun farelerde anti-nosiseptif etkiler sergilediği bildirilmiştir (283). Ayrıca mentolün akut ve kronik ağrıyı azaltmak için klinik olarak kullanıldığı bilinmektedir (284). TRPM8 kanalları ile migren arasındaki olası ilişkiyi araştıran bu çalışmalar dikkate alındığında, bu konunun henüz çok yeni ve daha çok araştırılmaya gereksinimi olduğu açıkça görülmektedir. Böylece sunulan çalışmada, TRPM8 kanallarının meningeal afferentler ve CGRP ile ilişkili olarak baş ağrısındaki fizyolojik rolüne dair yeni bilgiler üretmek amacıyla TRPM8 agonisti mentol ve spesifik antagonisti AMTB meningeal preparasyonlara uygulanmıştır. Bunun sonucunda mentolün TRPM8 kanallarını aktive ederek meningeal trigeminal duysal sinir uçlarından CGRP salınımını artırdığı ve bu artışların spesifik TRPM8 antagonisti AMTB tarafından önlendiği bulunmuştur. Bu bulgular TRPM8' in baş ağrısındaki fizyolojik rolüne dair yeni mekanizmalar sunmaktadır ve bu alandaki büyük bir boşluğu doldurmaktadır.

Migren mediatörü olarak kabul edilen CGRP' nin sinir uçlarından salınabilmesi bu sinirlerin depolarizasyon durumuna bağlıdır. Çünkü sinir uçlarındaki veziküller içinde depo edilen CGRP moleküllerinin ekzositoz ile salınabilmesi için akson terminalindeki voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının açılması gerekmektedir. Bellibir eşik değerin üzerinde açılan bu voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının açılmasıyla sinir ucundan aksone giren Ca^{+2} iyonları sinaptotagmin gibi kalsiyum sensör proteinine bağlanarak ekzositoz için gerekli reaksiyon zincirinin başlatılmasını uyarmaktadır. Bu sebeple CGRP salınımını temel olarak akson terminali içirisine pozitif yük girişi veya çıkışı belirlemektedir. Eğer akson terminali içine giren pozitif yük miktarı artarsa bu iki yolla CGRP salınımını artıracaktır; i) akson terminali içine giren Na^{+} ve/veya Ca^{+2} gibi iyonların pozitif yükleri repolarizasyonu engelleyerek ve depolarize durumda kalma süresini uzatarak zaten açık olan voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının açık kalma

süresini uzatır, ii) akson terminali membran potansiyelini voltaj duyarlı Ca^{+2} kanallarının açıldığı eşik değere depolarize ederek bu kanalların açılmasını sağlar. Buna ilave olarak akson terminali membranındaki mevcut herhangi bir K^{+} kanalının blokasyonu da akson içinde pozitif yük birikmesine yol açacağından dolayı CGRP salınımını artırır. Diğer taraftan CGRP salınımını azaltan fizyolojik olayların altında yatan mekanizma ise akson terminalinden pozitif yük çıkışı/kayıbıdır. Bu pozitif yük kaybı/çıkışında ise başlıca voltaja duyarlı potasyum kanalları (K^{+v}) rol oynamaktadır. Buna göre akson terminali membranındaki voltaj belirli bir eşik değerinin üzerine çıktığında aktive olan voltaja duyarlı potasyum kanalları akson terminalinin aşırı aktivasyonunu önlemek akson terminalinden potasyum çıkışı yoluyla aksonun repolarize olmasına yol açar, bu durumda voltaj duyarlı Ca^{+2} kanallarının açılması için gereken membran potansiyeli azaldığından Ca^{+2} kanalları kapanır, bunun sonucu olarak da Ca^{+2} girişi azalır ve CGRP ekzositozu azalır veya durur. Bilinen bu fizyolojik mekanizmalardan yola çıkarak sunulan çalışmada, TRP kanalları aktivasyonu sonucu akson terminaline giren pozitif yükleri azaltarak CGRP salınımını azaltmak amacıyla bir voltaja duyarlı potasyum kanal açıcısı olan Retigabin tek başına ve TRPV1, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8 kanal agonistleri ile birlikte meningeal preparasyonlara uygulanmıştır. Beklendiği gibi bu voltaja duyarlı potasyum kanal açıcısı, tek başına uygulandığı meningeal preparasyonlarda sinir uçlarından bazal CGRP salınımını büyük orandan azaltmış, diğer taraftan TRPV1, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8 kanallarının ayrı ayrı aktivasyonu ile tetkilenen CGRP salınımını ise önlemiştir. Voltaja duyarlı potasyum kanalları nöronların uyarılabilirliğini ve elektriksel özelliklerini kontrol ederek çok sayıda fizyolojik olayda önemli bir role sahiptir.

Voltaja duyarlı potasyum kanalları genel olarak 12 aileden ($Kv1$ - $Kv12$) oluşmakta ve her bir aile birkaç alt ünitelerden oluşmaktadır (285). Bu kanallar önemli derecede biyofiziksel ve farmakolojik farklılık gösterir. Duysal nöronlarda bulunan en azından iki tip voltaja duyarlı potasyum kanalı göze çarpmaktadır. Bunlardan yavaş inaktivasyon gösteren potasyum kanalları yavaş inaktivasyon veya bazen de tam olmayan inaktivasyon sergilerken hızlı inaktive olan potasyum kanalları ise hızlı inaktivasyon kinetikleri göstermektedir (286). Yukarıda bahsedildiği gibi voltaja duyarlı potasyum kanalları aksiyon potansiyelinde görev almaktadır ve dinlenim membran potansiyelini düzenleyerek hücrelerin uyarılabilirliğini belirlemektedir.

Daha önceki çalışmalar bu kanalların, inflamatuvar mediatörler ve primer duysal nöronlardaki sinir hasarı ile tetiklenen nosiseptif sinyal iletimi ile alakalı olduğunu göstermiştir (223, 287). Bunun sonucunda bu kanalların, yeni analjeziklerin geliştirilmesinde, önemli hedefler olabilecekleri düşünülmektedir (287). Sunulan çalışmada kullanılan Retigabin, voltaja duyarlı ve antikonvülzan etkili bir nöronal potasyum kanalı (Kv7.2-7.5 [KCNQ2-5]) açıcısı olup TRPV1, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8 kanal aktivasyonuna bağlı CGRP salınımındaki artışları önlemiştir. Bu bulgular, ileride bu tür potasyum kanal açıcılarının, aşırı trigeminovasküler aktivasyon sonucu meningeal sinir uçlarından CGRP salınımını azaltarak migren tedavisinde kullanılabileceğini önermektedir. Ancak bunun için migrendeki ağrı davranışlarını değerlendiren migren hayvan modelleri oluşturularak yapılacak olan *in vivo* deneysel çalışmalara ve ayrıca klinik denemelere de ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan çalışmada dural trigeminal sinirlerde TRPV1, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8 reseptörlerinin başın ağrı duyusunun taşınması ile ilgili yeni fizyolojik işlevleri ortaya çıkarılmıştır. Bulgularımız, dura materi innerve eden trigeminal sinir uçlarında nosisepsiyonun başlaması için gereken aksiyon potansiyeli eşiğinin düşürülmesinde non-selektif olarak çalışan bu katyon kanalları önemli bir rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. Daha önceki çalışmaların çoğu bu kanalların varlığını dural sinirlerdeki ekspresyonlarını işaretleyerek göstermişlerdir ancak önceki çalışmalara ek olarak sunulan çalışmada bu kanalların varlığı fonksiyonel olarak gösterilmiştir. TRPV1, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8 kanallarının spesifik agonistleri kullanılarak aktive edilmeleri sonucu dural trigeminal duysal sinir uçlarından migren mediatörü olarak kabul edilen CGRP salınımını artırması bu kanalların migren baş ağrısının fizyolojisindeki fonksiyonel işlevlerini ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte bu kanallarının aktivasyonu ile tetiklenen CGRP salınımının bu kanalların spesifik antagonistleri ile bloke edilmesi ortaya çıkan etkinin bu kanalların aktivasyonundan kaynaklandığını doğrulamıştır. Diğer taraftan meninkslerde TRPV1, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8 kanallarının aktivasyonu sonucu uyarılan CGRP salınımının voltaja duyarlı potasyum kanal açıcısı ile önlenmesi bu potasyum kanallarının migren ağrısı ile ilgili nosiseptif ateşlemeyi kontrol etmede önemli fizyolojik bir fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir. Böylece ileride farmakolojik olarak uygun TRPV1, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8 reseptörlerinin antagonistleri veya voltaja duyarlı potasyum kanal açıcılarının geliştirilmesi, migren tedavisinde yeni ve alternatif terapötik yaklaşımlar arasında yer alabilir. Sunulan çalışma ex-vivo meningeal preparasyonlar kullanılarak migren ağrısının başladığı çok spesifik bölgede yapılmıştır, böylece sunulan çalışmadan elde edilen bulgular bu reseptörlerinin fizyolojik işlevleri ile ilgili yeni bilgiler sunması açısından çok değerlidir ancak TRPV1, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8 reseptör antagonistlerinin ve voltaja duyarlı potasyum kanal açıcılarının sistemik etkilerini de görmek için bu alanda ayrıca in vivo çalışmaların da yapılması faydalı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. **Gupta S, Nahas SJ, Peterlin BL.** Chemical mediators of migraine: preclinical and clinical observations. *Headache*, **2011**; 51(6): 1029-1045.
2. **Tfelt-Hansen P, Le H.** Calcitonin gene-related peptide in blood: is it increased in the external jugular vein during migraine and cluster headache? A review. *J Headache Pain*, **2009**; 10(3): 137-143.
3. **Edvinsson, L.** Blockade of CGRP receptors in the intracranial vasculature: a new target in the treatment of headache. *Cephalalgia*, **2004**; 24, 611– 622.
4. **Levy D, Burstein R, Kainz V, Jakubowski M, Strassman AM.** Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache. *Pain*, **2007**; 130:166–176.
5. **Kilinc E, Guerrero-Toro C, Zakharov A, Vitale C, Gubert-Olive M, Koroleva K et al.** Serotonergic mechanisms of trigeminal meningeal nociception: Implications for migraine pain. *Neuropharmacology*, **2017**; 116: 160-173.
6. **Yegutkin GG, Guerrero-Toro C, Kilinc E, Koroleva K, Ishchenko Y, Abushik P et al.** Nucleotide homeostasis and purinergic nociceptive signaling in rat meninges in migraine-like conditions. *Purinergic Signal*, **2016**; 12(3): 561-574.
7. **Kilinc E, Dagistan Y, Kukner A, Yilmaz B, Agus S, Soyler G et al.** Salmon calcitonin ameliorates migraine pain through modulation of CGRP release and dural mast cell degranulation in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **2018**; 18. doi: 10.1111/1440-1681.12915. [Epub ahead of print]
8. **Cauchi M, Robertson NP.** CGRP and migraine. *J Neurol*. 2016; 263(1):192-194.
9. **Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R.** Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol*, **1990**; 28(2): 183-187.
10. **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): 644-650.
11. **Karsan N, Goadsby PJ.** Calcitonin gene-related peptide and migraine. *Curr Opin Neurol*, **2015**; 28(3): 250-254.
12. **Juhasz G, Zsombok T, Módos EA, Olajos S, Jakab B, Nemeth J 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, 461–470.
13. **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): 1191-1196.
14. **Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD.** Migraine—current understanding and treatment. *N. Engl. J. Med*, **2002b**; 346, 257– 270.
15. **Oxford GS, Hurley JH.** The Role of TRP Channels in Migraine. *The Open Pain Journal*, **2013**; 6, (Suppl 1: M6) 37-49.
16. **Dussor G, Yan J, Xie JY, Ossipov MH, Dodick DW, Porreca F.** Targeting TRP channels for novel migraine therapeutics. *ACS Chem Neurosci*, **2014**; 5(11): 1085-1096.
17. **Zakharov A, Vitale C, Kilinc E, Koroleva K, Fayuk D, Shelukhina I et al.** Hunting for origins of migraine pain: cluster analysis of spontaneous and capsaicin-induced firing in meningeal trigeminal nerve fibers. *Front Cell Neurosci*, **2015** ;9:287.
18. **Iwashita T, Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, Ebine T, Funakubo M et al.** Activation of extracellular signal-regulated kinase in the trigeminal ganglion following both treatment of the dura mater with capsaicin and cortical spreading depression. *Neurosci Res*, **2013**; 77(1-2): 110-119.

19. **Yan J, Edelmayer RM, Wei X, De Felice M, Porreca F, Dussor G.** Dural afferents express acid-sensing ion channels: A role for decreased meningeal pH in migraine headache. *Pain*, **2011**; 152; 106–113.
20. **Dussor G, Cao YQ.** TRPM8 and Migraine. *Headache*, **2016**; 56(9): 1406-1417.
21. **Benemei S, Fusi C, Trevisan G, Geppetti P.** The TRPA1 channel in migraine mechanism and treatment. *Br J Pharmacol*, **2014**; 171(10): 2552-2567.
22. **Levy D, Strassman AM.** Mechanical response properties of A and C primary afferent neurons innervating the rat intracranial dura. *J Neurophysiol*, **2002**; 88(6): 3021-3031.
23. **Suzuki M, Mizuno A, Kodaira K, Imai M.** Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem*, **2003**; 278(25): 22664-22668.
24. **Wei X, Edelmayer RM, Yan J, Dussor, G.** Activation of TRPV4 on dural afferents produces headache-related behavior in a preclinical rat model. *Cephalalgia*, **2011**; 31: 1595–1600.
25. **Takeda M, Tsuboi Y, Kitagawa J, Nakagawa K, Iwata K, Matsumoto S.** Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. *Mol Pain*, **2011**; 10: 7-5.
26. **Pietrobon D, Moskowitz MA.** Pathophysiology of migraine. *Annu Rev Physiol*, **2013**; 75: 365-391.
27. **Burstein R, Noseda R, Borsook D.** Migraine: multiple processes, complex pathophysiology. *J Neurosci*, **2015**; 35(17):6619-6629.
28. **Stewart WF, Shechter A, Rasmussen BK.** Migraine prevalence. A review of population-based studies. *Neurology*, **1994**; 44: S17–S23.
29. **Leonardi M, Steiner TJ, Scher AT, Lipton RB.** The global burden of migraine: measuring disability in headache disorders with WHO's classification of functioning, disability and health (ICF). *J Headache Pain*, **2005**; 6: 429–440.
30. **Bigal ME, Lipton RB.** The epidemiology, burden, and comorbidities of migraine. *Neurol Clin*, **2009**; 27: 321–334.
31. **Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS).** The international classification of headache disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia*, **2013**; 33: 629–808.
32. **Kelman L.** The premonitory symptoms (prodrome): a tertiary care study of 893 migraineurs. *Headache*, **2004**; 44: 865– 872.
33. **Schoonman GG, Evers DJ, Terwindt GM, van Dijk JG, Ferrari MD.** The prevalence of premonitory symptoms in migraine: a questionnaire study in 461 patients. *Cephalalgia*, **2006**; 26: 1209 –1213.
34. **Cutrer FM, Olesen J.** Migraine with aura and their suforms. In: Olesen J, Goadsby PJ, Ramadan N, Tfelt-Hansen J, Welch KM eds. *The headaches*. **2006**; 407–421. Baltimore, MD: Lippincott, Williams and Wilkins.
35. **Silberstein SD.** Migraine symptoms: results of a survey of self-reported migraineurs. *Headache*, **1995**; 35: 387–396.
36. **Lipton RB, Stewart WF, Diamond S, Diamond ML, Reed M.** Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II. *Headache*, **2001**; 41: 646–657.
37. **Kelman L, Tanis D.** The relationship between migraine pain and other associated symptoms. *Cephalalgia*, **2006**; 26: 548 –553.
38. **Bozoghlanian M, Vasudevan S.** Migraine pathophysiology. *Pain Manag*, **2011**; 1(4): 337-352.
39. **Wolff HG, Marcussen RM, Kunkle EC.** Studies on headache; analysis of the contractile state of the cranial vascular tree in migraine. *Trans Am Neurol Assoc*, **1948**; 73: 14-17.

40. **Graham JR, Wolf HG.** Mechanism of migraine headache and action of ergotamine tartrate. *Arch. Neurol. Psychiatry*, **1938**; 39: 737–763.
41. **De Vries P, Willems EW, Heiligers JP, Villalon CM, Saxena PR.** Pharmacological aspects of experimental headache models in relation to acute antimigraine therapy. *Eur. J. Pharmacol*, **1999**; 37: 61– 74.
42. **Willems EW, Valdivia LF, Villalon CM, Saxena PR.** Possible role of α -adrenoceptor subtypes in acute migraine therapy. *Cephalalgia*, **2003**; 23, 245–257.
43. **De Vries P, Heiligers JPC, Villalon CM, Saxena PR.** Blockade of porcine carotid vascular response to sumatriptan by GR127935, a selective 5-HT_{1D} receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol*, **1998**; 118: 85– 92.
44. **De Vries P, Sanchez-Lopez A, Centrurion D, Heiligers JPC, Saxena PR, Villalon CM.** The canine external carotid vasoconstrictor 5-HT₁ receptor: blockade by 5-HT_{1B} (SB224289), but not by 5-HT_{1D} (BRL15572) receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol*, **1998**; 362: 69– 72.
45. **Moskowitz MA.** Neurogenic inflammation in the pathophysiology and treatment of migraine. *Neurology*, **1993**; 43: S16– S20.
46. **Moskowitz MA.** Pathophysiology of headache--past and present. *Headache*. **2007**; 47(1): 58-63.
47. **Moskowitz MA.** Trigeminovascular system. *Cephalalgia*, **1992**; 12: 127.
48. **Moskowitz MA.** Basic mechanisms in vascular headache. *Neurol. Clin*, **1990**; 8: 801– 815.
49. **Dimitriadou V, Buzzi MG, Moskowitz MA, Theoharides TC.** Trigeminal sensory fiber stimulation induces morphological changes reflecting secretion in rat dura mater mast cells. *Neuroscience*, **1991**; 44: 97–112.
50. **Peroutka SJ.** Neurogenic inflammation and migraine: implications for the therapeutics. *Mol Interv*, **2005**; 5(5): 304-311.
51. **Arulmani U, VanDenBrink AM, Villalon CM, Saxena PR.** Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology. *Eur. J. Pharmacol*, **2004**; 500: 315– 330.
52. **Costa C, Tozzi A, Rainero I, Cupini LM, Calabresi P, Ayata C et al.** Cortical spreading depression as a target for anti-migraine agents. *J Headache Pain*, **2013**; 14(1): 62.
53. **Charles AC, Baca SM.** Cortical spreading depression and migraine. *Nat Rev Neurol*, **2013**; 9(11): 637-644.
54. **Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, Lule S, Eren-Kocak E, Sen ZD et al.** Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science*, **2013**; 339: 1092– 1095.
55. **Chang JC, Shook LL, Biag J, Nguyen EN, Toga AW, Charles AC.** Biphasic direct current shift, haemoglobin desaturation and neurovascular uncoupling in cortical spreading depression. *Brain*, **2010**; 133: 996–1012.
56. **Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W et al.** International Union of Pharmacology: XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol. Rev.* **2002**; 54: 233–246.
57. **Wimalawansa SJ.** Blood pressure and cardiovascular tone: role of CGRP family of peptides. *Scientific World*, **2001**; 1: 32.
58. **Wimalawansa SJ.** Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr. Rev*, **1996**; 17: 533– 585.
59. **Bell D, McDermott BJ.** Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: characterization of receptor populations and their (patho) physiological significance. *Pharmacol. Rev*, **1996**; 48: 253–288.

60. **Hagner S, Haberberger RV, Overkamp D, Hoffmann R, Voigt KH, McGregor GP.** Expression and distribution of calcitonin receptor-like receptor in human hairy skin. *Peptides*, **2002a**; 23: 109– 116.
61. **Hagner S, Knauer J, Haberberger R, Goke B, Voigt K, McGregor GP.** Calcitonin receptor-like receptor is expressed on gastrointestinal immune cells. *Digestion*, **2002b**; 66: 197–203.
62. **Hagner S, Stahl U, Knoblauch B, McGregor GP, Lang RE.** Calcitonin receptor-like receptor: identification and distribution in human peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* **2002c**; 310, 41– 50.
63. **Kaygisiz Z, Erksap N, Uyar R, Kabadere S, Kabadere TE, Dernek S.** The effect of adrenomedullin, amylin fragment 8–37 and calcitonin gene-related peptide on contractile force, heart rate and coronary perfusion pressure in isolated rat hearts. *Acta Physiol. Hung*, **2003**; 90: 133– 146.
64. **Saetrum Opgaard O, Hasbak P, de Vries R, Saxena PR, Edvinsson L.** Positive inotropy mediated via CGRP receptors in isolated human myocardial trabeculae. *Eur. J. Pharmacol*, **2000**; 397: 373–382.
65. **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: 649– 678.
66. **Powell KJ, Ma W, Sutak M, Doods H, Quirion R, Jhamandas K.** Blockade and reversal of spinal morphine tolerance by peptide and non-peptide calcitonin gene-related peptide receptor antagonists. *Br. J. Pharmacol*, **2000**; 131: 875– 884.
67. **Rossi SG, Dickerson IM, Rotundo RL.** Localization of the calcitonin gene-related peptide receptor complex at the vertebrate neuromuscular junction and its role in regulating acetylcholinesterase expression. *J. Biol. Chem*, **2003**; 278: 24994– 25000.
68. **Yallampalli C, Chauhan M, Thota CS, Kondapaka S, Wimalawansa SJ.** Calcitonin gene-related peptide in pregnancy and its emerging receptor heterogeneity. *Trends Endocrinol. Metab*, **2002**; 13: 263– 269.
69. **Russo AF.** Calcitonin gene-related peptide (CGRP): a new target for migraine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **2015**; 55: 533–552.
70. **Morara S, Rosina A, Provini L, Forloni G, Caretti A, Wimalawansa SJ.** Calcitonin gene-related peptide receptor expression in the neurons and glia of developing rat cerebellum: an autoradiographic and immunohistochemical analysis. *Neuroscience*, **2000**; 100: 381– 391.
71. **Segond von Banchet G, Pastor A, Biskup C, Schlegel C, Benndorf K, Schaible HG.** Localization of functional calcitonin gene-related peptide binding sites in a subpopulation of cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, **2002**; 110: 131– 145.
72. **Ohtori S, Takahashi K, Chiba T, Yamagata M, Sameda H, Moriya H.** Substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactive sensory DRG neurons innervating the lumbar intervertebral discs in rats. *Ann. Anat*, **2002**; 184: 235– 240.
73. **Ursell PC, Ren CL, Danilo Jr P.** Anatomic distribution of autonomic neural tissue in the developing dog heart: II. Nonadrenergic noncholinergic innervation by calcitonin gene-related peptide-immunoreactive tissue. *Anat. Rec*, **1991**; 230: 531– 538.
74. **de Hoon JN, Pickkers P, Smits P, Struijker-Boudier HA, Van Bortel LM.** Calcitonin gene-related peptide: exploring its vasodilating mechanism of action in humans. *Clin. Pharmacol. Ther*, **2003**; 73: 312–321.
75. **Springer J, Amadesi S, Trevisani M, Harrison S, Dinh QT, McGregor GP et al.** Effects of alpha calcitonin gene-related peptide in human bronchial smooth muscle and pulmonary artery. *Regul. Pept*, **2004**; 118: 127–134.
76. **Arulmozhi DK, Veeranjanyulu A, Bodhankar SL.** Migraine: current concepts and emerging therapies. *Vascul Pharmacol*, **2005**; 43(3): 176–187.

77. **Villalón CM, Centurio D, Valdivia LF, De Vries P, Saxena PR.** An introduction to migraine: from ancient treatment to functional pharmacology and antimigraine therapy. *Proc. West Pharmacol. Soc*, **2002**; 45: 199– 210.
78. **Welch KM.** Concepts of migraine headache pathogenesis: insights into mechanisms of chronicity and new drug targets. *Neurol. Sci*, **2003**; 24 (Suppl. 2): S149– S153.
79. **Messlinger K.** Migraine: where and how does the pain originate? *Exp Brain Res*, **2009**; 196(1): 179-193.
80. **Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J.** CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia*, **2002**; 22: 54– 61.
81. **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: 877– 886.
82. **Thomsen LL, Olesen J.** Nitric oxide in primary headaches. *Curr. Opin. Neurol*, **2001**; 14: 315– 321.
83. **Akerman S, Williamson DJ, Kaube H, Goadsby PJ.** Nitric oxide synthase inhibitors can antagonize neurogenic and calcitonin gene related peptide induced dilation of dural meningeal vessels. *Br. J. Pharmacol*, **2002**; 137: 62-68.
84. **Ray BS, Wolff HG.** Experimental studies on headache. Pain-sensitive structures of the head and their significance in headache. *Arch Surg*, **1940**; 41: 813–556.
85. **Keller JT, Marfurt CF.** Peptidergic and serotonergic innervation of the rat dura mater. *J Comp Neurol*, **1991**; 309: 515–534.
86. **Uddman R, Edvinsson L, Ekman R, Kingman T, McCulloch J.** Innervation of the feline cerebral vasculature by nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide: trigeminal origin and co-existence with substance P. *Neurosci Lett*, **1985**; 62: 131–136.
87. **Marfurt CF.** The central projection of trigeminal primary afferent neurons in the cat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*, **1981**; 203: 785–798.
88. **Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D.** Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, **2009**; 139: 267–284.
89. **Burstein R, Yamamura H, Malick A, Strassman AM.** Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. *J Neurophysiol*, **1998**; 79: 964–982.
90. **Liu Y, Broman J, Edvinsson L.** Central projections of the sensory innervation of the rat middle meningeal artery. *Brain Res*, **2008**; 1208: 103–110.
91. **Woolfall P, Coulthard A.** Trigeminal nerve: anatomy and pathology. *Br J Radiol*, **2001**; 74(881): 458–467.
92. **Markman S.** Referred pain. *J N J Dent Assoc*, **2014**; 85(2): 26–29.
93. **Zhao J, Levy D.** The sensory innervation of the calvarial periosteum is nociceptive and contributes to headache-like behavior. *Pain*, **2014**; 155(7): 1392–1400.
94. **Schueler M, Neuhuber WL, De Col R.** Innervation of rat and human Dura mater and pericranial tissues in the parieto-temporal region by meningeal afferents. *Headache*, **2014**; 54(6): 996–1009.
95. **Wei X, Melemedjian OK, Ahn DD-U, Weinstein N, Dussor G.** Dural fibroblasts play a potential role in headache pathophysiology. *Pain*, **2014**; 155(7): 1238–1244.
96. **Burgos-Vega C, Moy J, Dussor G.** Meningeal Afferent Signaling and the Pathophysiology of Migraine. *Prog Mol Biol Transl Sci*, **2015**; 131: 537-564.
97. **Sixt M-L, Messlinger K, Fischer MJM.** Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist olcegepant acts in the spinal trigeminal nucleus. *Brain*, **2009**; 132(pt 11): 3134–3141.

98. **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.
99. **Zhang X-C, Levy D.** Modulation of meningeal nociceptors mechanosensitivity by peripheral proteinase-activated receptor-2: the role of mast cells. *Cephalalgia*, **2008**; 28(3): 276–284.
100. **Baun M, Pedersen MHF, Olesen J, Jansen-Olesen I.** Dural mast cell degranulation is a putative mechanism for headache induced by PACAP-38. *Cephalalgia*, **2012**; 32(4): 337–345.
101. **Messlinger K, Lennerz JK, Eberhardt M, Fischer MJM.** CGRP and NO in the trigeminal system: mechanisms and role in headache generation. *Headache*, **2012**; 52(9): 1411–1427.
102. **Levy D.** Endogenous mechanisms underlying the activation and sensitization of meningeal nociceptors: the role of immuno-vascular interactions and cortical spreading depression. *Curr Pain Headache Rep*, **2012**; 16(3): 270–277.
103. **Levy D, Burstein R, Strassman AM.** Calcitonin gene-related peptide does not excite or sensitize meningeal nociceptors: implications for the pathophysiology of migraine. *Ann Neurol*, **2005**; 58(5): 698–705.
104. **Edelmayer RM, Le LN, Yan J, Wei X, Nassini R, Materazzi S et al.** Activation of TRPA1 on dural afferents: a potential mechanism of headache pain. *Pain*, **2012**; 153(9): 1949–1958.
105. **Strassman AM, Levy D.** Response properties of dural nociceptors in relation to headache. *J Neurophysiol*, **2006**; 95(3): 1298–1306.
106. **Bernstein C, Burstein R.** Sensitization of the trigeminovascular pathway: perspective and implications to migraine pathophysiology. *J Clin Neurol*, **2012**; 8(2): 89–99.
107. **Goadsby PJ, Charbit AR, Andreou AP, Akerman S.** Neurobiology of migraine. *Neuroscience*, **2009**; 161(2): 327–341.
108. **Levy D.** Migraine pain, meningeal inflammation, and mast cells. *Curr Pain Headache Rep*, **2009**; 13(3): 237–240.
109. **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.
110. **Tanure MTA, Gomez RS, Hurtado RCL, Teixeira AL, Domingues RB.** Increased serum levels of brain-derived neurotrophic factor during migraine attacks: a pilot study. *J Headache Pain*, **2010**; 11(5): 427–430.
111. **Uzar E, Evliyaoglu O, Yucel Y, Ugur Cevik M, Acar A, Guzel I et al.** Serum cytokine and pro-brain natriuretic peptide (BNP) levels in patients with migraine. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **2011**; 15(10): 1111–1116.
112. **Wang F, He Q, Ren Z, Li F, Chen W, Lin X et al.** Association of serum levels of intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-6 with migraine. *Neurol Sci*, **2014**; 23: 1–6.
113. **Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ.** Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. *Trends Neurosci*, **2006**; 29: 578–586.
114. **Lingueglia E.** Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem*, **2007**; 282: 17325–17329.
115. **Waldmann R, Champigny G, Voilley N, Lauritzen I, Lazdunski M.** The mammalian degenerin MDEG, an amiloride-sensitive cation channel activated by mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, **1996**; 271: 10433–10436.
116. **Mamet J, Baron A, Lazdunski M, Voilley N.** ProInflammatory Mediators, Stimulators of Sensory Neuron Excitability via the Expression of Acid-Sensing Ion Channels. *J Neurosci*, **2002**; 22: 10662–10670.

117. **Voilley N, de Weille J, Mamet J, Lazdunski M.** Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci*, **2001**; 21: 8026–8033.
118. **Yagi J, Wenk HN, Naves LA, McCleskey EW.** Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia. *Circ Res*, **2006**; 99: 501–509.
119. **Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M.** Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem*, **1997**; 272: 20975–20978.
120. **Jones RC 3rd, Xu L, Gebhart GF.** The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acidsensing ion channel 3. *J Neurosci*, **2005**; 25: 10981–10989.
121. **Molliver DC, Immke DC, Fierro L, Pare M, Rice FL, McCleskey EW.** ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons. *Mol Pain*, **2005**; 1: 35.
122. **Page AJ, Brierley SM, Martin CM et al.** Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function. *Gut*, **2005**; 54:1408–1415.
123. **Sutherland SP, Benson CJ, Adelman JP, McCleskey EW.** Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2001**; 98: 711– 716.
124. **Deval E, Noël J, Gasull X, Delaunay A, Alloui A, Friend V et al.** Acid-sensing ion channels in postoperative pain. *J Neurosci*, **2011**; 31: 6059–6066.
125. **KA, Radhakrishnan R, Benson CJ, Eshcol JO, Price MP, Babinski K et al.** ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *Pain*, **2007**; 129: 102–112.
126. **Burstein R.** Deconstructing migraine headache into peripheral and central sensitization. *Pain*, **2001**; 89: 107–110.
127. **Durham PL, Masterson CG.** Two mechanisms involved in trigeminal CGRP release: implications for migraine treatment. *Headache*, **2013**; 53: 67–80.
128. **Yan J, Wei X, Bischoff C, Edelmayer RM, Dussor G.** pH-Evoked Dural Afferent Signaling Is Mediated by ASIC3 and Is Sensitized by Mast Cell Mediators. *Headache*, **2013**; 53: 1250–1261.
129. **Burnstock G.** P2X receptors in sensory neurones. *Br J Anaesth*, **2000**; 84: 476–488.
130. **Ford AP.** In pursuit of P2X3 antagonists: novel therapeutics for chronic pain and afferent sensitization. *Purinergic Signal*, **2012**; 8: 3–26.
131. **Burnstock G.** Purinergic P2 receptors as targets for novel analgesics. *Pharmacol Ther*, **2006**; 110: 433–454.
132. **Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN.** A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*, **1995**; 377: 428–431.
133. **North RA.** Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, **2002**; 82: 1013–1067.
134. **Staikopoulos V, Sessle BJ, Furness JB, Jennings EA.** Localization of P2X2 and P2X3 receptors in rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience*, **2007**; 144: 208–216.
135. **Bradbury EJ, Burnstock G, McMahon SB.** The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci*, **1998**; 12: 256–268.
136. **Ruan HZ, Moules E, Burnstock G.** Changes in P2X3 purinoceptors in sensory ganglia of the mouse during embryonic and postnatal development. *Histochem Cell Biol*, **2004**; 122: 539–551.
137. **Ambalavanar R, Moritani M, Dessem D.** Trigeminal P2X3 receptor expression differs from dorsal root ganglion and is modulated by deep tissue inflammation. *Pain*, **2005**; 117: 280–291.

138. **Gribkoff VK, Starrett JE Jr, Dworetzky SI.** Maxi-K potassium channels: form, function, and modulation of a class of endogenous regulators of intracellular calcium. *Neuroscientist*, **2001**; 7: 166–177.
139. **Robitaille R, Charlton MP.** Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J Neurosci*, **1992**; 12: 297–305.
140. **Akerman S, Holland PR, Lasalandra MP, Goadsby PJ.** Inhibition of trigeminovascular dural nociceptive afferents by Ca(2+)-activated K(+) (MaxiK/BK(Ca)) channel opening. *Pain*, **2010**; 151: 128–136.
141. **Ramsey IS, Delling M, Clapham DE.** An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*, **2006**; 68: 619–647.
142. **Liu M, Liu MC, Magoulas C, Priestley JV, Willmott NJ.** Versatile regulation of cytosolic Ca²⁺ by vanilloid receptor 1 in rat dorsal root ganglion neurons. *J Biol Chem*, **2003**; 278: 5462–5472.
143. **Karai LJ, Russell JT, Iadarola MJ, Olah Z.** Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sensory neurons. *J Biol Chem*, **2004**; 279: 16377–16387.
144. **Vriens J, Appendino G, Nilius B.** Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol*, **2009**; 75: 1262–1279.
145. **Numazaki M, Tominaga M.** Nociception and TRP Channels. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, **2004**; 3: 479–485.
146. **Kelman L.** The triggers or precipitants of the acute migraine attack. *Cephalalgia*, **2007**; 27(5): 394–402.
147. **Wantke F, Focke M, Hemmer W, Bracun R, Wolf-Abdolvahab S, Götz M et al.** Exposure to formaldehyde and phenol during an anatomy dissecting course: sensitizing potency of formaldehyde in medical students. *Allergy*, **2000**; 55(1): 84–87.
148. **Nassini R, Materazzi S, Vriens J, Prenen J, Benemei S, De Siena G et al.** The “headache tree” via umbellulone and TRPA1 activates the trigeminovascular system. *Brain*, **2012**; 135(pt 2): 376–390.
149. **Kunkler PE, Ballard CJ, Oxford GS, Hurley JH.** TRPA1 receptors mediate environmental irritant-induced meningeal vasodilatation. *Pain*, **2011**; 152(1): 38–44.
150. **Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R.** Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci*, **1999**; 11: 946–958.
151. **Ichikawa H, Sugimoto T.** VR1-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res*, **2001**; 890: 184–188.
152. **Caterina MJ, Julius D.** The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*, **2001**; 24: 487–517.
153. **Jordt SE, Tominaga M, Julius D.** Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2000**; 97: 8134–8139.
154. **Doods H, Arndt K, Rudolf K, Just S.** CGRP antagonists: unravelling the role of CGRP in migraine. *Trends Pharmacol Sci*, **2007**; 28: 580–587.
155. **Akerman S, Kaube H, Goadsby PJ.** Vanilloid type 1 receptors (VR1) on trigeminal sensory nerve fibres play a minor role in neurogenic dural vasodilatation, and are involved in capsaicin-induced dural dilation. *Br J Pharmacol*, **2003**; 140: 718–724.
156. **Strassman AM, Raymond SA, Burstein R.** Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature*, **1996**; 384(6609): 560–564.

157. **Liedtke W, Tobin DM, Bargmann CI, Friedman JM.** Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2003**; 100(suppl 2): 14531–14536.
158. **Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Droogmans G, Voets T, Nilius B.** Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2004**; 101(1): 396–401.
159. **Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, Hayes P et al.** Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/ mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem*, **2002**; 277(16): 13569–13577.
160. **Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A et al.** Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, **2000**; 103(3): 525–535.
161. **McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D.** Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, **2002**; 416(6876): 52–58.
162. **Knowlton WM, Palkar R, Lippoldt EK, McCoy DD, Baluch F, Chen J et al.** A sensory-labeled line for cold: TRPM8- expressing sensory neurons define the cellular basis for cold, cold pain, and cooling-mediated analgesia. *J Neurosci*, **2013**; 33(7): 2837–2848.
163. **Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM et al.** A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, **2002**; 108(5): 705–715.
164. **Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL et al.** The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, **2007**; 448: 204–208.
165. **Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ Jr, Wang Y, Lawrence D, D'Andrea MR et al.** Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron*, **2007**; 54: 379–386.
166. **Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A.** TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron*, **2007**; 54: 371–378.
167. **Venkatachalam K, Montell C.** TRP channels. *Annu. Rev. Biochem*, **2007**; 76: 387–417.
168. **Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE.** International union of basic and clinical pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol. Rev*, **2010**; 62: 381–404.
169. **Clapham DE.** TRP channels as cellular sensors. *Nature*, **2003**; 426: 517–524.
170. **Montell C.** Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE*, **2001**; 90, re1.
171. **Benemei S, De Cesaris F, Fusi C, Rossi E, Lupi C, Geppetti P.** TRPA1 and other TRP channels in migraine. *J. Headache Pain*, **2013**; 14: 71.
172. **Julius D.** TRP channels and pain. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol*, **2013**; 29: 355–384.
173. **Meents JE, Neeb L, Reuter U.** TRPV1 in migraine pathophysiology. *Trends Mol. Med*, **2010**; 16: 153–159.
174. **Mickle AD, Shepherd AJ, Mohapatra DP.** Sensory TRP channels: The key transducers of nociception and pain. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*, **2015**; 131: 73–118.
175. **Moran MM, McAlexander MA, Biro T, Szallasi A.** Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov*, **2011**; 10: 601–620.
176. **Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ.** Transient receptor potential channels: Targeting pain at the source. *Nat. Rev. Drug Discov*, **2009**; 8: 55–68.
177. **Mickle AD, Shepherd AJ, Mohapatra DP.** Nociceptive TRP Channels: Sensory Detectors and Transducers in Multiple Pain Pathologies. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2016**; 14: 9(4). pii: E72.
178. **Liedtke W.** TRPV channels' role in osmotransduction and mechanotransduction. *Handb. Exp. Pharmacol*, **2007**; 473–487.

179. **Colbert HA, Smith TL, Bargmann CI.** OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **1997**; 17: 8259–8269.
180. **Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Pobleto J et al.** TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*, **2006**; 124: 1269–1282.
181. **Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ et al.** TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron*, **2006**; 50: 277–289.
182. **Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y et al.** TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J. Clin. Invest*, **2005**; 115: 2393–2401.
183. **Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA et al.** TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature*, **2004**; 432: 723–730.
184. **Tabuchi K, Suzuki M, Mizuno A, Hara A.** Hearing impairment in TRPV4 knockout mice. *Neurosci. Lett*, **2005**; 382: 304–308.
185. **Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J.** Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J. Neurosci*, **2005**; 25: 4052–4061.
186. **Gao X, Wu L, O'Neil RG.** Temperature-modulated diversity of TRPV4 channel gating: activation by physical stresses and phorbol ester derivatives through protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem*, **2003**; 278: 27129–27137.
187. **Pare M, Elde R, Mazurkiewicz JE, Smith AM, Rice FL.** The Meissner corpuscle revised: a multiafferented mechanoreceptor with nociceptor immunochemical properties. *J. Neurosci*, **2001**; 21: 7236–7246.
188. **Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR.** The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov*, **2007**; 6(5): 357–372.
189. **Krause JE, Chenard BL, Cortright DN.** Transient receptor potential ion channels as targets for the discovery of pain therapeutics. *Curr Opin Investig Drugs*, **2005**; 6(1): 48–57.
190. **Christoph T, Gillen C, Mika J, Grünweller A, Schäfer MK, Schiene K et al.** Antinociceptive effect of antisense oligonucleotides against the vanilloid receptor VR1/TRPV1. *Neurochem Int*, **2007**; 50(1): 281–290.
191. **Woolf CJ, Salter MW.** Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, **2000**; 288: 1765–1769.
192. **Ramsey IS, Delling M, Clapham DE.** An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol*, **2006**; 68: 619–647.
193. **Scodding JW.** Peripheral Neuropathies. In: Textbook of pain, 4th ed., edited by Wall PD and Melzack R. *Edinburgh: Churchill Livingstone*, **1999**; 815–834.
194. **Durham PL.** Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and migraine. *Headache*, **2006**; 46: (Suppl. 1) S3–S8.
195. **Szallasi A, Blumberg PM.** Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol*, **1999**; 51: 159–212.
196. **McVey DC, Vigna SR.** The capsaicin VR1 receptor mediates substance P release in toxin A-induced enteritis in rats. *Peptides*, **2001**; 22: 1439–1446.
197. **Stander S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V et al.** Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp. Dermatol*, **2004**; 13: 129–139.

198. **Meents JE, Hoffmann J, Chaplan SR, Neeb L, Schuh-Hofer S, Wickenden A et al.** Two TRPV1 receptor antagonists are effective in two different experimental models of migraine. *J. Headache Pain*, **2015**; 16: 57.
199. Evaluation of Civamide (Zucapsaicin) in Treatment of Postherpetic Neuroalgia and Post-Incisional Neuralgia. Clinical Trials.gov, **2014**. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00845923?term=zucapsaicin&rank=4> (accessed on 28 October 2016).
200. **Chasman DI, Schurks M, Anttila V, de Vries B, Schminke U, Launer LJ et al.** Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat. Genet*, **2011**; 43: 695–698.
201. **Haas ET, Rowland K, Gautam M.** Tooth injury increases expression of the cold sensitive trp channel TRPA1 in trigeminal neurons. *Arch. Oral Biol*, **2011**; 56: 1604–1609.
202. **Trevisan G, Benemei S, Materazzi S, De Logu F, De Siena G, Fusi C et al.** TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain*, **2016**; 139: 1361–1377.
203. **Fusco BM, Barzoi G, Agro F.** Repeated intranasal capsaicin applications to treat chronic migraine. *Br J Anaesth*, **2003**; 90: 812
204. **Fusco BM, Marabini S, Maggi CA, Fiore G, Geppetti P.** Preventative effect of repeated nasal applications of capsaicin in cluster headache. *Pain*, **1994**; 59: 321–325
205. **Geppetti P, Holzer P.** Neurogenic inflammation. Edited by Geppetti P, Holzer P. CRC Press, Boca Raton. **1996**.
206. **Courteau JP, Cushman R, Bouchard F, Quevillon M, Chartrand A, Bherer L.** Survey of construction workers repeatedly exposed to chlorine over a three to six month period in a pulp mill: I. Exposure and symptomatology. *Occup Environ Med*, **1994**; 51: 219–224.
207. **Peatfield RC.** Relationships between food, wine, and beer-precipitated migrainous headaches. *Headache*, **1995**; 35: 355–357
208. **Irlbacher K, Meyer BU.** Nasally triggered headache. *Neurology*, **2002**; 58: 294
209. **Roussos AP, Hirsch AR.** Alliaceous Migraines. *Headache*, **2013**: 12091
210. **Cavanagh SR, Fitzgerald EJ, Urry HL.** Emotion reactivity and regulation are associated with psychological functioning following the 2011 earthquake, tsunami, and nuclear crisis in Japan. *Emotion*, **2014**; 14: 235–240.
211. **Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D.** The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **1997**; 389: 816–824.
212. **Yeo EJ, Cho YS, Paik SK, Yoshida A, Park MJ, Ahn DK et al.** Ultrastructural analysis of the synaptic connectivity of TRPV1-expressing primary afferent terminals in the rat trigeminal caudal nucleus. *J. Comp. Neurol*, **2010**; 518: 4134–4146.
213. **Carreno O, Corominas R, Fernandez-Morales J, Camina M, Sobrido M J, Fernandez-Fernandez JM et al.** SNP variants within the vanilloid TRPV1 and TRPV3 receptor genes are associated with migraine in the Spanish population. *Am. J. Med, Genet.* **2012**; Part B 159B: 94–103.
214. **Huang D, Li S, Dhaka A, Story GM, Cao YQ.** Expression of the transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura. *Mol. Pain*, **2012**; 8: 66.
215. **Evans MS, Cheng X, Jeffry JA, Disney KE, Premkumar LS.** Sumatriptan inhibits TRPV1 channels in trigeminal neurons. *Headache*, **2012**; 52: 773–784.
216. **Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR.** The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2007**; 6: 357–372.

217. **Gavva NR, Treanor JJ, Garami A, Fang L, Surapaneni S, Akrami A.** Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain*, **2008**; 136: 202–210.
218. **Diamond S, Freitag F, Phillips SB, Bernstein JE, Saper JR.** Intranasal civamide for the acute treatment of migraine headache. *Cephalalgia*, **2000**; 20: 597–602
219. **Lambert GA, Davis JB, Appleby JM, Chizh BA, Hoskin KL, Zagami AS.** The effects of the TRPV1 receptor antagonist SB-705498 on trigeminovascular sensitisation and neurotransmission. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, **2009**; 380: 311–325.
220. **Summ O, Holland PR, Akerman S, Goadsby PJ.** TRPV1 receptor blockade is ineffective in different in vivo models of migraine. *Cephalalgia*, **2011**; 31: 172–180.
221. **Kitahara T, Li HS, Balaban CD.** Changes in transient receptor potential cation channel superfamily V (TRPV) mRNA expression in the mouse inner ear ganglia after kanamycin challenge. *Hear. Res*, **2005**; 201: 132–144.
222. **Mizuno A, Matsumoto N, Imai M, Suzuki M.** Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *Am. J. Physiol.: Cell Physiol*, **2003**; 285: C96–101.
223. **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): 1703–1709.
224. **Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED et al.** Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, **2004**; 427: 260–265.
225. **Sisignano M, Park CK, Angioni C, Zhang DD, von Hehn C, Cobos EJ et al.** 5,6-EET is released upon neuronal activity and induces mechanical pain hypersensitivity via TRPA1 on central afferent terminals. *J. Neurosci*, **2012**; 32: 6364–6372.
226. **Koivisto A, Chapman H, Jalava N, Korjamo T, Saarnilehto M, Lindstedt K et al.** TRPA1: A transducer and amplifier of pain and inflammation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*, **2014**; 114: 50–55.
227. **Takashima Y, Ma L, McKemy DD.** The development of peripheral cold neural circuits based on TRPM8 expression. *Neuroscience*, **2010**; 169: 828–842.
228. **Hondoh A, Ishida Y, Ugawa S, Ueda T, Shibata Y, Yamada T et al.** Distinct expression of cold receptors (TRPM8 and TRPA1) in the rat nodose-petrosal ganglion complex. *Brain Res*, **2010**; 1319: 60–69.
229. **Yajima T, Sato T, Hosokawa H, Kondo T, Saito M, Shimauchi H et al.** Distribution of transient receptor potential melastatin-8- containing nerve fibers in rat oral and craniofacial structures. *Ann Anat*, **2015**; 201: 1–5.
230. **Ficker E, Heinemann U.** Slow and fast transient potassium currents in cultured rat hippocampus cells. *J Physiol (Lond)*, **1992**; 445: 431–455.
231. **Wu LG, Saggau P.** Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trend Neurosci*, **1997**; 20: 204–212.
232. **Everill B, Rizzo MA, Kocsis JD.** Morphologically identified cutaneous afferent DRG neurons express three different potassium currents in varying properties. *J Neurophysiol*, **1998**; 79: 1814–1824.
233. **Takeda M, Tanimoto T, Ikeda M, Kadoi J, Matsumoto S.** Activation of GABAB receptor inhibits the excitability of rat small diameter trigeminal root ganglion neurons. *Neuroscience*, **2004**; 123: 491–505.
234. **Sarantopoulos CD, McCallum JB, Ringaud M, Fuchs A, Kwok WM, Hogan QH.** Opposing effects of spinal nerve ligation on calciumactivated potassium currents in axotomized and adjacent mammalian primary afferent neurons. *Brain Res*, **2007**; 1132: 84–99.

235. **Kawano T, Zoga V, McCallum JB, Wu HE, Gemes G, Liang MY, Abram S et al.** ATP-sensitive potassium currents in rat primary afferent neurons : Biophysical, pharmacological properties, and alterations by painful nerve injury. *Neuroscience*, **2009**; 162: 431-443.
236. **Tsuboi Y, Takeda M, Tanimoto T, Ikeda M, Matsumoto S, Kitagawa J et al.** Alternation of the second branch of the trigeminal nerve activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *Pain*, **2004**; 111: 323-334.
237. **Kitagawa J, Takeda M, Suzuki I, Kadoi J, Tsuboi Y, Honda K et al.** Mechanisms involved in modulation of trigeminal primary afferent activity in rats with peripheral mononeuropathy. *Eur J Neurosci*, **2006**; 24: 1976-1986.
238. **Ocana M, Del PE, Barrios M, Baeyens JM.** Subgroups among mu-opioid receptor agonists distinguished by ATP-sensitive K_p channel-acting drugs. *Br J Pharmacol*, **1995**; 114: 1296-1302.
239. **Ocana M, Barrios M, Baeyens JM.** Cromakalim differentially enhances antinociception induced by agonists of alpha(2)adrenoceptors, gamma-aminobutyric acid(B), mu and kappa opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **1996**; 276: 1136-1142.
240. **Vergoni AV, Scarano A, Bertolini A.** Pinacidil potentiates morphine analgesia. *Life Sci*, **1992**; 50: L135-L138.
241. **Cunha TM, Roman-Campos D, Lotufo CM, Duarte HL, Souza GR, Verri Jr. WA et al.** Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/ AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2010**; 107: 4442-4447.
242. **Lohmann AB, Welch SP.** ATP-gated K(+) channel openers enhance opioid antinociception: indirect evidence for the release of endogenous opioid peptides. *Eur J Pharmacol*, **1999**; 385: 119-127.
243. **Welch SP, Dunlow LD.** Antinociceptive activity of intrathecally administered potassium channel openers and opioid agonists: a common mechanism of action? *J Pharmacol Exp Ther*, **1993**; 267: 390-399.
244. **Edwards G, Weston AH.** Structure-activity relationships of K⁺ channel openers. *Trends Pharmacol Sci*, **1990**; 11: 417-422.
245. **Diener H-C, Dodick DW, Goadsby PJ, Lipton RB, Olesen J, Silberstein SD.** Chronic migraine—classification, characteristics and treatment. *Nat Rev Neurol*, **2011**; 8(3): 162-171.
246. **Stovner LJ, Tronvik E, Hagen K.** New drugs for migraine. *J Headache Pain*, **2009**; 10(6): 395-406.
247. **Monteith TS, Goadsby PJ.** Acute migraine therapy: new drugs and new approaches. *Curr Treat Options Neurol*, **2010**; 13(1): 1-14.
248. **Tfelt-Hansen P, Olesen J.** Taking the negative view of current migraine treatments. *CNS Drugs*, **2012**; 26(5): 375-382.
249. **Dodick D, Lipton RB, Martin V, Papademetriou V, Rosamond W, MaassenVanDenBrink A et al.** Consensus statement: cardiovascular safety profile of triptans (5-HT agonists) in the acute treatment of migraine. *Headache*, **2004**; 44(5): 414-425.
250. **Evers S, Marziniak M.** Clinical features, pathophysiology, and treatment of medicationoveruse headache. *Lancet Neurol*, **2010**; 9(4): 391-401.
251. **Hazard E, Munakata J, Bigal ME, Rupnow MFT, Lipton RB.** The burden of migraine in the United States: current and emerging perspectives on disease management and economic analysis. *Value Health*, **2009**; 12(1): 55-64.
252. **Kristoffersen ES, Lundqvist C.** Medication-overuse headache: epidemiology, diagnosis and treatment. *Ther Adv Drug Saf*, **2014**; 5(2): 87-99.
253. **Kristoffersen ES, Lundqvist C.** Medication-overuse headache: a review. *J Pain Res*, **2014**; 7: 367-378.

254. **Chambers JB, Seed PT, Ridsdale L.** Clopidogrel as prophylactic treatment for migraine: a pilot randomised, controlled study. *Cephalalgia*, **2014**; 34(14): 1163–1168.
255. **Tso AR1, Goadsby PJ.** New targets for migraine therapy. *Curr Treat Options Neurol.* **2014**; 16(11): 318.
256. **Goldstein DJ, Roon KI, Offen WW, Ramadan NM, Phebus LA, Johnson KW et al.** Selective serotonin 1F (5-HT(1F)) receptor agonist LY334370 for acute migraine: a randomised controlled trial. *Lancet*, **2001**; 358(9289): 1230–1234.
257. **Ziemann AE, Schnizler MK, Albert GW, Severson MA, Howard MA 3rd, Welsh MJ et al.** Seizure termination by acidosis depends on ASIC1a. *Nat Neurosci*, **2008**; 11(7): 816–822.
258. **Friese MA, Craner MJ, Etzensperger R et al.** Acidsensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat Med*, **2007**; 13(12): 1483–1489.
259. **Holland PR, Akerman S, Andreou AP, Karsan N, Wemmie JA, Goadsby PJ.** Acidsensing ion channel 1: a novel therapeutic target for migraine with aura. *Ann Neurol*, **2012**; 72(4): 559–563.
260. **Ma QP.** Co-localization of 5-HT(1B/1D/1F) receptors and glutamate in trigeminal ganglia in rats. *Neuroreport*, **2001**; 12(8): 1589–1591.
261. **Andreou AP, Goadsby PJ.** Therapeutic potential of novel glutamate receptor antagonists in migraine. *Expert Opin Investig Drugs*, **2009**; 18(6): 789–803.
262. **Ramadan NM.** The link between glutamate and migraine. *CNS Spectr*, **2003**; 8(6): 446–449.
263. **Wei EP, Moskowitz MA, Boccalini P, Kontos HA.** Calcitonin gene-related peptide mediates nitroglycerin and sodium nitroprusside-induced vasodilation in feline cerebral arterioles. *Circ Res*, **1992**; 70(6): 1313–1319.
264. **Afridi SK, Kaube H, Goadsby PJ.** Glyceryl trinitrate triggers premonitory symptoms in migraineurs. *Pain*, **2004**; 110(3): 675–680.
265. **Palmer J, Guillard F, Laurijssens B, Wentz AL, Dixon RM, Williams PM.** A randomised, single-blind, placebo-controlled, adaptive clinical trial of GW274150, a selective iNOS inhibitor, in the treatment of acute migraine. *Cephalalgia Int J Headache*, **2009**; 29: 124.
266. **Hoivik HO, Laurijssens BE, Harnisch LO, Twomey CK, Dixon RM, Kirkham AJ et al.** Lack of efficacy of the selective iNOS inhibitor GW274150 in prophylaxis of migraine headache. *Cephalalgia Int J Headache*, **2010**; 30: 1458–1467.
267. **Hou M, Uddman R, Tajti J, Kanje M, Edvinsson L.** Capsaicin receptor immunoreactivity in the human trigeminal ganglion. *Neurosci Lett*, **2002**; 330: 223–226.
268. **Riesco N, Cernuda-Morollón E, Pascual J.** Neuropeptides as a Marker for Chronic Headache. *Curr Pain Headache Rep*, **2017**; 21: 18.
269. **Zhang XF, Zhang WJ, Dong CL, Hu WL, Sun YY, Bao Y et al.** Analgesia effect of baicalein against NTG-induced migraine in rats. *Biomed Pharmacother*, **2017**; 90: 116–121.
270. **Inaba N, Shibata M, Onodera S, Tanaka M, Suzuki T, Kase N et al.** Capsaicin-induced calcitonin gene-related peptide release from isolated rat stomach measured with a new chemiluminescent enzyme immunoassay. *Jpn J Pharmacol*, **1996**; 72: 223–229.
271. **Zhou Y, Long H, Ye N, Liao L, Yang X, Jian F et al.** The effect of capsaicin on expression patterns of CGRP in trigeminal ganglion and trigeminal nucleus caudalis following experimental tooth movement in rats. *J Appl Oral Sci*, **2016**; 24: 597–606.
272. **Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitv KR et al.** Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, **2000**; 288: 306–313.
273. **Remadevi R, Szallisi A.** Adlea (ALGRX-4975), an injectable capsaicin (TRPV1 receptor agonist) formulation for longlasting pain relief. *IDrugs*, **2008**; 11: 120–132.

274. **Malmberg AB, Mizisin AP, Calcutt NA, von Stein T, Robbins WR, Bley KR.** Reduced heat sensitivity and epidermal nerve fiber immunostaining following single applications of a high-concentration capsaicin patch. *Pain*, **2004**; 111: 360-367.
275. **Marics B, Peitl B, Varga A, Pázmándi K, Bácsi A, Németh J et al.** Diet-induced obesity alters dural CGRP release and potentiates TRPA1-mediated trigeminovascular responses. *Cephalalgia*, **2017**; 37: 581-591.
276. **Shatillo A, Koroleva K, Giniatullina R, Naumenko N, Slastnikova AA, Aliev RR et al.** Cortical spreading depression induces oxidative stress in the trigeminal nociceptive system. *Neuroscience*, **2013**; 253: 341-349.
277. **Alessandri-Haber N, Yeh JJ, Boyd AE, Parada CA, Chen X, Reichling DB et al.** Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron*, **2003**; 39: 497- 511.
278. **Alessandri-Haber N, Joseph E, Dina OA, Liedtke W, Levine JD.** TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator. *Pain*, **2005**; 118: 70-79.
279. **Vergnolle N, Cenac N, Altier C, Cellars L, Chapman K, Zamponi G et al.** A role for transient receptor potential vanilloid 4 in tonic-induced neurogenic inflammation. *British Journal of Pharmacology*, **2010**; 159: 1161-1173.
280. **Sousa-Valente J, Andreou AP, Urban L, Nagy I.** Transient receptor potential ion channels in primary sensory neurons as targets for novel analgesics. *Br J Pharmacol*, **2014**; 171: 2508–2527.
281. **Lashinger ES, Steinging MS, Hieble JP, Leon LA, Gardner SD, Nagilla R et al.** AMTB, a TRPM8 channel blocker: Evidence in rats for activity in overactive bladder and painful bladder syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*, **2008**; 295: F803–F810.
282. **Burgos-Vega CC, Ahn DD, Bischoff C, Wang W, Horne D, Wang J et al.** Meningeal transient receptor potential channel M8 activation causes cutaneous facial and hindpaw allodynia in a preclinical rodent model of headache. *Cephalalgia*, **2016**; 36: 185–193.
283. **Ren L, Dhaka A, Cao YQ.** Function and postnatal changes of dural afferent fibers expressing TRPM8 channels. *Mol Pain*, **2015**; 11: 37.
284. **Green BG, McAuliffe BL.** Menthol desensitization of capsaicin irritation. Evidence of a short-term anti-nociceptive effect. *Physiol Behav*, **2000**; 68: 631-639.
285. **Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA et al.** International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*, **2005**; 57: 473–508.
286. **Stewart T, Beyak MJ, Vanner S.** Ileitis modulates potassium and sodium currents in guinea pig dorsal root ganglia sensory neurons. *J Physiol*, **2003**; 552: 797–807.
287. **Ocana M, Cendan CM, Cobos EJ, Entrena JM, Baeyens JM.** Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *Eur J Pharmacol*, **2004**; 500: 203–219.

8. EKLER

T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 20

08/03/2017

Konu : Kararlar

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Ex vivo sıçan meningeal preparasyonlarında geçici reseptör potansiyel kanallarının kalsitonin gen ilişkili peptid salınımı üzerine etkileri ve mekanizmalarının araştırılması
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR)	Yrd. Doç. Dr. Erkan KILINÇ
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS)	Yrd. Doç. Dr. Hamit YOLDAŞ, Yrd. Doç. Dr. Yaşar DAĞISTAN, Y. Lisans Öğ. Arzu ÇITAK
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	AİBÜ Deney Hayvanlar Uygulama ve Araştırma Merkezi

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2017/09	Tarih (Date): 22.02.2017
	Yrd. Doç. Dr. Erkan KILINÇ'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık Alanı	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Aysel KÜKNER (Başkan)	Histoloji ve Embriyoloji AD. Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Erol AYAZ (Üye)	Tıbbi Parazitoloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Hamit COŞKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi	
Prof. Dr. Neriman ŞENGÜL (Invivo Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Ali Rıza GEZİCİ (Üye)	Beyin Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Fatih ULAŞ (Üye)	Göz Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Mustafa ŞİT (Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Orçun TOPTAŞ (Üye)	Cerrahi AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Diş Hek. Fakültesi	
Doç. Dr. Yeşim YENER (Üye)	İlköğretim Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Eğitim Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Eray KEMAHİ (Üye)	Üroloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Serdar GÖZÜTOK (Üye)	Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Hayriye ORALLAR (Üye)	Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliği Bölümü	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Vet. Hek. Ayhan ÇETİNKAYA (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi	
Vet. Hek. Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLCA Hindi /BOLU	
Av. Cihan KARAGÖZ (Sivil Toplum Kuruluşu üyesi)	Avukat	Tabaklar Mahallesi Hürriyet cad. No. 47/7 Merkez/ BOLU	



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI
ORIJİNALLIK RAPORU

19/03/2018

AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Öğrencinin Adı Soyadı: Arzu ÇITAK

Numarası: 136206002

Anabilim Dalı: FİZYOLOJİ

Lisansüstü Eğitim
Düzeyi:

Yüksek Lisans



Doktora



Tez Başlığı: EX-VİVO SIÇAN MENİNGEAL PREPARASYONLARINDA GEÇİCİ RESEPTÖR
POTANSİYEL KANALLARININ KALSİTONİN GEN-İLİŞKİLİ PEPTİD
SALINIMI ÜZERİNE ETKİLERİ VE MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı yazılı olan tez çalışmasının kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan 102 sayfalık kısmına ilişkin 01/03/2018 tarihinde tarafımdan/tez danışmanımca **Turnitin** intihal tespit programında aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı “alıntılar hariç” yapıldığında % 2 “alıntılar dahil” yapıldığında ise % 2 olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan Filtrelemeler:

- 1- Kaynakça Hariç,
- 2- Alıntılar Hariç / Dahil
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç.

“AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması Ve Kullanılması Uygulama Esasları” nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin tespit edileceği durumda her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bilgilerinize arz ederim.

Arzu ÇITAK

Öğrencinin Ad Soyad ve İmza

EK: 1 adet tezin tam başlığını öğrencinin ad soyad bilgisini ve tezin toplam sayfa sayısını gösterecek şekilde raporlama işlemi bittikten sonra alınmış ekran görüntüsü eklenecektir.

TEZ DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR

19/03/2018

Dr. Öğr. Ü. Erkan KILINÇ

9. ÖZGEÇMİŞ

Arzu ÇITAK 10.03.1987 tarihinde Sivas'ın Gürün ilçesinde doğdu. İlkokul, lise ve üniversite öğrenimini Bolu'da tamamladı. 2006 yılında girdiği Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi İngilizce Biyoloji Bölümünden Haziran 2011'de mezun oldu. 2011 yılında girdiği Anadolu Üniversitesi Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü Sağlık Kurumları İşletmeciliğinden 2013'te mezun oldu. 2014 yılında girdi Anadolu Üniversitesi İktisat Fakültesi, Kamu Yönetimi Bölümünden 2016'da mezun oldu. 2012-2014 yılları arasında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalında Biyolog olarak çalıştı. 2015 yılından bu yana Spor Genel Müdürlüğünde çalışmaktadır.