

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



OPIOİDERJİK SİSTEM MODÜLASYONUNUN DENEYSEL
MİGREN MODELLERİNDE AĞRI VE NÖROJENİK
İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİLERİ VE
MEKANİZMALARI

FİZYOLOJİ DOKTORA TEZİ

CEMALETTİN DEMİR

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Erkan KILINÇ

BOLU, HAZİRAN 2025

KABUL VE ONAY SAYFASI

Cemalettin DEMİR tarafından hazırlanan “**OPİOİDERJİK SİSTEM MODÜLASYONUNUN DENEYSEL MİGREN MODELLERİNDE AĞRI VE NÖROJENİK İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİLERİ VE MEKANİZMALARI**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Fizyoloji Ana Bilim Dalı Fizyoloji Doktora Programında Doktora Tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir. 2/06/2025

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç. Dr. Erkan KILINÇ
İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa

.....

Üye
Prof. Dr. Akif Hakan KURT
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Fahri BAYIROĞLU
Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Orhan Tansel KORKMAZ
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

.....

Üye
Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Ethem TORUN
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

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

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

Bu çalışma için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulundan 2022/33 (değişiklik: 2023/24, 2023/46) sayısı ile etik izin alınmıştır.

.....
CEMALETTİN DEMİR

ÖZET

OPIOİDERJİK SİSTEM MODÜLASYONUNUN DENEYSEL MİGREN MODELLERİNDE AĞRI VE NÖROJENİK İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİLERİ VE MEKANİZMALARI

DOKTORA TEZİ

CEMALETTİN DEMİR

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

FİZYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. ERKAN KILINÇ)

BOLU, HAZİRAN – 2025

XIII + 94 sayfa

Sunulan çalışmada doğal enkefalinaz inhibitörü olan spinorfin aracılığıyla endojen opioid sistem modülasyonunun in-vivo ve ex-vivo migren modellerinde migren ile ilişkili mekanizmalar üzerine etkisi araştırılmıştır.

İn-vivo deney gruplarındaki sıçanlara 10 mg/kg nitrogliserin (NTG) intraperitoneal uygulanarak akut migren modeli oluşturuldu. NTG enjeksiyonundan 90 dakika sonra serum fizyolojik, spinorfinin düşük (0,5 mg/kg) ve yüksek (5 mg/kg) dozu, opioid reseptör antagonisti nalmefen (1 mg/kg) ve sumatriptan (600 µg/kg) ayrı ayrı veya birlikte gruplara göre uygulandı. Ex-vivo hemiskull preparatlarında kalsitonin gen ilişkili peptit (CGRP) salınımını indüklemek için kapsaisin (100 nM) uygulandı. Spinorfin (100 µM) ve in-vivo gruplarda test edilen diğer ilaçların hemiskull preparatlarında CGRP salınımı üzerine olan etkisi test edildi. Mekanik hiperaljezi von-Frey testi ile meningeal mast hücrelerinin sayı ve degranülasyonu ise toluidine-blue boyaması yapılarak belirlendi. CGRP ve c-Fos düzeyleri ELISA yöntemiyle analiz edildi. İn-vivo verilerin analizinde one-way ANOVA, ex-vivo verilerin analizinde tekrarlı ölçümler ANOVA kullanıldı.

İn-vivo deneylerde spinorfin NTG kaynaklı hiperaljezi, meningeal mast hücre aktivasyonu, CGRP salınımı ve c-fos ekspresyonu düzeylerini azalttı ($p<0.001$). Nalmefen spinorfinin etkilerini bloke etti ve böylece spinorfinin bu etkileri endojen opioid sistemi aktive ederek gösterdiğini doğruladı ($p<0.05$). Ex-vivo hemiskull preparatlarında spinorfin kapsaisin ile indüklenen CGRP salınımını azaltırken ($P<0.01$) nalmefen spinorfinin etkisini bloke etti. Sumatriptan in-vivo deneylerde NTG kaynaklı etkileri ($P<0.001$) ex-vivo deneylerde de kapsaisinin etkisini inhibe etti ($P<0.05$).

Spinorfin deneysel migren modellerinde nörojenik inflamasyonun bileşenleri olan CGRP ve mast hücre aktivasyonunu azaltarak antinosiseptif etki gösterdi. Bu sonuçlar spinorfinin vücudun doğal ağrı kesicileri olan opioidlerden enkefalinlerin düzeyini artırarak migren baş ağrısını iyileştirmede umut verici bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Migren, Spinorfin, Endojen opioid sistem, Enkefalinler, Nörojenik inflamasyon

ABSTRACT

EFFECTS AND MECHANISMS OF OPIOIDERGIC SYSTEM MODULATION ON PAIN AND NEUROGENIC INFLAMMATION IN EXPERIMENTAL MODELS OF MIGRAINE

PHD THESIS

CEMALETTİN DEMİR

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY

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

BOLU, JUNE 2025

XIII + 94 pages

The present study investigated the effect of endogenous opioid system modulation via spinorphin, a natural enkephalinase inhibitor, on migraine-related mechanisms in in-vivo and ex-vivo migraine models.

In the in-vivo experimental groups, an acute migraine model was established by intraperitoneal administration of 10 mg/kg nitroglycerin (NTG). At 90 minutes after NTG injection, saline, low (0.5 mg/kg) and high (5 mg/kg) doses of spinorphin, opioid receptor antagonist nalmefene (1 mg/kg) and sumatriptan (600 µg/kg) were administered separately or together according to the groups. Capsaicin (100 nM) was applied to induce calcitonin gene-related peptide (CGRP) release in ex-vivo hemiskull preparations. The effect of spinorphin (100 µM) and other drugs tested in in-vivo groups on CGRP release in hemiskull preparations was tested. Mechanical hyperalgesia was determined by von-Frey test and the number and degranulation of meningeal mast cells were determined by toluidine-blue staining. CGRP and c-Fos levels were analyzed by ELISA. One-way ANOVA was used to analyze in-vivo data and repeated measures ANOVA was used to analyze ex-vivo data.

In in-vivo experiments, spinorfin reduced the levels of NTG-induced hyperalgesia, meningeal mast cell activation, CGRP release and c-fos expression ($p<0.001$). Nalmefene blocked the effects of spinorphin, thus confirming that spinorphin exerts these effects by activating the endogenous opioid system ($p<0.05$). In ex-vivo hemiskull preparations, spinorphin reduced capsaicin-induced CGRP release ($P<0.01$), while nalmefene blocked the effect of spinorphin. Sumatriptan inhibited NTG-induced effects in in-vivo experiments ($P<0.001$) and the effect of capsaicin in ex-vivo experiments ($P<0.05$).

Spinorphin showed antinociceptive effects in experimental migraine models by reducing CGRP and mast cell activation, components of neurogenic inflammation. These results suggest that spinorphin has promising potential to improve migraine headache by increasing the level of enkephalins, one of the opioids that are the body's natural painkillers.

KEYWORDS: Migraine, Spinorphin, Endogenous opioid system, Enkephalins, Neurogenic inflammation

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ	ix
FOTOĞRAF LİSTESİ.....	x
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xi
TEŞEKKÜR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Migren	5
1.2 Migren Patofizyolojisi	6
1.2.1 Kortikal Yayılan Depresyon.....	7
1.2.2 Trigeminovasküler Sistem.....	8
1.2.3 Nörojenik İnflamasyon	10
1.3 Dura Mater.....	12
1.4 Meningeal Mast Hücreleri	13
1.5 CGRP	14
1.6 C-Fos	17
1.7 Endojen Opioid Sistemi.....	18
1.8 Opioid Reseptörleri ve Sinyalizasyonu	19
1.8.1 μ Opioid Reseptörü.....	20
1.8.2 δ Opioid Reseptörü.....	22
1.8.3 κ Opioid Reseptörü.....	23
1.8.4 Nosiseptin Reseptörü.....	24
1.9 Endojen Opioid Peptitler	25
1.9.1 Endorfinler.....	25
1.9.2 Enkefalinler	26
1.9.3 Dinorfinler	28
1.9.4 Nosiseptin/Orfanin FQ	29
1.10 Endojen Opioid Sistemi ve Ağrı Düzenlemesi.....	30
1.11 Nalmefen	32
1.12 Endojen Opioid Peptitlerin Yıkımı.....	32
1.13 Spinorfin.....	33
1.14 Migrenin Tedavisi	35
2. MATERYAL ve YÖNTEM	38

2.1 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Cihazlar	38
2.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	39
2.3 Deney Solüsyonları ve Hazırlanışları	39
2.3.1 Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS) Hazırlanışı	39
2.3.2 Yapay Beyin Omurilik Sıvısı (yBOS)	39
2.3.3 Paraformaldehit (PFA) Hazırlanışı	40
2.4 İn Vivo Deney Grupları ve Deneysel Uygulamalar	40
2.5 İn Vivo Deney Grupları	41
2.5.1 Grup 1: Kontrol Grubu (NTG Çözücüsü + SF)	41
2.5.2 Grup 2: NTG + SF Grubu	41
2.5.3 Grup 3: NTG + Spin-1 Grubu	41
2.5.4 Grup 4: NTG + Spin-2 Grubu	42
2.5.5 Grup 5: NTG + Spin (etkin) + Nal Grubu	42
2.5.6 Grup 6: NTG + Sumatriptan Grubu	42
2.5.7 Grup 7: NTG + Sumatriptan + Spin Grubu	42
2.6 Von-Frey Testi İle Mekanik Hiperalejinin Ölçülmesi	43
2.7 İn Vivo Deneylerin Sonlandırılması ve İntrakardiyak Perfüzyon	44
2.8 Beyin Sapı, Trigeminal Gangliyon ve Dura Materin Çıkarılması	45
2.9 Dokuların Homojenizasyonu	45
2.10 Dura Mater Preparatlarının Hazırlanması	46
2.11 Mast Hücre Sayı ve Degranülasyonunun Belirlenmesi	46
2.12 Ex Vivo Deneysel Uygulamalar ve Hemiskull Preparatlarının Hazırlanması	47
2.13 Ex Vivo Deney Grupları	47
2.13.1 Grup 1: Spinorfin, Nalmefen ve Kapsaisin Ayrı Uygulamaları	48
2.13.2 Grup 2: Kapsaisin + Spinorfin	49
2.13.3 Grup 3: Kapsaisin + Spinorfin + Nalmefen	49
2.13.4 Grup 4: Kapsaisin + Sumatriptan	49
2.13.5 Grup 5: Kapsaisin + Sumatriptan + Spinorfin	50
2.14 CGRP ve C-Fos Düzeylerinin ELISA Yöntemiyle Analizi	50
2.14.1 ELISA Prosedürünün Uygulanması	50
2.15 Verilerin İstatistiksel Analizi	51
3. BULGULAR	52
3.1 Migrenin İn Vivo Gruplarında Ağrı Eşiğindeki Değişimler	52
3.2 İn Vivo Gruplarda Beyin Sapı C-Fos Düzeyleri	53
3.3 İn Vivo Gruplarda Beyin Sapı ve Trigeminal Gangliyon CGRP Düzeyleri	54
3.4 İn Vivo Deney Gruplarında Meningeal Mast Hücrelerinin Sayıları ve Degranülasyon Düzeyleri	55
3.5 Ex Vivo Hemiskull Preparatlarında CGRP Düzeyleri	56
4. TARTIŞMA	59
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	68

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Migrende trigeminovasküler sistem ile nosiseptif iletim.....	9
Şekil 1.2. Nörojenik inflamasyonun bileşenleri ve trigeminovasküler aktivasyon	11
Şekil 1.3. CGRP reseptörü ve sinyalizasyonu	16
Şekil 1.4. CGRP salınımı ve mast hücre degranülasyonunun karşılıklı tetiklenmesi	17
Şekil 1.5. Opioid reseptör sinyalizasyonu ile hücrede neden olduğu etkiler	20
Şekil 1.6. Endojen opioid sistem peptit ve reseptörlerinin sinir sistemindeki dağılımı.....	30
Şekil 1.7. Endojen opioid sistem tarafından ağrı iletiminin inhibisyonu.....	31
Şekil 1.8. Spinorfinin antinoseptif etki mekanizması	33
Şekil 2.1. İn vivo deneysel süreç	40
Şekil 2.2. Ex vivo deneysel süreç	48
Şekil 3.1. İn vivo deney gruplarında periorbital ve plantar ağrı eşiği değerleri	52
Şekil 3.2. İn vivo deney gruplarında beyin sapı c-Fos düzeyleri.....	53
Şekil 3.3. İn vivo deney gruplarında trigeminal gangliyon ve beyin sapı CGRP düzeyleri	54
Şekil 3.4. İn vivo deney gruplarında meningeal mast hücre sayıları ve degranülasyon düzeyleri.....	56
Şekil 3.5. İn vivo deney gruplarında intakt ve degranüle meningeal mast hücrelerinin gösterimine ait görüntüler	56
Şekil 3.6. Ex vivo hemiskull preparatlarında (Grup 1, 2, 3) CGRP salınım düzeyleri	57
Şekil 3.7. Ex vivo hemiskull preparatlarında (Grup 4, 5) CGRP salınım düzeyleri	58
Şekil 4.1. NTG ile oluşturulan migren modelinde Spinorfin'in etkilerinin şematik gösterimi.....	65

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1. Endojen opioid sistemin ligand ve reseptörleri.....	19
Tablo 2.1. Kullanılan laboratuvar malzemeleri ve cihazlar.	38
Tablo 2.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve kitler.	39
Tablo 2.3. İn vivo deney grupları ve enjeksiyonlar.....	41



FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 2.1. Von-Frey filament testinin plantar uygulaması	43
Fotoğraf 2.2. Von-Frey filament testinin periorbital uygulaması	44
Fotoğraf 2.3. İntrakardiyak perfüzyon işleminin gerçekleştirilmesi	44
Fotoğraf 2.4. Çıkarılan kranyum, beyin sapı ve trigeminal ganglion dokuları	45
Fotoğraf 2.5. Dura materin çıkarılması ve preparat için yayma	46
Fotoğraf 2.6. yBOS içerisinde süperfüzyon ve izole hemiskull preparatı	47



KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

5-HT	: 5-hidroksitriptamin, Serotonin
ACE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
APN	: Aminopeptidaz N
ATP	: Adenozin trifosfat
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
Ca⁺²	: Kalsiyum
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
c-Fos	: Hücresel yapıdaki Fos
CGRP	: Kalsitonin gen ilişkili peptit
CLR	: Kalsitonin benzeri reseptör
DENKI	: Çift enkefalinaz inhibitörü
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DOR	: Delta opioid reseptörü
DPP III	: Dipeptidil peptidaz-3
DRG	: Dorsal kök ganglionu
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
Fos	: Finkel, osteojenik sarkom
FQ/NOP	: Nosiseptin/Orfanin FQ
GABA	: Gama aminobütirik asit
GIRK	: G-protein bağlı içeri doğrultucu potasyum kanalı
i.p.	: İntraperitoneal
K⁺	: Potasyum
KOR	: Kappa opioid reseptörü
KYD	: Kortikal yayılan depresyon
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
MOR	: Mu opioid reseptörü
NEP	: Neprilisin
NO	: Nitrik oksit
NOP	: Nosiseptin reseptörü
NTG	: Nitrogliserin
ORL1	: Opioid reseptör benzeri-1
PACAP	: Hipofiz adenilat siklaz aktive edici peptit

PAG	: Periakuduktal gri
PAR-2	: Proteinazla aktive olan reseptör-2
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PFA	: Paraformaldehit
PKA	: Protein kinaz A
PLC	: Fosfolipaz C
RAMP1	: Reseptör aktivitesini modifiye edici protein 1
RCP	: Reseptör komponent proteini
SF	: Serum fizyolojik
SP	: P maddesi
TCC	: Trigeminoservikal kompleks
TNC	: Trigeminal nukleus kaudalis
VİP	: Vazoaktif intestinal peptit
yBOS	: Yapay beyin omurilik sıvısı

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca beni akademik olarak yetiştiren ve bana her türlü desteği vererek tecrübelerini aktaran, kendisinden çok fazla şey öğrendiğim değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Erkan KILINÇ hocama saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez hazırlama sürecinde bana destek olan ve akademik gelişimime birçok katkı sağlayan Sayın Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Ethem TORUN hocama teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın farklı aşamalarında önemli katkılarda bulunan Dr. Öğr. Üyesi Yasemin BARANOĞLU KILINÇ' a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasında yaptığım araştırmayı destekleyen Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No:2023-TDR-6.12.56-0001)'ne desteği için teşekkür ederim.

Bana desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen ve benim için birçok fedakarlıkta bulunan maddi ve manevi desteğini gördüğüm canım annem, canım babam, sevgili eşim ve çocuklarıma sonsuz teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Migren 4 ile 72 saat süren tekrarlayıcı ataklarla kendini gösteren birincil baş ağrısı bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. Migren baş ağrısı genellikle tek taraflı, zonklayıcı ve şiddeti fiziksel aktivite ile artabilen karakteristiğe sahiptir. Ayrıca mide bulantısı, fotofobi, fonofobi gibi belirtilerle ilişkilendirilmektedir (Headache Classification Committee of the International Headache Society [IHS], 2013). Dünya genelinde görülme oranı %10'un üzerinde olan ve bir milyardan fazla insanı etkileyen migren nörolojik olarak en sık görülen engellilik nedenlerinden biridir (L. Stovner vd., 2007; Steiner vd., 2016). Migren baş ağrısı genellikle stres, uyku bozukluğu, hormonal bozukluk, besinler ve çevresel faktörler tarafından tetiklenebilmektedir (Mollaoğlu, 2013).

Migrenin patofizyolojisi kortikal yayılan depresyon ile başlayan ve adenosin trifosfat (ATP), glutamat, potasyum ve hidrojen iyonları, kalsitonin gen ilişkili peptit (CGRP) ve nitrik oksit (NO) gibi vazoaaktif nöropeptidlerin salınmasıyla devam eden kompleks bir süreci içermektedir. Mast hücre degranülasyonu ve vazodilatasyon gibi değişikliklere neden olan bu süreç trigeminovasküler yolun aktivasyonu ile gerçekleşir (D. W. Dodick, 2018a). Migren baş ağrısının oluşmasına ve iletilmesine aracılık eden trigeminovasküler yol; meninksleri ve büyük serebral damarları innerve eden nosiseptif lifler ile trigeminal ganglion gibi nöral yapılardan oluşur. Trigeminovasküler yolun aktivasyonu nosiseptif nöronların uyarılmasıyla başlar ve nosiseptif bilginin beynin merkezi bölgeleri ile kortekse iletilmesine neden olur (D. W. Dodick, 2018a; Goadsby vd., 2017).

Migren baş ağrısının kaynağının beyni çevreleyen üçlü zar yapı olan meninksler ve özellikle de dura mater olduğu ifade edilmektedir. Dura mater innerve eden trigeminal ganglionun duysal sinirleri aynı zamanda kan damarlarını da innerve eder. Bu meningeal sinirlerin meningeal nosiseptörler aracılığıyla duyarlılaşması baş ağrısının patofizyolojisinde başlangıç aşaması olarak söylenebilir. Migren tetikleyicilerinin ise dura materdeki nosiseptif aktivasyona neden olduğu düşünülmektedir (Levy ve Moskowitz, 2023). Meningeal nosiseptörlerin aktivasyonu ile periferik sinir dallarının aksonlarından CGRP ve P maddesi (SP) gibi vazoaaktif nöropeptidler salınmaktadır. Kan damarlarını da innerve eden sinirlerden bu maddelerin salınması vazodilatasyon ve damar

geçirgenliğinde artış gibi değişikliklere neden olur. Bunlara ek olarak plazma protein ekstrasvazasyonu ve mast hücre degranülasyonu gibi olayların da gerçekleştiği bu süreç nörojenik inflamasyon olarak adlandırılır (Bolay vd., 2002; Spekker vd., 2021). Trigeminovasküler sistemin aktivasyonu ile ortaya çıkan nörojenik inflamasyon migren baş ağrısının oluşmasında temel mekanizmadır ve baş ağrısının giderek kötüleşmesine neden olur (Levy ve Moskowitz, 2023).

Meningeal mast hücreleri dura materdeki nosiseptörlerle yakından ilişkili olmakla birlikte bu bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu ve degranülasyonu nörojenik inflamasyonun önemli bir kısmını oluşturur. Ayrıca meningeal mast hücreleri ile nosiseptörler arasındaki çift yönlü bir etkileşimin migren baş ağrısının oluşumunda ve ilerlemesinde katkısı olduğu düşünülmektedir (Guan vd., 2023). Dural mast hücrelerinin degranülasyonu migren baş ağrısının oluşması ile ilgili yapılar olan meningeal nosiseptörler ve nosiseptif beyin sapı trigeminovasküler nöronlarını aktive eder (Levy vd., 2007). Migren mediyatörü olarak bilinen nöropeptidlerden CGRP'nin mast hücre aracılı nörojenik inflamasyona katkıda bulunabileceği, P maddesinin de mast hücre aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (Balcziaik ve Russo, 2022; Kulka vd., 2008).

Merkezi ve periferik sinir sisteminde yaygın olarak ifade edilen nöropeptid CGRP'nin migren hastalarında atak sırasında ve ataklar arasında kandaki seviyesinin arttığını gösteren çalışmalar vardır (Cernuda-Morollón vd., 2013; Goadsby vd., 1988, 1990; Goadsby ve Edvinsson, 1993). Yine migren hastalarına CGRP infüzyonu yapıldıktan sonra migrenin semptomlarından olan mide bulantısı, fotofobi gibi semptomları tetiklediği görülmüştür (Younis vd., 2019). CGRP ve reseptörüne yönelik antikorlar ile reseptör antagonistlerinin geliştirilmesi tedavi için ümit verici gelişmeler olmuştur (de Vries Lentsch vd., 2021; Rivera-Mancilla vd., 2020; Scheffler vd., 2021). CGRP'nin trigeminovasküler sistemin aktivasyonu ve nörojenik inflamasyon ile ilişkili rolü olduğu bilinmektedir ancak migrenin karmaşık patofizyolojisindeki yeri henüz netleştirilebilmiş değildir (Goadsby vd., 1988; Nosedá ve Burstein, 2013; Villalón ve Olesen, 2009). Günümüzde CGRP migrenin patofizyolojisindeki yerinin aydınlatılması ve etkili bir tedavi seçeneği sunması bakımından çalışmalarda popülerliğini korumaktadır.

Hücrel aktivitenin bir belirteci olarak bilinen c-Fos proteini çeşitli uyaranlar neticesinde eksprese edilir ve çalışmalarda nöral aktivasyonun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Beyin ve omurilikte c-fos geninin bazal

ekspresyonu düşüktür ancak bazı uyaranlarla uyarıdan sonra dakikalar içinde hızlıca artar ve pik yapar (Aparicio vd., 2022; Hunt vd., 1987). Trigeminal uyarım sonrası beyin sapı periakvaduktal gri (PAG) bölgesinde c-Fos ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Hoskin vd., 2001). Nitrogliserinle (NTG) oluşturulan deneysel migren modellerinde beyin sapı trigeminal nukleus kaudalis bölgesinde c-Fos ekspresyonundaki artış trigeminal aktivasyon ve nosisepsiyonun önemli bir belirteci olarak kullanılmaktadır (Mitsikostas ve Sanchez del Rio, 2001; Kilinc vd., 2024).

Migren araştırmalarında çeşitli deneysel hayvan modelleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında trigeminal gangliyonun elektriksel uyarımı, dura materin elektriksel ve kimyasal uyarımı, nitrogliserinin sistemik uygulanması gibi yöntemlerle oluşturulan modeller yer alır (Spekker vd., 2024). Organik bir nitrat olan ve güçlü bir vazodilatör etkiye sahip olan nitrogliserin aynı zamanda nitrik oksit donörü olması sebebiyle migreni tetikleyebilmektedir (Sureda-Gibert vd., 2022). Kapsaisin ise dura materin kimyasal uyarımı şeklinde yapılan migren modeli oluşturmada kullanılan bir bileşiktir (Spekker vd., 2024). Bu migren modelinde kapsaisinin kranial preparatlarda dura matere doğrudan uygulanması trigeminovasküler aktivasyona, CGRP salımına ve nosisepsiyona neden olur (Citak vd., 2022; Dux vd., 2003). Nitrogliserin ve kapsaisin ile oluşturulan in vivo ve ex vivo migren modelleri migrenin doğasını ve olası tedavi seçeneklerini araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Migrenin tedavi yöntemleri arasında önleyici tedavi, akut tedavi ve farmakolojik olmayan terapi yaklaşımları yer almaktadır (Ashina vd., 2021). Akut tedavide parasetamol gibi analjezikler, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar ve triptanlar kullanılırken yakın zamanda onaylanan ditanlar ve gepantlar da sınırlı olarak kullanılmaktadır (Ashina vd., 2021; Steiner vd., 2019). Migrenin profilaktik tedavisinde beta blokerler, topiramat gibi ilaçlar ve CGRP ile reseptörü için geliştirilmiş monoklonal antikorlar kullanılabilmektedir (Charles ve Pozo-Rosich, 2019; Loder vd., 2012). İlaçların bazı hastalarda yetersiz kalması ve yan etkiler ortaya çıkarması gibi kısıtlılıklardan dolayı yeni tedavi arayışları devam etmektedir.

Endojen opioid sistem, merkezi ve periferik sinir sisteminde varlık gösteren ağrı, duygu, stres yanıtı, gastrointestinal ve otonomik düzenleme gibi birçok fizyolojik işlevde rol oynayan önemli bir sistemdir (Benarroch, 2012; Lutz ve Kieffer, 2013; Stein, 2016). Ağrının modülasyonunda önemli bir işlevi olan endojen

opioid sistemin plasebo analjezisi, stres kaynaklı analjezi, PAG stimölasyonu ile oluşan analjezi gibi durumlarda rolü olduğu bilinmektedir (Butler ve Finn, 2009; Carlino vd., 2011; Hosobuchi vd., 1977). Endojen opioid sistem ağrının modölasyonunda etkin rolünden dolayı migren bař ağrısının tedavisi için umut verici bir hedef olarak dűřünülebilir.

Endojen opioid sistem, klasik olarak üç peptit ailesi ve bunların etkileşimine aracılık eden üç reseptör ailesinden oluşur. Bunlar endorfinler, enkefalinler ve dinorfinler ile sırasıyla bu peptitlerin afinite gösterdiği mu-opioid reseptörü (MOR), delta-opioid reseptörü (DOR) ve kappa-opioid reseptörü (KOR) olarak bilinir (Benarroch, 2012). Yakın zamanda keşfedilen nosiseptin reseptörü (NOP) ise endojen opioid sisteminin klasik olmayan üyesi olarak ifade edilmektedir (Mika vd., 2011). G protein eşlenik reseptör özelliğinde olan opioid reseptörleri genellikle ikinci haberci sistemlerini devreye sokarak ve iyon kanallarının aktivitesini düzenleyerek sinyal iletimini ve nöronal uyarılabilirliği azaltıcı etkiye neden olurlar (Shenoy ve Lui, 2023).

Opioid peptitler salındıktan sonra hızlıca parçalandığı için etki süreleri oldukça kısadır. Aminopeptidaz N (APN) ve neprilisin (NEP) gibi enzimler aracılığıyla gerçekteşen bu yıkım opioid sistem aktivitesini sınırlayıcı bir etkiye sebep olmaktadır (Janecka vd., 2008; Mosnaim vd., 2008; Roques vd., 2012). Doğal ve sentetik enkefalinaz inhibitörleri kullanılarak endojen opioidlerin özellikle de enkefalinlerin miktarı korunabilmekte ve etkileri artırılabilir (Rougeot vd., 2003; Saėaga vd., 2013; Sobocí Nska vd., 2020; Wisner vd., 2006). Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu şekilde inflamasyon ve ağrının baskılanabileceğini göstermiştir (Kamysz vd., 2016; Rougeot vd., 2003; Tian vd., 2009).

Spinorfin sığır omuriliğinden izole edilmiş bir doğal enkefalinaz inhibitörüdür ve APN, NEP, dipeptidil peptidaz-3 (DPP III) enzimlerinin aktivitesini inhibe etmektedir (Honda vd., 2001; Nishimura ve Hazato, 1993b). Bu şekilde endojen opioid aktiviteyi düzenleyen spinorfinin antiinflamatuvar ve analjezik etki gösterdiği yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Honda vd., 2001; Y. Yamamoto vd., 2002). Yamamoto ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ağrısı olan hastaların beyin omurilik sıvısında (BOS) kontrollere göre daha fazla spinorfin bulunduğunu ve enkefalinazlardan DPP III'ün de daha az bulunduğunu tespit ettiler (Y. Yamamoto vd., 2005). Spinorfin ve diğer endojen peptitlerin ağrı düzenlemesi

üzerine etkisi bunları migren baş ağrısının tedavisi için de güvenli bir odak konumuna getirmektedir.

Bu tez çalışmasında endojen peptit olan spinorfinin endojen opioid sistem düzenlemesiyle antinosiseptif etkiye neden olup migren baş ağrısını hafifletebileceğini ayrıca antiinflamatuvar etki göstererek migren patofizyolojisinin önemli bir bileşeni olan nörojenik inflamasyonu azaltabileceğini ve mast hücre degranülasyonunu baskılayabileceğini hipotez olarak öne sürmekteyiz.

Hipotezimize dayanarak sunduğumuz çalışmada spinorfinin sıçanlarda nitrogliserin ile oluşturulan in-vivo ve kapsaisin ile oluşturulan ex-vivo deneysel migren modellerinde migren baş ağrısı ve trigeminovasküler sistemden CGRP salınımı, c-fos ekspresyonu, meningeal mast hücre aktivasyonu ile aracılık ettiği nörojenik inflamasyon üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.1 Migren

Dünya genelinde bir milyardan fazla insanı etkileyen yaygın ve ağır bir nörolojik bozukluk olan migren fotofobi, fonofobi, mide bulantısı gibi semptomlarla birlikte görülen, fiziksel aktivite ile artan tek taraflı ve zonklayıcı tarzda baş ağrısı olarak tanımlanmaktadır (Gupta ve Gaurkar, 2022; Olesen, 2018). Genç yetişkinlerde engellilik nedeni olarak ilk sıralarda yer alan migrenin dünya nüfusunda görülme oranı %15 civarındadır ve bayanları (%18,9) erkeklere oranla (%9,8) daha fazla etkilemektedir (Steiner vd., 2016; L. J. Stovner vd., 2018). Migren atakları hastaların yarısından fazlasında aktivite kısıtlamasına, aile ve sosyal hayatta kesintilere neden olduğundan migren engelliliğe neden olan ağır bir hastalıktır (Lipton vd., 2001). Migren sınıflandırılırken auralı ve aurasız migren olarak iki ana gruba ayrılır. Ayrıca klinik sınıflandırmada ayda en az 15 gün meydana gelip en az 8 günü migren baş ağrısının özelliğinde ve 3 aydan fazla süredir devam ederse kronik migren, ayda 14 günden az meydana gelirse epizodik migren olarak adlandırılmaktadır (Olesen, 2018).

Migrenin etiyolojisi hala net olarak anlaşılabilmiş değildir. Genetik, çevresel ve nörolojik etmenlerin migren baş ağrısının oluşumunda kaynak teşkil edebileceği ifade edilmektedir (Giraldo ve Zarifkar, 2024). Migrene yatkınlıkta genetik faktörlerin rolü olduğu bilinmektedir ve vakaların %30-60'lık bir kısmında kalıtsal aktarım söz konusudur (Sutherland vd., 2019). Migrenin bir alt grubu olan ailevi hemiplejik migrende otozomal dominant kalıtım olduğu net olarak

bilinmektedir (Russell ve Ducros, 2011). Öte yandan hormonal dengesizlikler, stres gibi psikolojik faktörler, diyabet, obezite gibi metabolik faktörler, kadın cinsiyeti ve alkol bağımlılığı gibi bazı etkenler migren gelişimi için risk faktörleridir (Amiri vd., 2021).

Migren atağı sırasıyla prodromal faz, aura fazı, baş ağrısı fazı ve postdromal faz olmak üzere dört evreden oluşur (Khan vd., 2021). Migrenin önsezi evresi olan prodromal evre baş ağrısından 72 saat öncesine kadar uzanabilir (Giffin vd., 2003). Bu evrede en çok görülen belirtiler olan esneme, ruh hali değişikliği ve uyuşukluğa ek olarak ense sertliği, ışığa ve sese hassasiyet, huzursuzluk, terleme, iştah artışı, üşüme hissi, görsel odaklanma zorluğu gibi belirtiler de görülebilmektedir (Laurell vd., 2016). Migren hastalarının üçte birinde görülen aura fazı genellikle baş ağrısından önce başladığı gibi baş ağrısıyla birlikte de görülebilir ve 60 dakikadan daha az sürer (Olesen, 2018; Launer vd., 1999). Auralar genellikle görseldir ve parıldayan çizgiler, şekiller şeklinde görülür. Buna ek olarak görme ve işitme bozukluğu gibi duyuşsal bozukluklarla konuşma bozukluğu ve motor bozukluk da görülebilir (Olesen, 2018; Van Dongen ve Haan, 2019). Aurayı takiben ortaya çıkan tek taraflı, zonklayıcı ve fiziksel aktiviteyle artan özellikteki baş ağrısı fazı birkaç saatten birkaç güne kadar devam edebilir (Olesen, 2018; Burstein vd., 2015). Bu süreçte baş ağrısındaki artışla birlikte mide bulantısı, kusma, depresyon, sinirlilik, baş dönmesi, fotofobi, fonofobi, suya karşı hassasiyet, burun tıkanıklığı ve göz yaşarması gibi bulgulara eşlik edebilir (Lipton vd., 2001; Kelman ve Tanis, 2006). Baş ağrısından sonraki postdromal fazda ise yorgunluk, güçsüzlük, bilişsel zayıflık ve ruh hali değişiklikleri görülmektedir (Charles, 2013; Kelman, 2006).

1.2 Migren Patofizyolojisi

Migrenin patofizyolojisi henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir ancak yapılan çalışmalarda hastalığa dair bazı mekanizmalar açıklanabilmektedir. Bu konuda ilk ortaya atılan teori olan vasküler teori 1940'lı yıllarda nörolog Wolff tarafından daha da geliştirilmiştir (Rogawski, 2008). Bu teoriye göre migren atağını tetikleyen kranial damarlardaki vazokonstriksiyon yetersiz kanlanmadan dolayı auraya neden olmakta ve ardından kanlanmayı artırmak için gelişen intrakranial ve ekstrakranial damarlardaki vazodilatasyon perivasküler inflamasyon ve sinir uyarımına yol açarak ağrıya neden olmaktadır (Rogawski, 2008; Schumacher ve Wolff, 1941). Migren baş ağrısını azaltmada fayda sağlayan triptanlar ve gepantların aynı

zamanda damarlarda vazokonstriksiyona sebep olması ve migreni tetikleyici ajanların da vazodilatasyona sebep olması bu fikri desteklemiştir (Shevel, 2011). Ancak Olesen ve arkadaşlarının yaptığı baş ağrısı sırsındaki kan akışı ölçümlerinin bunu desteklememesi ve sumatriptanın vazokonstriktör etkisinin yanı sıra nöral etkilerinin de olduğunun fark edilmesi gibi gelişmeler bu teori hakkında şüphelere neden olmuştur (Goadsby vd., 2017; Olesen vd., 1990).

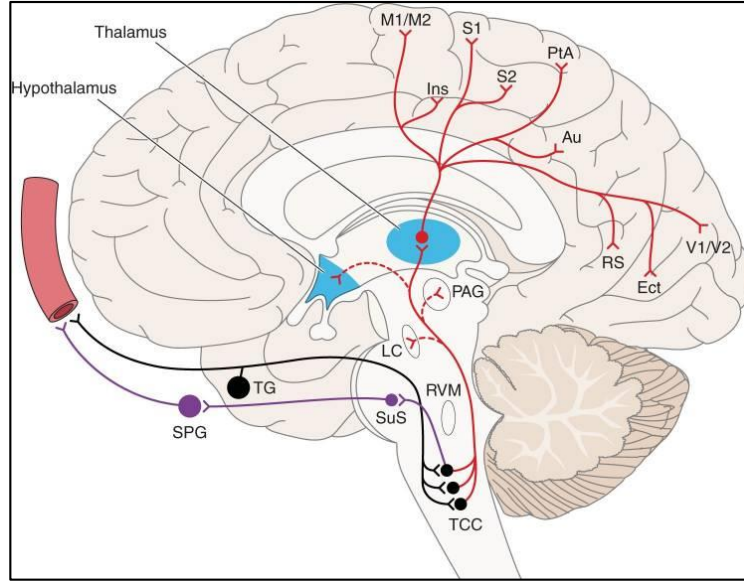
1.2.1 Kortikal Yayılan Depresyon

1943 yılında nörofizyolog Leão tarafından doktora çalışması sırasında keşfedilen kortikal yayılan depresyon (KYD) migren aurasının temel nedeni olarak kabul edilmektedir (Teive vd., 2005). KYD serebral kortekste nöral ve glial hücre zarlarında 2-5 mm/dk hızında ilerleyen ve 15-30 dk süren bir depolarizasyon dalgası ve ardından kortikal aktivitenin baskılandığı bir süreç ile karakterizedir ((D. W. Dodick, 2018a; Rogawski, 2008). Bir grup nöronda ortaya çıkıp yayılan bu depolarizasyonun hücre dışında fazla birikmiş potasyum iyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Somjen, 2001). Kortekste aşırı uyarılabilir nöronların devamlı olarak oluşturduğu potansiyeller sonucunda bu birikme meydana gelmekte ve devamında hücre zarı iyon gradyanında bozulma, sodyum ve kalsiyum iyon akışı ve glutamat salımı ile daha da artmaktadır (Rogawski, 2008; Smith vd., 2006). Nöronal ateşlemenin yanında mekanik, elektriksel veya kimyasal uyarım ile de oluşabilen KYD nöronlar veya glial hücreler arasında gap junction bağlantıları aracılığıyla ilerlemektedir (Smith vd., 2006; Somjen, 2001). KYD'un migren atağını başlatabileceğini düşünenler olduğu gibi bunun migrenin özellikle aura ile ilgili bir alt fenomeni olduğunu düşünenler de vardır (Charles, 2018; Close vd., 2019). Deneysel çalışmalarda KYD'un orta meningeal arterde vazodilatasyona, trigeminoservikal kompleks (TCC) nöronal aktivitesinde ve meningeal nosiseptör aktivitesinde artışa neden olması migren atağının oluşumunda katkısının olduğunu düşündürmüştür (Bolay vd., 2002; X. Zhang vd., 2011; X. C. Zhang vd., 2010). Ayrıca CGRP ve reseptörlerine yönelik tedavi yaklaşımlarının KYD oluşumunu baskılayabileceğini ve KYD'un sıçan beyinde CGRP salınımını artırabileceğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Close vd., 2019). Öte yandan auranın baş ağrısından önce meydana gelmesi, migren ataklarının birçoğunda auranın görülmemesi veya baş ağrısı ile aura arasındaki zamansal örtüşmenin her zaman aynı olmaması gibi sebepler KYD ve auranın migren baş ağrısının oluşumunda

kesin bir role sahip olamayacağını düşündürmektedir (IHS, 2013; Charles, 2018). Ayrıca KYD üzerine inhibitör etkisi olan tonabersatin migrenli hastalarda aura ataklarını azalttığı fakat baş ağrısında bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir (Hauge vd., 2009).

1.2.2 Trigeminovasküler Sistem

Trigeminovasküler sistem esas olarak meninksleri ve intrakranial damarları innerve eden trigeminal ganglion nöronlarından oluşur ve bu lifler merkezi olarak trigeminal nukleus kaudalis (TNC) ile üst servikal omurilik dorsal boynuzu kapsayan trigeminoservikal komplekse (TCC) uzanırlar (Nosedo ve Burstein, 2013; Iyengar vd., 2019). Trigeminovasküler yol migren baş ağrısı ile ilgili nosiseptif bilgiyi meninkslerden alıp beyne ve ilgili merkezi yapılara iletmektedir. Trigeminal gangliondan kaynaklanan nosiseptif lifler miyelinsiz C lifleri ile ince miyelinli Aδ lifleridir ve çoğunlukla trigeminal sinirin oftalmik dalına az miktarda da maksiller ve mandibular dalına aittir (Goadsby vd., 2017). TCC'ye gelen nosiseptif bilgi buradan yükselen projeksiyonlar ile ventrolateral periaqueductal gri, retiküler formasyon, superior salivatuvar çekirdek gibi beyin sapı çekirdekleri ile talamus, hipotalamus ve bazal ganglion çekirdeklerine iletilir (Goadsby vd., 2017; Malick vd., 2000). Migren baş ağrısı ile birlikte görülen mide bulantısı, esneme, yorgunluk, iştahsızlık, idrara çıkma, sinirlilik gibi semptomlar bu bağlantılar aracılığıyla gerçekleşebilir (Burstein ve Jakubowski, 2005). Nosiseptif uyarılar bu yapılardan daha yüksek merkezi alanlara projekte olur. Bu alanlar somatosensoriyel ve motor korteks ile retrosplenial, insular, görsel, işitsel, koku, parietal asosiyasyon korteksi gibi alanlardır ve korteksin birçok bölgesine gerçekleşen bu projeksiyon nosiseptif sinyallerin işlenmesini sağlamakla birlikte odaklanma güçlüğü, fotofobi, fonofobi, allodini gibi migren baş ağrısının karakteristik özelliklerinin ortaya çıkmasını da açıklamaktadır (Nosedo vd., 2011).



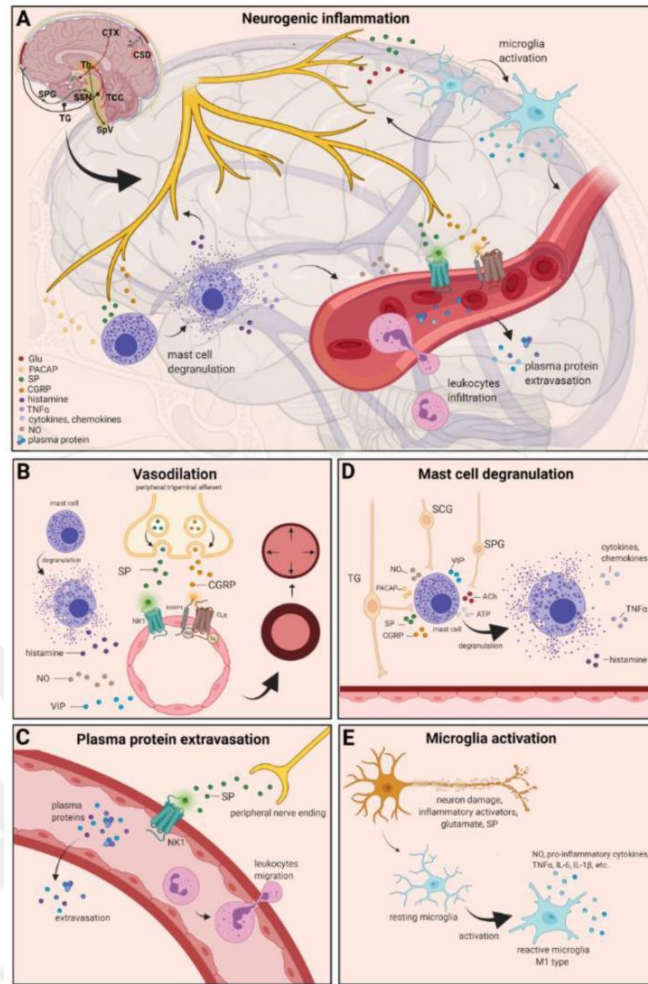
Şekil 1.1. Migrende trigeminovasküler sistem ile nosiseptif iletim (Goadsby vd., 2017).

Trigeminovasküler sistemin aktivasyonunun ve duyarlılaşmasının migren atağını başlattığı düşünülmektedir (Nosedá ve Burstein, 2013). KYD'un da meningeal nosiseptörleri uyararak trigeminovasküler sistemi aktive edebildiği, merkezi trigeminovasküler nöronları aktive edebildiği ve bu şekilde baş ağrısını tetiklediği bildirilmiştir (X. Zhang vd., 2011). Trigeminovasküler sistemin aktivasyonuna yol açan meningeal nosiseptörlerin duyarlılaşmasına CGRP gibi nöropeptitlerin aracılık ettiği nörojenik inflamasyon ve mast hücre degranülasyonu gibi süreçler de eşlik eder (Messlinger vd., 2011). Periferik trigeminovasküler nöronların aktivitesindeki artış devamında spinal trigeminal nükleus ve talamusdaki ikinci ve üçüncü sıra nöronlarda duyarlılaşmaya neden olur (Burstein vd., 2000). Merkezi duyarlılaşma diye ifade edilen bu süreç kutanöz allodiniye periferik duyarlılaşma ise eğilmeyle baş ağrısındaki artışla ilişkilendirilmektedir (Burstein vd., 2000; Burstein vd., 2010). Levy ve arkadaşları sumatriptanın periferik ve merkezi trigeminovasküler nöronlar arasında iletimi engelleyebildiğini ve merkezi duyarlılaşma meydana gelmeden uygulandığında bu durumu engelleyebildiğini gösterdiler (Levy vd., 2004). Bu durum migrenin başlangıcında meningeal nosiseptörlerin aktivasyonunun yer aldığı fikrini desteklemektedir. Ray ve Wolff bilinci açık insanlarda dural ve serebral damarların elektriksel uyarımının migren benzeri baş ağrısı ve semptomlara neden olduğunu yıllar önce bildirmişlerdir (Ray ve Wolff, 1940). Ayrıca migren baş ağrısı sırasında salınımı artan nöropeptit CGRP

çoğunlukla trigeminal liflerin aktivasyonu ile salınmaktadır (Goadsby vd., 1988, 1990; Uddman vd., 1985). Bu gibi veriler trigeminovasküler sistemin periferik kısmının aktiflenmesinin migren baş ağrısını başlatmada etkili olduğunu desteklemektedir.

1.2.3 Nörojenik İnflamasyon

Meninkslerdeki trigeminovasküler sisteme ait nosiseptif nöronların mekanik veya kimyasal uyarılarla uyarılması sonucunda bu nosiseptif afferent liflerden SP ve CGRP gibi vazoaaktif nöropeptitler salınır ve arteriyel vazodilatasyon, plazma protein ekstrasvazasyonu, mast hücre degranülasyonu süreçleri ile karakterize nörojenik inflamasyona neden olur (Şekil 1.2.) (Koyuncu Irmak vd., 2019; Levy vd., 2019). Bu nöropeptit salınımı aktive olmuş trigeminovasküler afferent nöronlardaki akson refleksi ile gerçekleşir ve vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri ile mast hücreleri gibi bağışıklık hücrelerini etkileyerek nörojenik inflamasyonun basamaklarını tetikler (Geppetti vd., 2012).



Şekil 1.2. Nörojenik inflamasyonun bileşenleri ve trigeminovasküler aktivasyon (Spekker vd., 2021).

Migren önleyici ilaçların ağrıyı azaltması ile genişlemiş ekstrakranial arterlerin daralması arasındaki zamansal uyum ve baş ağrısı ile intra-ekstrakranial arterlerin genişlemesi arasındaki zamansal uyum arteryel vazodilatasyonun bu süreçteki varlığını desteklemektedir (Asghar vd., 2011). Trigeminal ganglionun elektriksel uyarımının dural kan damarlarında plazma protein ekstrasvazasyonuna neden olduğu yapılan bir hayvan deneyinde gösterilmiştir (Markowitz vd., 1987). Triptanlar gibi migreni önleyici ilaçların da bu plazma protein ekstrasvazasyonunu bloke ettiği bildirilmiştir (Buzzi vd., 1991). Bir migren hastasının olgu sunumunda görüntüleme yöntemi ile atak sırasında intrakraniyal plazma ekstrasvazasyonu belirlendiği bildirilmiştir (Knotkova ve Pappagallo, 2007). Periferik nosiseptif nöronlar bağışıklık hücreleri ile etkileşim içerisindedir ve bu etkileşim nörojenik inflamasyona katkıda bulunur (Chiu vd., 2012). Bunlar içerisinde özellikle

migrende odak haline gelen meningeal mast hücreleri aktive olduklarında meningeal nosiseptörleri aktive edebilen proinflamatuvar mediyatörler salgılar (J. Yan vd., 2013; X. C. Zhang vd., 2007). Migrenli hastalarda mast hücre aktivasyonunun göstergesi olan mast hücre mediyatörlerinin plazma seviyelerinin yüksek olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Heatley vd., 1982; Perini vd., 2005). Kortikal yayılan depresyon dural mast hücrelerin degranülasyonuna neden olmaktadır (Karatas vd., 2013).

Nörojenik inflamasyon bazı inflamatuvar ajanları içeren bir karışımın dura matere uygulanması ile deneysel olarak oluşturulabilmektedir ve migrende görülen hiperalejiyi ortaya çıkarabilir (L. Yan vd., 2018). Bilinci açık sıçanlarda bu yolla oluşturulan nörojenik inflamasyon modelinde migrendekine benzer şekilde merkezi ve periferik hassasiyette artış görülmüştür (Becerra vd., 2017). Migrenli hastalarda internal juguler venöz kanda inflamatuvar mediyatör seviyesinde artış olması ve steroid, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların migren baş ağrısını azaltmada etkili olması da migren patogenezinde nörojenik inflamasyonun varlığının birer göstergesi olarak düşünülebilir (Puleda, Silva, vd., 2023; Sarchielli vd., 2006; Woldeamanuel vd., 2015).

1.3 Dura Mater

Beyin ve omuriliği koruyan zar yapısı olan meninksler pia mater, araknoid mater ve dura mater olmak üzere üç katmandan oluşur (Coles vd., 2017). En dıştaki yapı olan dura mater sempatik ve parasempatik sinir lifleri, trigeminal afferent nöron sonlanmaları ve serebral kan damarları bakımından zengin olmakla birlikte mast hücreleri gibi çeşitli bağışıklık hücreleri de burada bol miktarda bulunur (Balcziaik ve Russo, 2022; Burgos-Vega vd., 2015; Xianli vd., 2014). Trigeminal sinir oftalmik dalı aracılığıyla dura materin innervasyonunu sağlarken trigeminal gangliondan çıkan liflerle beyin sapında trigeminal nukleus kaudalis bölgesine bağlantı yapar (Burgos-Vega vd., 2015).

Meningeal afferent sinirlerin mekanik ve kimyasal uyaranlara karşı oldukça hassas olduğu bilinmektedir (Strassman vd., 1996; Levy ve Strassman, 2002). Ayrıca bu afferent sinir sonlanmalarından aktive olduklarında CGRP, SP, hipofiz adenilat siklaz aktive edici peptit (PACAP) gibi vazoaaktif nöropeptidler salınır. Bu nöropeptidlerden özellikle CGRP'nin migren patogenezinde rolü olduğu bilinmektedir (Levy ve Moskowitz, 2023). Dural afferentler ATP, histamin,

sitokinler ve prostaglandinler gibi proinflamatuvar moleküller tarafından da aktive edilebilir ve bu şekilde meningeal inflamasyon ve hasarı algılar (X. C. Zhang vd., 2007; Levy ve Strassman, 2004; X. Zhang vd., 2012). Bu moleküllerin meningeal alanda artması dural afferentlerin duyarlılaşmasına ve migren baş ağrısına neden olabilir (Levy ve Moskowitz, 2023).

Auralı migrenin bir özelliği olan KYD kortikal nöronlardan ve glial hücrelerden bazı aljezik mediyatörlerin salınımına neden olabilir. Bu mediyatörler bağışıklık hücrelerini uyarabildiği gibi meningeal afferentlerin aktivasyonuna ve duyarlılaşmasına neden olabilir (Levy ve Moskowitz, 2023). Levy ve arkadaşlarının yaptığı elektrofizyolojik çalışmada KYD'un mmeningeal afferentlerin mekanik duyarlılığına neden olduğunu gösterilmiştir (J. Zhao ve Levy, 2016).

1.4 Meningeal Mast Hücreleri

Dura materde makrofajlar, T hücreleri, antijen sunucu hücreler ve mast hücreleri gibi çeşitli bağışıklık hücreleri bulunmaktadır (Burgos-Vega vd., 2015; Rustenhoven vd., 2021). Bunlar içerisinde migren patogenezinin önemli bir parçası olduğu düşünülen mast hücreleri histamin, triptaz, SP, prostaglandinler, sitokinler gibi mediyatörleri içerir ve mast hücrelerinin salgıladığı proinflamatuvar mediyatörler ile migrendeki nörojenik inflamasyona aracılık ettiği düşünülmektedir (da Silva vd., 2014; Erdener vd., 2021).

Dural mast hücreleri dura materin beslenmesini sağlayan ana arter olan orta meningeal arter etrafında bol miktarda bulunduğu gibi dural afferent sinirlerle de yakından ilişkilidir (Burgos-Vega vd., 2015; X. C. Zhang ve Levy, 2008). Mast hücre mediyatörü triptazın meningeal nosiseptif nöronlardaki proteinazla aktive olan reseptör 2 (PAR-2)'yi aktive ederek nosiseptif duyarlılığa neden olduğu gösterilmiştir (X. C. Zhang ve Levy, 2008). Ayrıca mast hücrelerinin ATP ile aktive olan purinerjik reseptörleri ifade ettiği bilinmektedir ve aktive olduklarında mast hücre degranülasyonuna sebep olarak migren baş ağrısını tetikleyebilir (Nurkhametova vd., 2019). Dural mast hücre degranülasyonu trigeminal ganglion stimülasyonu sonucunda meydana gelen artmış vasküler geçirgenliğin bir nedenidir ve antimigren ilaçlar trigeminal stimülasyonla oluşan mast hücre degranülasyonu, vazodilatasyon ve ekstrasvazasyonu engelleyebilir (Buzzi vd., 1992; Williamson vd., 1997).

İnsan meningeal mast hücrelerinin CGRP reseptörü ifade etmediği düşünülürken fare ve maymunlarda dural mast hücrelerinin CGRP reseptörü eksprese ettiğine dair çalışmalar yapılmıştır (Levy ve Moskowitz, 2023; Miller vd., 2016; Ottosson ve Edvinsson, 1997). Öte yandan CGRP'nin bir çapraz etkileşim yoluyla mast hücre degranülasyonunu tetikleyebildiği ve nörojenik inflamasyona yol açtığı bilinmektedir (Balcziak ve Russo, 2022). Bir hayvan çalışmasında mast hücre degranüle edici bir ajan olan compound 48/80 intraperitoneal olarak enjekte edildiğinde CGRP salgılayabilen trigeminovasküler afferentlerin uzun süreli aktivasyonuna neden olmuştur (Levy vd., 2007). CGRP'nin aracılığına ek olarak SP ve PACAP gibi nöropeptitler de kemirgenlerde meningeal mast hücrelerini aktive edebilmektedir (Ottosson ve Edvinsson, 1997; Schwenger vd., 2007; Baun vd., 2012). Migren mediyatörü CGRP salındığında mast hücrelerinden başka makrofajlar ve nötrofiller gibi diğer bağışıklık hücrelerini de etkileyerek nörojenik inflamasyonu tetikleyebilir (Pinho-Ribeiro vd., 2023).

Nitrogliserin ile oluşturulan hayvan migren modeli kullanılarak yapılan birçok çalışmada mast hücre degranülasyonundaki artış görülmektedir ve bu duruma CGRP salınımındaki artış eşlik etmektedir (Kilinc vd., 2020, 2022; Torun vd., 2024). Trigeminoasküler sistemin aktivasyonu sonucunda salınan CGRP ve mast hücre degranülasyonu ile salınan inflamatuvar mediyatörlerin migrendeki nörojenik inflamasyon üzerine ortak etkisi ve bu iki süreç arasındaki karşılıklı etkileşim henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da migren patogeneğinde önemli odak haline gelmiştir.

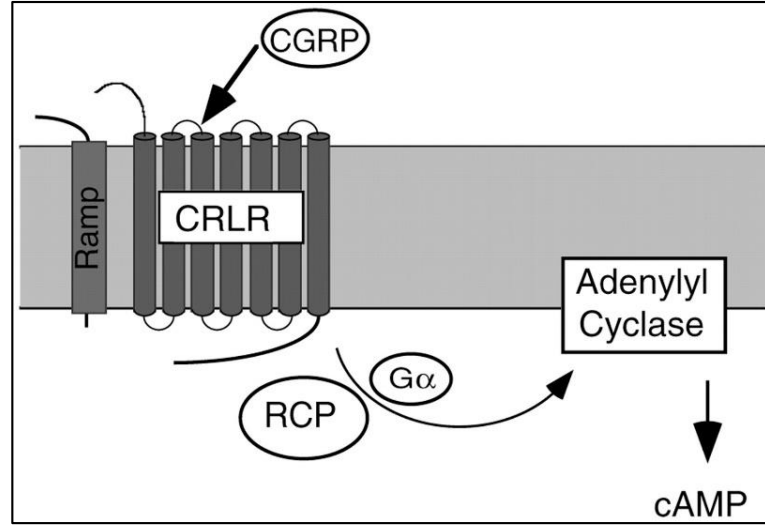
1.5 CGRP

Vücutta merkezi ve periferik sinir sistemi, kaslar gibi birçok yapıda reseptörleriyle birlikte etkisi bulunan CGRP 37 amino asitli bir nöropeptittir ve migren patofizyolojisinde oldukça önemli bir role sahiptir (Recober ve Russo, 2009; Van Rossum vd., 1997). CGRP trigeminal ganglion ve trigeminal afferent sinir uçlarından salınan güçlü bir vazodilatatördür ve nosiseptif iletimi kolaylaştırır (Eftekhari vd., 2010; Messlinger, 2009). Trigeminoasküler sistemde meningeal ve serebral arterler gibi kan damarlarını innerve eden sinir liflerinden CGRP salınımı vardır ve bu genellikle SP ile birlikte gerçekleşir (Edvinsson vd., 1987; Meßlinger vd., 1993). Merkezi sinir sisteminin beyincik, talamus, amigdala, rafe çekirdekleri, locus coeruleus, spinal trigeminal nükleus ve spinal kordun üst segmentleri gibi

kısımlarındaki nöronlarda CGRP ifade edilmektedir (Edvinsson vd., 2011; Eftekhari ve Edvinsson, 2011; Skofitsch ve Jacobowitz, 1985).

CGRP reseptörü kalsitonin benzeri reseptör (CLR), reseptör aktivitesini modifiye edici protein (RAMP1) ve reseptör komponent proteini (RCP) yapılarını ihtiva eden bir G protein eşlenik reseptör özelliğindedir (Evans vd., 2000; McLatchie vd., 1998). Küçük bir transmembran protein olan RAMP 1 CLR aracılığıyla CGRP bağlanmasını sağlar (Hay vd., 2006). Ayrıca RAMP CLR'nin hücre yüzeyine taşınmasına aracılık eder (McLatchie vd., 1998). Reseptörün stoplazmik bileşeni olan RCP sinyal iletimini kolaylaştıran bir proteindir (Evans vd., 2000).

CGRP reseptörünün aktivasyonu genellikle adenilat siklazin aktive olması devamında siklik AMP (cAMP) artışı ile protein kinaz A (PKA)'nın aktivasyonu şeklinde ilerleyen yolağı aktive eder (Şekil 1.3.) (Walker vd., 2010). CGRP reseptörü fosfolipaz C (PLC), mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolları ve arrestinlere bağlanma gibi daha az bilinen diğer yollarla da sinyal üretebilir (Walker vd., 2010; Brain ve Grant, 2004; Drissi vd., 1998). CGRP reseptörü ile PKA aktivasyonu vazodilatasyona, sinaptik ve nosiseptif iletimde artışa neden olabilmektedir (Brain ve Grant, 2004; Han vd., 2010). Ayrıca bu yolak arter düz kas hücresinde ATP'ye duyarlı potasyum (K^+) kanallarını ve nöronlarda L tipi kalsiyum (Ca^{+2}) kanallarını aktive eder (Hosokawa vd., 2010; Wellman vd., 1998). PKA ayrıca endotel hücrelerinde endotelial nitrik oksit sentazı (eNOS) aktive edip nitrik oksit üretimini artırarak da vazodilatasyona neden olur (Brain ve Grant, 2004).

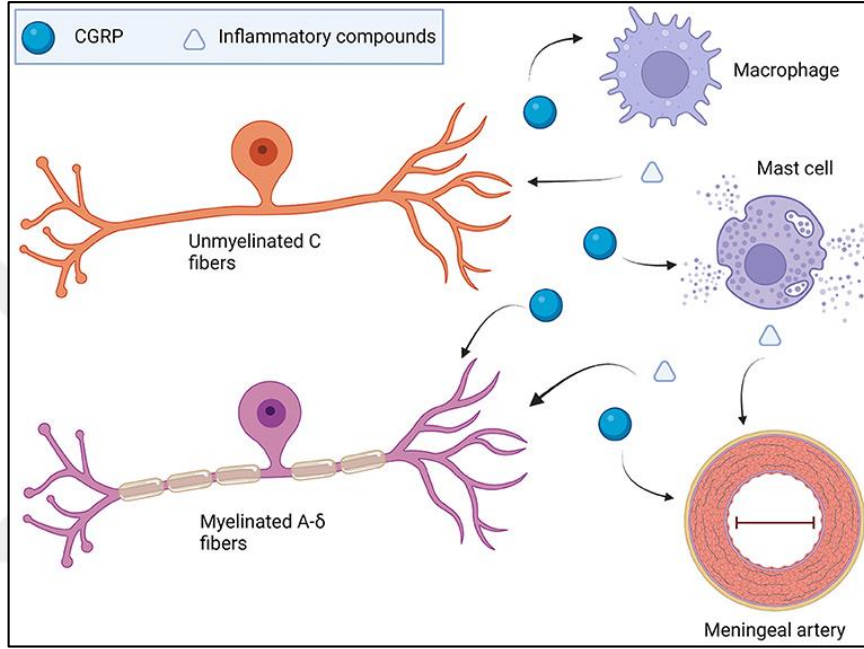


Şekil 1.3. CGRP reseptörü ve sinyalizasyonu (Evans vd., 2000).

Serebral dolaşımda oldukça etkili bir vazodilatör peptit olan CGRP migren hastalarının periferik kanında atak sırasında ve atak dışı zamanda artmış olarak bulunmaktadır (Brain ve Grant, 2004; Cernuda-Morollón vd., 2013; Edvinsson, 2018). CGRP kan düzeyindeki yükselme migren için bir biyobelirteç olarak düşünülse de CGRP'nin kısa yarı ömürlü bir peptit olması bu durumu sınırlamaktadır (Cernuda-Morollón vd., 2013; Kraenzlin vd., 1985). CGRP'nin migrenli bireylerdeki BOS konsantrasyonları da yüksektir (Van Dongen vd., 2017). Migren hastalarına CGRP infüzyonu migren baş ağrısını tetiklemektedir (Hansen vd., 2010; Lassen vd., 2002). Bununla birlikte CGRP monoklonal antikor tedavisi ile CGRP antagonistleri migrenin önleyici ve akut tedavisinde oldukça etkilidir (Deng vd., 2020; Ha vd., 2021). Deneysel migren modellerinde beyin sapı, trigeminal ganglion ve plazma CGRP düzeyleri artmış olarak görülmektedir (Capuano vd., 2014; Farajdokht vd., 2018; Mahmoudi vd., 2018).

Trigeminal ganglion uyarımıyla sağlanan trigeminovasküler sistemin aktivasyonu ekstraserebral dolaşımda CGRP düzeylerini artırmıştır (Goadsby vd., 1988). Trigeminal ganglion nöronlarının neredeyse yarısı CGRP ifade etmektedir ve bunlar genellikle küçük çaplı C lifleri ile Aδ liflerinden oluşan duyuşal nöronlardır (Eftekharı vd., 2010; Tajti vd., 1999). CGRP reseptörleri ise trigeminal ganglionda genellikle CGRP ifade etmeyen nöronlarda yaygın olarak eksprese edilmekle birlikte glial hücreler ve serebral damarların duvarında bulunur (Uddman vd., 1985; Eftekharı vd., 2010; Edvinsson vd., 1987). Öte yandan CGRP meningeal mast hücrelerinin degranülasyonuna ve nörojenik inflamasyona yol açar (Lennerz

vd., 2008; Schwenger vd., 2007; Theoharides vd., 2005). Buna karşılık mast hücreleri de bir mediyatörü olan triptaz ile PAR-2 reseptör aktivasyonuna yol açar ki bu durum meningeal nosiseptör duyarlılaşması, vazodilatasyon ve CGRP salınımı süreçlerini tetiklemiş olur (X. C. Zhang ve Levy, 2008; Dux vd., 2009; Koyuncu Irmak vd., 2019). Bu durum CGRP ve mast hücrelerinin karşılıklı etkileşimle migren patogenezinde iki önemli partner olarak yer aldığını göstermektedir (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. CGRP salınımı ve mast hücre degranülasyonunun karşılıklı tetiklenmesi (Balcziak ve Russo, 2022).

1.6 C-Fos

Genler aktive olma ve hız bakımından erken yanıt ve geç yanıt genleri şeklinde ikiye ayrılmaktadır. C-Fos geni erken yanıt genleri grubuna dahildir (Mitsikostas ve Sanchez del Rio, 2001). C-Fos ekspresyonu uyarıdan sonra dakikalar içerisinde gerçekleşir ve birkaç saat devam eder (Greenberg vd., 1985; Greenberg ve Ziff, 1984). Fos terimi ilk olarak bir viral onkogeni kodlamak için kullanılmıştır ve onkogenin adında geçen finkel, osteojenik ve sarkom kelimelerinin kısaltması olarak oluşturulmuştur (Curran ve Teich, 1982; Morgan ve Curran, 1991). Viral onkogen fosun insan ve faredeki homolog kromozomal dizisi c-fos onkogeni olarak ifade edilmiştir (Curran vd., 1983).

Anlık erken gen c-Fos ekspresyonu trigeminovasküler afferent nöronların aktivitesinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Levy vd., 2007; Mitsikostas vd., 1998; Nozaki, Boccalini, vd., 1992). Periferik uyarım sonrası merkezi sinir sistemindeki nöronal aktiviteyi gösteren c-Fos ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak tespit edilmesine dair birçok çalışma vardır (Bullitt, 1990; Hunt vd., 1987; Knyihár-Csillik vd., 2000; Persson vd., 1993). Trigeminal sinir tarafından innerve edilen intra ve ekstrakranial yapıların mekanik, kimyasal veya elektriksel olarak uyarılması trigeminal nukleusta c-Fos ekspresyonunu tetiklemektedir (Mitsikostas ve Sanchez del Rio, 2001). Auralı migrenin tetikleyicisi olan KYD'nin trigeminovasküler yolu aktive ederek TNC içinde ipsilateral olarak c-Fos ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Moskowitz vd., 1993). Bununla birlikte trigeminal ganglionun elektriksel uyarımı da beyin sapı TNC'de c-Fos ifadesini artırmaktadır (Bohár vd., 2013). Nitrogliserin ile tetiklenen deneysel migren modellerinde TNC gibi merkezi sinir sisteminin farklı bölgelerinde c-Fos ekspresyonunda artış görülmektedir ve bu durum bir migren belirtici olarak kabul edilmektedir (Xiao vd., 2024; L. Zhang vd., 2023; Zhu vd., 2017).

1.7 Endojen Opioid Sistemi

Endojen opioid sistemi merkezi ve periferik sinir sisteminde yaygın olarak bulunan ve otonomik, endokrin, gastrointestinal düzenleme, nosiseptif iletim, öğrenme, hafıza, ruh hali değişiklikleri, ödül ve stres yanıtı gibi süreçlerin düzenlenmesine aracılık eden kompleks bir ligant ve reseptörler sistemidir (Higginbotham vd., 2022; Rullo vd., 2024). Opioiderjik sistem endojen opioidler ve reseptörleriyle düzenlemeyi sağladığı gibi haşhaş (*Papaver somniferum*) bitkisinden elde edilen morfin gibi eksojen opiyatlar da bu reseptörler üzerinden etki etmektedir (Zöllner ve Stein, 2006). Morfine benzer olarak geliştirilen sentetik opioidler de aynı sistem üzerinden etki etmektedir ancak bunların eksojen olarak uygulanması oldukça ağır yan etkilere neden olabilmektedir (Pathan ve Williams, 2012).

Endojen opioid sisteminin μ (MOR), κ (KOR) ve δ (DOR) opioid peptit reseptörü adında üç klasik reseptörü ve bir de klasik olmayan Nosiseptin/Orfanin (FQ/NOP) reseptörü bulunur (Cansız vd., 2021). Endojen opioid sistemin ligandları ise β -endorfinler, dinorfinler, enkefalinler ve nosiseptin/orfanin FQ olmak üzere

dört ana opioid peptit ailesinden oluşur (Corder vd., 2018). Proopiomelanokortin endorfinlerin, proenkefalin enkefalinlerin, pronosiseptin nosiseptinin ve prodinorfin dinorfinlerin öncülleridir (Ganesh, 2021).

1.8 Opioid Reseptörleri ve Sinyalizasyonu

Opioid peptitlerden β -endorfinler μ (MOR), enkefalinler δ (DOR), dinorfinler κ (KOR) ve nosiseptin NOP reseptörleri üzerinden etki etmekle birlikte bu opioidlerden bazıları değişik afiniteyle diğer reseptörleri de aktive edebilmektedir (Pathan ve Williams, 2012). β -endorfinler μ ve δ opioid reseptörlerine yaklaşık olarak eşit afinite gösterirken enkefalinler δ opioid reseptörlerine μ reseptörlerine göre 10 kat daha fazla afinite gösterir. Dinorfinler ise daha çok κ reseptörlerine afinite göstermekle birlikte μ ve δ reseptörlerine de önemli oranda etki etmektedir (Ballantyne ve Chavkin, 2020). Opioid reseptörlerinin klasik olmayan üyesi nosiseptin/orfanin FQ reseptörü nosiseptinin hedefi iken diğer opioidlerin bu reseptöre afinitesi yoktur (Higginbotham vd., 2022). Henüz öncülleri tanımlanmamış endojen peptitler olan endomorfinler ise μ opioid reseptörlerine oldukça yüksek afinite gösterir (Zadina vd., 1997).

Tablo 1.1. Endojen opioid sistemin ligand ve reseptörleri (Rullo vd., 2024).

Endojen Opioid Peptit	Opioid Peptit – Reseptör Afinitesi
β -endorfin	MOR, DOR (MOR = DOR)
Met-enkefalin	DOR, MOR (DOR > MOR)
Leu-enkefalin	
Dinorfin A	KOR, MOR, DOR
Dinorfin B	KOR > MOR ve DOR
Nosiseptin/Orfanin FQ	NOP

Opioid reseptörleri G protein eşlenik reseptörlerdir ve genellikle inhibitör G protein aktivasyonu ile adenilat siklaz - cAMP inhibisyonu yoluyla üzerinden etki ederek hücrede hiperpolarizasyon ve nörotransmitter salınımında azalma gibi baskılayıcı etkilere neden olurlar (Pathan ve Williams, 2012). Ayrıca reseptör uyarımı G-protein bağlı içeri doğrultucu potasyum (GIRK) kanallarını aktive etme ve voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarını inhibe etme şeklindeki iyon kanalı düzenlemesiyle uyarılabilirliği azaltabilir (Bourinet vd., 1996; North ve Williams, 1985). Opiod

reseptörlerinin uyarımı PLC ve MAPK aktivasyonu gibi ikinci haberci yollarını da aktive edebilir (Al-Hasani ve Bruchas, 2011; Murthy ve Makhlof, 1996). Bunlara ek olarak opioid reseptörlerinin uzun süreli aktivasyonu arrestin proteinlerinin devreye girmesine ve böylece reseptör fosforilasyonu ve içe alımının gerçekleşmesine neden olur (Ballantyne ve Chavkin, 2020). Sonuç olarak merkezi ve periferik sinir sisteminde presinaptik ve postsinaptik nöronlarda yaygın olarak bulunan opioid reseptörlerinin aktivasyonu presinaptik nörotransmitter salınımının engellenmesi ve postsinaptik nöronal inhibisyon gibi etkilerle sinir iletimini baskılamaktadır (Reeves vd., 2022).

Şekil 1.5. Opioid reseptör sinyalizasyonu ile hücrede neden olduğu etkiler (Rullo vd., 2024).

Morfin için birincil bağlanma özelliğine sahip olduklarının anlaşılmasıyla bu ismi alan μ opioid reseptörleri opioid aracılı antinoseptif etkilere ek olarak kannabinoidler, alkol ve nikotin gibi bağımlılık yapıcı maddeler ile sosyal ilişkiler gibi olumlu etkileşimlerin ödüllendirici etkilerinin oluşmasına aracılık etmektedir (Friedman ve Nabong, 2020). MOR'lar merkezi sinir sisteminde en fazla bulunan opioid reseptörleridir ve medulla spinalisin dorsal boynuzu, somatosensorial serebral korteks gibi nouseptif bilginin işlenmesiyle alakalı bölümlerinde yaygındır (Herman vd., 2024). Medulla spinalisde duyuusal iletimin afferent liflerinin olduğu

substantia gelatinosa (lamina I ve II) alanında presinaptik ve postsinaptik olarak bulunurken supraspinal bölgelerde de presinaptik olarak yaygındır ve genellikle yükselen yolların baskılanmasına inen yolların da aktivasyonuna neden olur (Friedman ve Nabong, 2020; Herman vd., 2024). Talamus, PAG gibi başka ağrı düzenlemesiyle alakalı yapılarda olduğu gibi hipotalamus, mezensefalon, limbik sistem ve korteksin birçok alanında da MOR ifade edilmektedir (Herman vd., 2024; Mizoguchi vd., 2012). Sinir sistemi dışında gastrointestinal sistem, göz bebeği, lenfosit, makrofaj, nötrofil, mast hücreleri gibi bağışıklık hücrelerinde de ifade edilir (Börner vd., 2013; Martínez-Cuevas vd., 2024).

MOR için primer agonist endojen opioid β -endorfindir ancak enkefalinler ve dinorfinler de bağlanabilir (Friedman ve Nabong, 2020; Herman vd., 2024). Eksojen opioid olarak oksikodon, morfin, metadon, fentanil gibi güçlü etkili ve kodein, tramadol gibi zayıf etkili opioidler vardır (Herman vd., 2024).

Opioid reseptörler içerisinde en çok analjezi ile ilişkilendirilen MOR reseptörleri genellikle opioid analjezik ilaçların birincil hedefidir ve bunlar klinikte şiddetli migren baş ağrısı gibi durumlarda kullanılabilir (Williamson vd., 2001). Morfin gibi μ opioid reseptör agonistleri TNC içerisindeki duyu nöronlarının aktivitesini ve c-Fos ekspresyonunu baskılayabildiği gibi migren patogenezi içinde nörojenik inflamasyonun bir parçası olan meningeal vazodilatasyonu baskılayabilir (Nozaki, Moskowitz, vd., 1992; X.-M. Wang vd., 1996).

Migren baş ağrısının düzenlenmesinde μ opioid reseptörlerinin rol oynadığına dair bulgular nöro görüntüleme çalışmaları ile gösterilmiştir. DaSilva ve arkadaşları migren baş ağrısı sırasında prefrontal kortekste artmış μ opioid reseptör aktivasyonunu bildirdiler (DaSilva, Nascimento, DosSantos, vd., 2014). Başka benzer bir çalışmada migren hastalarının trigeminal sinirinin ısı ile uyarılması sonucu oluşan allodini ile orta beyindeki μ opioid reseptör aktivasyonunda artış olduğu gösterildi (Nascimento vd., 2014).

Akut ağrı durumunda MOR aktivitesi artarken kronik ağrı azalabilmektedir ve bu durum MOR reseptörlerinin ağrı düzenlemesinde önemli olduğunu ancak kronik ağrı durumundaki duyarsızlıkla da ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Higginbotham vd., 2022). Nöropatik ağrının hayvan modellerinde kronik ağrı ile ilişkili olarak putamen, insula gibi beyin bölgeleri ile omurilik, dorsal kök ganglionları (DRG) gibi yapılarda MOR ekspresyonunda

azalma olduğu gösterilmiştir (Pol vd., 2006; Thompson vd., 2018). Migren ve trigeminal nöropatik ağrı gibi durumlarda merkezi sinir sisteminin farklı kısımlarında MOR reseptörlerinin bulunabilirliğinde azalma olduğu fark edilmiştir ve bu durum muhtemelen ağrı düzenlemesi ile ilişkilidir (DaSilva, Nascimento, Love, vd., 2014; DosSantos vd., 2012).

1.8.2   Opioid Reseptörü

  opioid reseptörü opioid peptitlerden enkefalinlerin seçici olarak bağlandığı ancak  -endorfin ve dinorfinlerin de bağlanabildiği reseptördür (Gach-Janczak vd., 2024). Merkezi sinir sisteminin amigdala, bulbus olfactorius, korteks, striatum gibi ön beyin bölgeleri ile talamus, hipotalamus, PAG gibi ağrı iletimi ile ilişkili yapılar da eksprese edilmektedir (Berthiaume vd., 2020). Omurilik, DRG ve trigeminal ganglionlarda da eksprese edilmektedir (Charles ve Pradhan, 2016). Periferik olarak duysal nöronlarda daha sınırlı ifade edilen   opioid reseptörleri ilginçtir ki kronik ağrı ve inflamatuvar durumlarda daha fazla eksprese edilmektedir veya işlevselleşmektedir (Brackley vd., 2017; Gendron vd., 2016). Bu durum migren gibi kronik ağrıdan muzdarip olunan durumlarda bağımlılık ve duyarlılık açısından   opioid reseptörlerini önemli hale getirmektedir.

Deneyssel hayvan çalışmalarında   opioid reseptör agonistlerinin nitrogliserinin neden olduğu migrenle ilişkili KYD ve hiperaljeziyi baskılayabildiği gösterildi (Dripps vd., 2018; Pradhan vd., 2014). Bunlara ek olarak trigeminal ganglionlar ve TNC’de migren mediyatörü CGRP’nin salınımını baskılayabilmiştir (Moye vd., 2021). Zaten daha önce CGRP ifade eden nosiseptif liflerde   opioid reseptörlerin bulunduğu bildirilmiştir (Scherrer vd., 2009). Ayrıca DOR agonistleri inflamatuvar mediyat rlerle aktive edilmiş trigeminal ganglion nosiseptif liflerinden CGRP salınımını baskılayabilmiştir (Patwardhan vd., 2005). Yine sıçanlarda masseter kasına kapsaisin enjekte edilerek oluşturulan hiperaljezi DOR agonisti olan enkefalin ile baskılanmıştır (Saloman vd., 2011). DOR agonistleri migrenle birlikte travma sonrası baş ağrısı modellerinde de aşırı duyarlılığı ve ağrıyı hafifletebilir (Moye, Novack, vd., 2019; Moye, Tipton, vd., 2019).

Ağrı işlemesiyle ilgili süreçler omurilik ve DRG nöronlarında DOR ifadesini artırmaktadır (Quirion vd., 2020). Stres ventrolateral PAG içerisindeki nöronların membranında DOR ekspresyonunu artırmıştır (Commons, 2003). Kronik, inflamatuvar, nöropatik ağrı durumlarındaki potansiyel rolü ve yan etki,

tolerans gibi olumsuzluklar açısından daha ılımlı olması nedeniyle δ opioid reseptörleri migren baş ağrısının tedavisi için fayda sağlayabilir (Berthiaume vd., 2020).

1.8.3 κ Opioid Reseptörü

Endojen opioidlerden dinorfinlerin ve daha az oranda da diğer peptitlerin afinite gösterdiği KOR reseptörleri beyindeki ventral tegmental alan, prefrontal korteks, talamus, hipotalamus, hipokampus, substantia nigra, striatum, amigdala, locus coeruleus, dorsal raphe çekirdeği gibi ödül, ruh hali ve bilişsel düzenleme ile ilgili alanlarda ifade edilir (Emery ve Akil, 2020; Xie vd., 2017). Omurilik ve çevresel yapılarda da ifade edilen reseptörlerin MSS üzerinden oluşturduğu disfori ve iğrenme gibi etkileri vardır (Albert-Vartanian vd., 2016). Merkezi ve periferik reseptörler üzerinden analjezik etki de gösterebilen KOR reseptörleri bunu ağrının duyuşsal iletimini baskılayarak ve inflamatuvar kaskadı inhibe ederek sağlayabilir (Al-Hasani ve Bruchas, 2011; Albert-Vartanian vd., 2016; Auh ve Ro, 2012).

KOR reseptör aktivasyonu akut, inflamatuvar, nöropatik ağrı ve kanser ağrısı gibi durumların deneysel modellerinde analjezik etkiye neden olmuştur (Santino ve Gentilucci, 2023). Farelerde oluşturulmuş bir nöropatik ağrı modelinde ağrıya cevap olarak omurilikteki KOR aktivitesinde artış olduğu ve KOR reseptör antagonistinin de hiperalejiye neden olduğu bildirildi (M. Xu vd., 2004). Öte yandan kısıtlama stresi ile oluşturulmuş migren modelinde KOR antagonistiyle ön tedavi gizli duyarlılığı azaltmıştır (Kopruszinski vd., 2021). Bu durum stresin KOR reseptör sinyalleşmesini artırmakla birlikte ağrıyı teşvik edebildiğini gösterir (Nation vd., 2018). Nitekim stres dinorfin salınımının artmasına ve KOR aktivasyonuna neden olmaktadır (Bruchas vd., 2010). Trigeminal nöropatik ağrı modellerinde de KOR reseptör blokajı mekanik hiperalejiyi baskılamıştır (Turnes vd., 2022).

KOR reseptörlerinin motivasyon eksikliği, kaçınma gibi ağrı kaynaklı olumsuz etkilere de aracılık edebileceği düşünülmektedir (Parker vd., 2020). Her ne kadar analjezi için μ opioid reseptörleri daha ön planda olsa da solunum depresyonu ve kabızlık gibi yan etkilere neden olmayan κ opioid reseptörleri de bu konuda ilgi görmektedir (Kivell ve Prinszano, 2010). KOR reseptörleri de sedasyon ve disfori gibi yan etkilere neden olmaktadır fakat bunlara yol açmadan analjezi sağlamak için periferik olarak sınırlanmış agonistler geliştirmek ve β -

arrestinin dahil olmadığı G-protein sinyal yolağının çalışmasına neden olan spesifik agonistler geliştirmek gibi stratejilere odaklanılmıştır (Santino ve Gentilucci, 2023).

KOR reseptörlerinin nosiseptif etkileri ve migrenin bir tetikleyicisi olan stres durumundaki rolüne odaklanarak migren tedavisinde fayda sağlayabileceği düşünülebilir (Albert-Vartanian vd., 2016; Kopruszinski vd., 2021).

1.8.4 Nosiseptin Reseptörü

Opioid reseptör benzeri-1 (ORL1) veya orfanin FQ reseptörü gibi kullanımlarla da ifade edilen nosiseptin reseptörleri opioid sistem reseptörlerinden en son keşfedilenidir ve henüz diğerlerine göre çok daha az şey bilinmektedir (Al-Hasani ve Bruchas, 2011). Opioid sistemin diğer reseptörleriyle yüksek homolojiye sahip olan NOP reseptörleri klasik opioid peptitler için düşük afinite göstermesi ve opioid reseptör antagonisti olan nalokson tarafından inhibe edilmemesi gibi nedenlerden dolayı opioid sistemin klasik olmayan bir reseptörü olarak ifade edilmektedir (Cox vd., 2015).

Yapılan deneysel çalışmalar NOP reseptörlerinin beyinde ağrı ve analjezi ile ilişkili birçok alanda yer aldığını göstermektedir. Bunlar alanlar arasında PAG, rostral ventromedial medulla, beyin sapı inen inhibitör yol gibi alanlar bulunur. Ayrıca omurilik dorsal boynuzu ve DRG'de yüksek miktarda bulunur (Toll vd., 2019). Bununla birlikte NOP reseptörleri de diğer opioid reseptörleri gibi nöronal aktivitede azalma ve hiperpolarizasyona neden olmaktadır ve böylece antinosiseptif etki gösterebilir (Heinricher vd., 1997; Vaughan vd., 1997).

NOP sisteminin ağrı ve analjezideki rolü karmaşıktır. Nitekim daha önce yapılan çalışmalarda NOP reseptör ligandı olan orfanin FQ diğer opioid reseptörlerinin ve peptitlerinin antinosiseptif etkilerini bloke etmiştir (Mogil, Grisel, Reinscheid, vd., 1996; Mogil, Grisel, Zhangs, vd., 1996). Öte yandan nosiseptinin intratekal uygulamasının spinal düzeyde antinosiseptif etkiye neden olduğu görülmüştür (X. J. Xu vd., 1996; T. Yamamoto vd., 1997). NOP reseptör antagonistlerinin sistemik, oral, intratekal veya intraserebroventriküler olarak verilmesiyle analjezik etki gösterdiğini bildiren çalışmalar olduğu gibi pronosiseptif etki oluşturduğunu bildirenler de olmuştur (Corradini vd., 2001; Zaratin vd., 2004; Suyama vd., 2003; Tamai vd., 2005). Nöropatik ağrı

modellerinde NOP ekspresyonu bazı beyin çekirdeklerinde, omurilik ve DRG’de artmıştır (Brisini vd., 2002; Ma vd., 2005).

İnsan trigeminal ganglion nöronlarının yaklaşık %70’i CGRP, SP gibi nöropeptitlerle birlikte nosiseptin aktivitesi göstermektedir. Bununla birlikte trigeminal ganglion nöronları NOP reseptörlerini de ifade etmektedir (Hou vd., 2003). Migrenli bireylerin plazma nosiseptin seviyeleri ataklar arasında sağlıklı bireylere göre daha düşük olarak bulunmuştur ve atak sırasında daha da azalmıştır (Ertsey vd., 2005).

Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan nörojenik dural vazodilatasyonu NOP reseptör ligandı olan nosiseptin inhibe edebilmiştir (Bartsch vd., 2002). Farelerde nitrogliserin ile oluşturulan migren modelinde NOP agonisti fotofobi ve allodiniyi azaltmıştır (Targowska-Duda vd., 2020). Yapılan çalışmalarda NOP reseptörlerinin ağrı ve analjezinin düzenlenmesindeki etkinliği migren baş ağrısının patogenezi ve tedavisinde de rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

1.9 Endojen Opioid Peptitler

Endojen opioid peptitler endorfinler, enkefalinler, dinorfinler ve nosiseptin/orfanin FQ olmak üzere dört peptit ailesinden oluşur (Kibaly vd., 2019). Dört peptit ailesi de ortak bir tetrapeptit dizisi olan Try-Gly-Gly-Phe enkefalin dizisini içerir ki bu durum opioid peptitlerin birden fazla opioid reseptörü ile etkileşime girebilmesini sağlar (Abrimian vd., 2021; Meunier, 1997). Merkezi ve periferik sinir sisteminde yaygın olarak bulunan opioid peptitler kendilerine ait G-protein eşlenik reseptörleri (MOR, DOR, KOR, NOP) üzerinden aktivite göstererek duygu, hafıza, analjezi ve nöroprotektif düzenleme gibi işlevlere aracılık etmektedir (Kibaly vd., 2019; Shenoy ve Lui, 2023).

1.9.1 Endorfinler

Proopiomelanokortin öncülünden oluşturulan β -endorfinler MOR reseptörlerine ve DOR reseptörlerine afinite gösterir (Rullo vd., 2024). Merkezi sinir sisteminde β -endorfin sentezleyen nöronlar hipotalamusun arkuat çekirdeği ve dorsal medulladaki nükleus traktus solitariusda lokalizedir ve MSS’nin ön beyin, orta beyin, beyin sapı ve omurilik gibi alanlarına projeksiyon yapar (Benarroch, 2012). Ayrıca hipofizin ön lobunda da sentez ve depolama gerçekleşir ve bu periferik β -endorfinin kaynağıdır (Sprouse-Blum vd., 2010). Bunlara ek olarak

mide, adrenal medulla, pankreas, testis, plasenta gibi dokulardan da sentezlenir (Rullo vd., 2024).

Endorfinler içerisinde en aktif form olan β -endorfinler morfinden daha güçlü analjezik etkisi olan endojen opioid peptitlerdir (Pilozzi vd., 2020). Periferik ve merkezi sinir sisteminde presinaptik ve postsinaptik reseptörleri üzerinden etki ederler ve çoğunlukla presinaptik MOR reseptörlerine bağlanıp ağrının iletimine aracılık eden nöropeptitlerin salınımında azalmaya neden olarak analjeziyi sağlarlar (Sprouse-Blum vd., 2010).

Oral, abdominal, jinekolojik cerrahi gibi uygulamalarda postoperatif akut ağrı ile birlikte plazma ve BOS β -endorfin seviyelerinde artış olmuştur (Krug vd., 1990; Mosnaim vd., 2008; F. Wang vd., 2022). β -endorfin salınımını baskılayan deksametazon uygulaması postoperatif ağrıda artışa neden olmuştur (Hargreaves vd., 1987). Brakial pleksus yaralanmasının deneysel modelinde elektroakupunktur ile tedaviyle yaralanmadan sonra oluşan nöropatik ağrı azalmış ve bununla birlikte arkuat çekirdekteki β -endorfin ifadesi artmıştır (S. Zhang vd., 2014). Ayrıca çeşitli akupunktur uygulamalarının kronik ağrı çeken kişilerde ağrıyı azaltmasının dolaşımdaki β -endorfin artışıyla birlikte gerçekleştiği ifade edilmiştir (Choi ve Lee, 2019; Mohammed vd., 2018; Zai vd., 2018). Stres yanıtının düzenlenmesine aracılık eden β -endorfinin bu artışının strese yanıt olarak gerçekleştiğini ifade edenler de olmuştur (Choi ve Lee, 2019). Öte yandan egzersizle birlikte β -endorfinin dolaşımda arttığı ve bunun analjeziye aracılık edebileceği ifade edilmiştir (Goldfarb ve Jamurtas, 1997; Paungmali vd., 2018).

1.9.2 Enkefalinler

Proenkefalin öncülünün parçalanmasıyla met-enkefalin ve leu-enkefalin adında iki enkefalin formu oluşur (Berezniuk ve Fricker, 2011). DOR'lara yüksek afiniteyle bağlanan enkefalinler MOR reseptörlerine daha az afiniteyle KOR reseptörlerine de çok az afiniteyle bağlanabilirler (Cullen ve Cascella, 2024; Mansour vd., 1995). Enkefalinler metalopeptidazlar diye de ifade edilen aminopeptidaz N ve nötral endopeptidaz (neprilisin) adında iki enzimle hızlı bir şekilde parçalanır (Noble vd., 2001; Waksman vd., 1986).

Enkefalinler insanlarda merkezi sinir sisteminin omurilik (çoğunlukla lamina II), hipotalamus, substantia nigra, kaudat nukleus, globus pallidus, nukleus akkumbens, locus coeruleus gibi alanlarındaki nöronlarda bulunmaktadır. Bu

yüzden ağrı ve stres yanıtının düzenlenmesi, tatmin, haz gibi duygusal değişikliklerin oluşması ve nöroprotektif etki süreçlerinde rol oynarlar (García-Domínguez, 2024). Enkefalinler periferik sinir sisteminde enterik sinir sistemi ve otonom sinir sistemi boyunca pankreas, bağırsak, adrenal medulla, kardiyovasküler sistem gibi yapılarda da ifade edilmektedir (Duque-Díaz vd., 2019). Periferik sinir sistemindeki dağılımla inflamasyon ve ağrının kontrolü, gastrointestinal düzenleme gibi farklı durumlarda işlev görürler (García-Domínguez, 2024).

Orta beyindeki MOR reseptörlerinin aktivasyonu inhibitör uyarıların oluşmasına ve enkefalinergic nöronları içeren inen inhibitör yolların uyarılmasına neden olarak nosiseptif iletimi baskılar (Pathan ve Williams, 2012). Enkefalinlerin analjezik etkisi üzerine yapılan eski bir çalışmada sıçanların lateral ventrikülüne enkefalin uygulanması güçlü bir analjezik etkiye neden olmuştur (Belluzzi vd., 1976). Genetik olarak preproenkefalin eksikliği olan farelerde nosiseptif duyarlılıkta artış olduğu gösterilmiştir (König vd., 1996; Noble vd., 2008). Sağlıklı ve migrenli insanların plazma enkefalin seviyesini araştıran çalışmalarda met-enkefalin seviyesinin migrenli bireylerde daha fazla olduğu ve atak sırasında daha da arttığı görülmüştür (de Lourdes Figuerola vd., 1997; Mosnaim vd., 1985, 1986).

Enkefalinlerin etki gösterdiği MOR ve DOR reseptörlerinin ağrı ve analjezi düzenlemesindeki rollerinden daha önce bahsetmiştik. Enkefalinlerin yarı ömrü kısa olduğu ve enkefalinazlarla hızlıca parçalandıkları için etkileri kısa sürmektedir. Bu durumu telafi etmek ve analjezik etkinliği artırmak için daha zor parçalanan sentetik enkefalin modifikasyonları geliştirilmiştir (Kropotova vd., 2020; Pert vd., 1976). Öte yandan enkefalinlerin yıkımına sebep olan enzimleri inhibe ederek enkefalinlerin analjezik aktivitelerini sürdürmeye yönelik diğer bir yaklaşım yakın zamanda ön plana çıkmıştır (Roques vd., 2012; Southerland vd., 2021). Bu amaçla geliştirilen çift enkefalinaz inhibitörleri (DENKI) güçlü analjezik etki sağlamış ve sentetik opioidlerin neden olduğu yan etkileri de oluşturmamıştır (Southerland vd., 2021). Bu avantajlı durumun nedeni enkefalinlerin yalnızca salındığı bölgedeki lokal etkiyi güçlendirmeleri olabilir. Migrenin deneysel modellerinde çift enkefalinaz inhibitörü migrenle ilişkili aşırı duyarlılığı ve trigeminoservikal komplekste c-Fos ekspresyonunu azaltmıştır (Descheemaeker vd., 2022; Mei vd., 2023).

1.9.3 Dinorfinler

Prodinorfin öncülünden oluşan dinorfin-A ve dinorfin-B beyin ve omurilik boyunca yayılmış KOR reseptörlerinin ligandı olan endojen peptitlerdir (Chavkin, 2013). Dinorfinler MOR ve DOR reseptörlerine de afinite gösterirler ancak KOR reseptörüne olduğu kadar güçlü değildir (Fricker vd., 2020). Endojen opioid peptit dinorfin ve bağlandığı KOR ile etkileşimi nosisepsiyon, stres düzenlemesi ve bağımlılık süreçleri ile ilişkilidir (Bruchas vd., 2010; Darcq ve Kieffer, 2018). Nitekim dinorfinlerin primer reseptörü olan KOR'ların ağrı ve analjezi ile ilişkisinden bahsetmiştik.

Yapılan çalışmalarda ağrı ile birlikte kemirgen omuriliğinde ve merkezi yapılarında dinorfin ifadesinde artış olduğu bildirilmiştir (S. (Steve) Liu vd., 2019; M. Xu vd., 2004). Ayrıca kronik ağrısı olan hastaların BOS dinorfin seviyelerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Samuelsson vd., 1993; Vaerøy vd., 1991). Nöropatik ağrıyla birlikte omurilikte artan dinorfin miktarı bir süre artmış olarak kalabilir (Kajander vd., 1990; Malan vd., 2000; M. Xu vd., 2004). İnflamatuar nöropatik ağrı modellerinde omuriliğe ek olarak primer nosiseptif afferentlerde ve DRG nöronlarında da dinorfin ifadesinde artış vardır (Calzà vd., 1997; Mika vd., 2010). Dinorfinlerin KOR reseptörleri üzerinden antinosiseptif etkisinin yanı sıra pronosisseptif ve hiperaljezik etkisi de olabilir ki bunu da genellikle astrosit aktivasyonuna neden olarak ve bradikinin, NMDA reseptörleri gibi başka sistemleri etkileyerek gerçekleştirir (Cahill vd., 2021).

Merkezi olarak incelendiğinde dinorfin ve reseptörü KOR'ların ifadesi kronik ağrı durumunda nükleus accumbens, ventral tegmental alan, locus coeruleus, prefrontal korteks gibi alanlarda artmaktadır (S. (Steve) Liu vd., 2019; Llorca-Torralba vd., 2020; Palmisano vd., 2019). Ağrı durumundaki supraspinal dinorfin KOR aktivitesi daha çok ağrının duygusal değişiklikleri ve motivasyon eksikliği gibi süreçlerle ilişkilidir (Higginbotham vd., 2022).

Kronik ağrı durumunda spinal dinorfin seviyesindeki artış dinorfinlerin ağrının kronikleşmesiyle ilişkili olduğunu düşünmeye neden olmuştur. Öte yandan farklı dozlarda dinorfinin farklı etkiler oluşturacağı ve periferik olarak düşük dozda uygulanan dinorfinin antinosiseptif etki gösterdiği bildirilmiştir (Mika vd., 2011). Temporomandibular bozukluk ve migrenin bir modelinde TNC'de prodinorfin mRNA ekspresyonunda artış olmuştur ve antidinorfinle tedavi migren benzeri davranışı azaltmıştır. İlginç bir şekilde bu durum sadece dişilerde görülmüştür ve

trigeminal dinorfinin migren benzeri ağrı ile cinsiyete özgü bir ilişkisi olduğunu göstermektedir (S. Liu vd., 2023).

1.9.4 Nosisseptin/Orfanin FQ

Prepronosisseptinden türetilen ve orfanin FQ olarak da adlandırılan nosisseptin opioid peptidi önceleri ORL1 olarak ifade edilen NOP reseptörünün endojen ligandıdır (Meunier vd., 1995). Nosisseptin NOP reseptör sistemi ağrı düzenlemesi, beslenme, bağımlılık, stres ve kaygı gibi biyolojik süreçlerde rol oynar (Schröder vd., 2014; Witkin vd., 2014). Nosisseptin ve reseptörü nosisepsiyonla alakalı omurilik dorsal boynuzu, talamus, serebral korteks gibi merkezi sinir sistemi bölümlerinde ve dorsal kök ganglionlarında mevcuttur (Chen ve Sommer, 2006). Bununla birlikte fibromiyalji, inflamatuvar ağrı, nöropatik ağrı gibi durumların deneysel modellerinde bu bölgelerdeki ekspresyonları artar (Higginbotham vd., 2022).

Nosisseptinin ağrı modülasyonundaki rolü karmaşık gibi görülmektedir ancak genel görüş supraspinal ağrı yollarında hiperalezik etki gösterdiği spinal ağrı yollarında ise alezik etki gösterdiği şeklindedir (Witkin vd., 2014). Ayrıca deneysel modellerde dozaj, uygulama yolu ve ağırlı uyaranın türüne göre pronosisseptif ve antinosisseptif etki gösterebildiği ifade edilmektedir. Örnek olarak nosisseptinin farelerde intraserebroventriküler enjeksiyonu pronosisseptif etki gösterirken spinal ve sistemik uygulanması antinosisseptif etki göstermiştir (Ozawa vd., 2018).

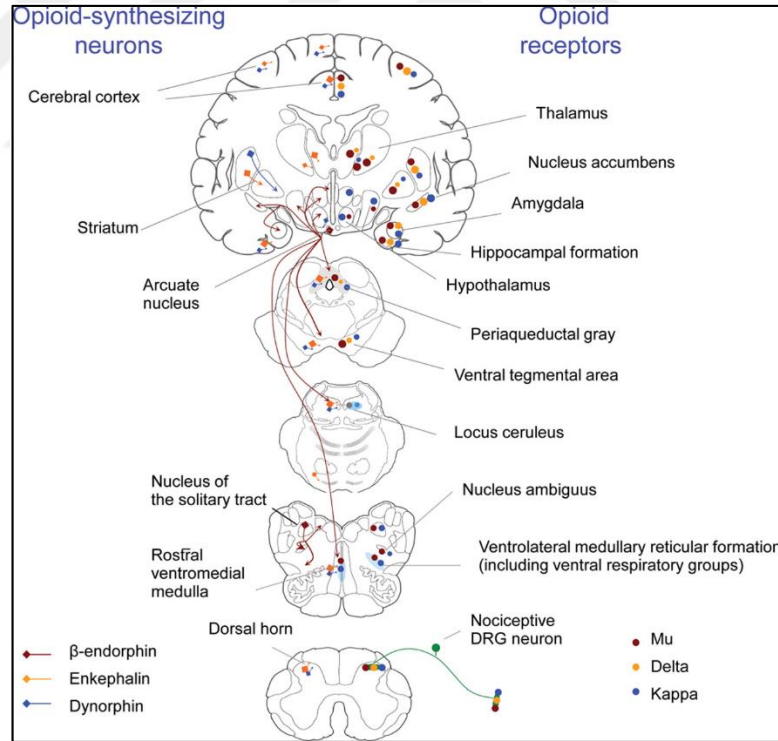
Nosisseptin ve onun gibi NOP agonist etkisi olan bileşikler farklı uygulama yollarıyla inflamatuvar ve nöropatik ağrı modellerinde aleziyi sağlamıştır (Courteix vd., 2004; Ma vd., 2003; Schiene vd., 2015; Sukhtankar vd., 2013). Nosisseptin sıçanlarda kanser kaynaklı kemik ağrısını azaltmıştır (Sliepen vd., 2021). Ayrıca nosisseptin NOP sistemi opioidlerin bağımlılık yan etkisini tersine çevirebilmektedir ve böylece daha düşük yan etkiyle alezi sağlama potansiyeline sahiptir (Lin ve Ko, 2013; Marquez vd., 2008; Rutten vd., 2010).

Migren patogenezindekine benzer olarak sıçanlarda oluşturulan nörojenik dural vazodilatasyon nosisseptin tarafından inhibe edilmiştir (Bartsch vd., 2002). Başka bir çalışmada nosisseptin sıçan trigeminal gangliyon nöronlarının uyarılmasıyla gerçekleşen CGRP salınımını inhibe etmiştir (Capuano vd., 2007). Sonuç olarak nosisseptin NOP sistemiyle birlikte endojen opioid sistemin diğer

üyeleri nöropeptit salınımını ve nosiseptif iletiyi baskılayarak migren baş ağrısını inhibe edebilen önemli bir terapötik yaklaşım olabilir.

1.10 Endojen Opioid Sistemi ve Ağrı Düzenlemesi

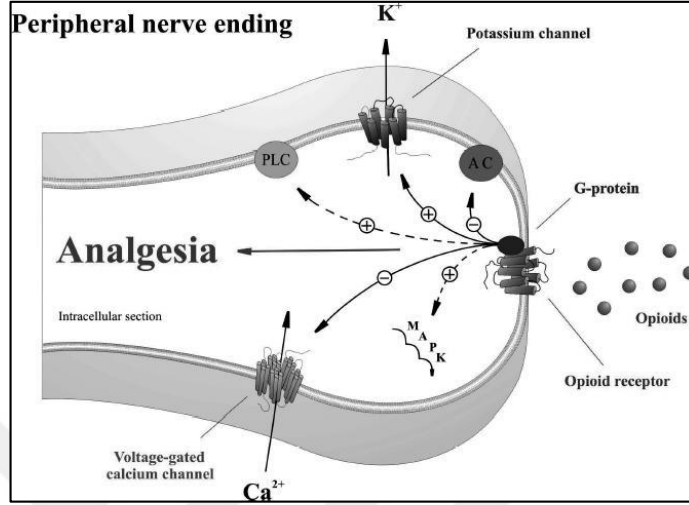
Endojen opioid sistemin bileşenleri merkezi ve periferik sinir sisteminin birçok bölümünde ifade edilir (Şekil 1.6.) (Corder vd., 2018). Endojen opioidler ağrı ile ilgili hem inen yolları hem de çıkan yolları düzenleyebilir (Shenoy ve Lui, 2023). Bu noktada opioid reseptörleri ağrının düzenlenmesi ile ilgili bir yer olarak DRG duyuşal nöronları ile omurilik dorsal boynuzundaki ikinci derece nöronlar arasında yer alır. Daha sonra yükselen yollar ile kortikal bölgelere iletilecek olan nosiseptif sinyaller buradaki opioidderjik mekanizmalar ile baskılanır (Higginbotham vd., 2022). Opioid reseptörlerinin hepsi DRG duyuşal nöronları tarafından ifade edilir ve aktive olduklarında nöropeptit salınımını baskılayarak ve hiperpolarizasyona neden olarak somatosensöriyel afferentlerden kortikal nöronlara nosiseptif iletiyi baskılar (Corder vd., 2018).



Şekil 1.6. Endojen opioid sistem peptit ve reseptörlerinin sinir sistemindeki dağılımı (Benarroch, 2012).

Yapılan çalışmalar periferik opioid reseptörlerinin sistemik olarak uygulanan opioidlerin analjezik etkisine aracılık ettiğini göstermektedir. Primer

nosiseptif afferentlerde ifade edilen opioid reseptörleri bazal durumda çoğunlukla inaktiftir ve inflamasyon durumunda sayıları ve aktiviteleri artmaktadır (Benarroch, 2012). Periferik sinir sonlanmalarındaki opioid reseptörleri aracılığıyla nosiseptif iletimin baskılanması aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Endojen opioid sistem tarafından ağrı iletiminin inhibisyonu (Kapitzke vd., 2005).

Endojen opioid sistemi merkezi sinir sisteminin birçok bölümünde aktivite gösterir. Bu bölgeler arasında PAG, rostral ventral medulla, lokus seruleus gibi alanlar yer alır ve bu bölgelerdeki opioid reseptör sistemleri inen inhibitör yolu düzenleyerek nosiseptif iletimi azaltabilir (Pathan ve Williams, 2012). Ayrıca MSS’nde anterior singulat korteks, hipotalamus, amigdala gibi alanlarda da bulunan opioid reseptörleri ağrının modülasyonunda davranışsal, bilişsel ve duygusal değişiklikler gibi farklı yönleri düzenler (Benarroch, 2012).

Endojen opioidler ve reseptörlerinin elektroakupunktur analjezisi, stres kaynaklı analjezi, plasebo ve PAG stimülasyonu ile ilişkili analjezik durumlarda rol oynadığı naloksonun bu analjezik etkileri bloke etmesiyle anlaşılmaktadır (Butler ve Finn, 2009; Hosobuchi vd., 1977; Wager vd., 2007; Sekido vd., 2003). Bunlara ek olarak endojen opioid sistemin ligandları ve reseptörlerini anlatırken inflamatuvar ve nöropatik ağrı modelleri gibi deneysel çalışmalarda ağrı düzenlemesi ile ilişkilerini ortaya koyan birçok veriyi ifade ettik.

1.11 Nalmefen

Opioid reseptörlerine yüksek afinite göstererek opioidlerin bağlanmasını engelleyen nalokson, naltrekson ve nalmefen gibi antagonistler bulunmaktadır. Opioid reseptör antagonistlerinin opioid aracılı analjeziyi bloke etmesi endojen opioid sistemin analjezideki rolünü desteklemektedir ancak çok düşük dozda verildiklerinde analjeziyi artırabildiklerine dair veriler de daha kompleks bir etkiye sahip olduklarını göstermektedir (Barnett vd., 2014).

Naltreksonun bir türevi olarak keşfedilen nalmefen hidroklorür güçlü bir opioid reseptör antagonistidir ve κ opioid reseptörlerine olan kısmi agonist etkisinden dolayı nalokson ve naltreksondan farklıdır (Green vd., 2024). Naloksonla kıyaslandığında nalmefenin üstün yönleri opioid reseptörlerine karşı beş kat daha fazla afinite göstermesi ve çok daha uzun bir yarı ömre sahip olmasıdır (Stolbach vd., 2023). Benzer şekilde naltreksona göre de daha uzun yarı ömre ve daha etkili bağlanma potansiyeline sahiptir (Franck ve Jayaram-Lindström, 2013). Bunlara ek olarak nalmefenin ters agonist etkisi göstererek bazal durumda da opioid sinyallemesini bloke edebildiği fakat nalokson ve naltreksonun nötral antagonist olarak bazal durumun üzerinde antagonizma sağlayabildiği bildirilmiştir (D. Wang vd., 2001). Opioid reseptör antagonisti nalmefen günümüzde alkol bağımlılığının tedavisinde kullanılırken aşırı opioid kullanımı ve postoperatif hiperanaljezinin tedavisinde etkinliğine dair çalışmalar da yapılmıştır (Franck ve Jayaram-Lindström, 2013; Green vd., 2024).

1.12 Endojen Opioid Peptitlerin Yıkımı

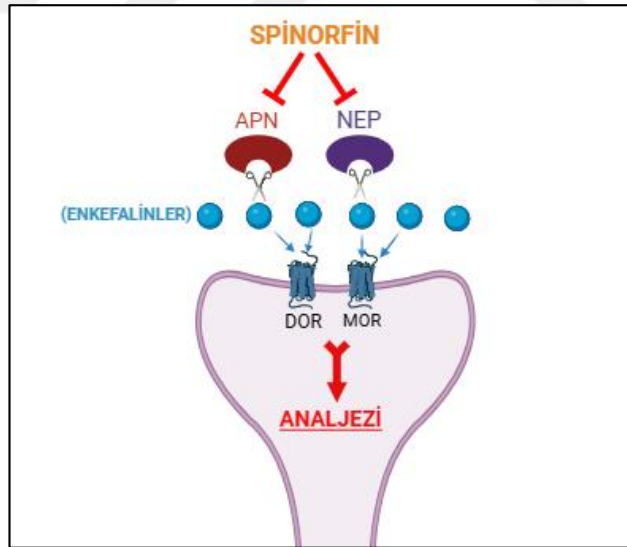
Endojen opioid peptitleri salındıktan sonra hızlıca enzimlerle parçalanır. Bu yıkımı sağlayan başlıca enzimler enkefalinazlar da denilen aminopeptidaz N (APN) ve nötral endopeptidaz (NEP) opioidlerin kaynağı olan lökositlerde, merkezi ve periferik sinir sisteminde sentezlenmektedir (Stein, 2016). Bu membrana bağlı peptidazlara ek olarak dipeptidil peptidaz III (DPP III) ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) de endojen opioidlerin yıkımına neden olur (Luo vd., 2022).

Enkefalinazlar (APN, NEP) endojen opioidlerin parçalanmasına ek olarak SP, kolesistokinin, nörotensin ve bradikinin gibi peptitleri de parçalayabilmektedir. APN ve NEP'i inhibe etmek yarı ömürleri kısa olan ve enkefalinazlarla hızla parçalanan enkefalinlerin konsantrasyonlarını artırabilir ve böylece uzun süreli analjezi sağlayabilir (Roques vd., 2012).

1.13 Spinorfin

Spinorfin hemorfin ailesinden Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr amino asit dizisine sahip bir hemoglobin türevi klasik olmayan endojen opioid peptittir (Todorov vd., 2022). İlk olarak sığır omuriliğinden izole edilen bu heptapeptit endojen opioid peptitlerini özellikle de enkefalinleri parçalayan enzimleri inhibe etme özelliğine sahiptir (Nishimura ve Hazato, 1993b). Omurilikten türetildiği için bu adı alan spinorfinin inhibe ettiği enzimler NEP, APN, DPP III ve ACE gibi enkefalin parçalayıcı enzimlerdir (Nishimura ve Hazato, 1993a; Y. Yamamoto vd., 2002).

Spinorfinin enkefalinazları inhibe ederek enkefalinlerin konsantrasyonunu artırması onun antiallodinik ve antinosiseptif etki göstermesini sağlamaktadır (Honda vd., 2001). Bununla birlikte spinorfinin intraplantar enjeksiyonunun bradikinin kaynaklı nosiseptif tepkileri azaltabildiği bildirilmiş hatta spinorfinin morfine dirençli nosisepsiyonu inhibe edebildiği ifade edilmiştir (Ueda vd., 2000). Enkefalinazları inhibe ederek enkefalinlerin miktarında ve aktivasyonunda artışa neden olan spinorfin endojen opioid sistem aktivasyonu ile nosiseptif iletimin baskılanması için önemli bir strateji olarak görülebilir (Şekil 1.8.).



Şekil 1.8. Spinorfinin antinosiseptif etki mekanizması (Şekil BioRender.com ile oluşturulmuştur.)

Spinorfin ayrıca antiinflamatuvar etki de göstermektedir (Y. Yamamoto vd., 2002). Spinorfinin antiinflamatuvar düzenlemesi ile ilgili bir çalışmada kemotaksik bir ajanın neden olduğu nötrofil aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Liang

vd., 2001). Bu durumu destekleyen bir çalışma fare hava kesesi deneyinde karragenan kaynaklı polimorfonükleer nötrofil birikimini baskılamıştır (Y. Yamamoto vd., 1998).

Sığır omuriliğinden izole edilen spinorfin insan beyin omurilik sıvısında da tespit edilmiştir. İlginç bir şekilde ağrısı olan bireylerin BOS spinorfin seviyeleri kontrollere göre daha yüksekti ve DPPIII de bunun tam tersi şekilde ağrısı olan kişilerde daha düşüktü (Y. Yamamoto vd., 2005).

Sığır spinorfini gibi doğal enkefalinaz inhibitörleri olan sıçan siyalorfini ve insan opiorfini de enkefalinlerin seviyelerini artırarak antiinflamatuvar ve analjezik etki gösterebilmektedir (Sobocí Nska vd., 2020). Opiorfin insan tükürüğünde bulunan bir endojen enkefalinaz inhibitörüdür ve çeşitli çalışmalarda opioid yan etkisine neden olmadan enojen opioid aracılı analjeziyi güçlendirdiği bildirilmiştir (Busserolles vd., 2020). Potansiyel antinosiseptif ajanlar olarak umut veren bu endojen enkefalinaz inhibitörleri için önemli bir kısıtlılık dolaşımdaki peptidazlar tarafından hızla parçalanmaları ve kısa yarı ömürlü olmalarıdır (Sobocí Nska vd., 2020). Bu yüzden benzer etkiyi ortaya çıkarabilen enkefalinaz inhibitörlerinin sentetik bileşikler de geliştirilmiştir (Thanawala vd., 2008).

Enkefalinlerin parçalanmasını sağlayan birden fazla enzim (APN, NEP, DPP III) olduğu için bunlardan birisinin inhibe edilmesi sınırlı antinosiseptif etki ortaya çıkaracaktır. Bundan dolayı enkefalinazların ikili inhibitörleri geliştirilmiştir (Thanawala vd., 2008). Hem APN hem de NEP'i inhibe eden çift enkefalinaz inhibitörleri (DENKI) enkefalinlerin seviyesini artırarak ağrıyı hafifletmede oldukça başarılı olmuş ve migren gibi kronik ağrı durumları için potansiyel bir tedavi yaklaşımı olabileceği düşünülmektedir (Descheemaeker vd., 2022; Mei vd., 2023; Roques vd., 2012).

Spinorfinin enkefalinazları inhibe etmesinin dışında bir diğer özelliği de güçlü bir P2X3 reseptör antagonisti olmasıdır (K. Y. Jung vd., 2007). P2X3 reseptörleri ATP ile aktive olan ligand kapılı iyon kanallarıdır ve ağrı iletiminde rol alan nosiseptif primer afferent nöronlar ile DRG nöronlarında ifade edilmektedir (K. Y. Jung vd., 2007; Lewis vd., 1995). P2X3 reseptörlerinin ATP ile aktiflenmesi kronik inflamatuvar ağrı ve nöropatik ağrı gibi durumlarda nosisepsiyona aracılık ettiği gibi bu reseptörlerin çeşitli antagonistlerle bloke edilmesi de analjeziye neden olmuştur (Andreev vd., 2012; K. Y. Jung vd., 2007; Y. H. Jung vd., 2017). Spinorfin de bir P2X3 reseptör antagonisti olarak antinosiseptif etki gösterebilmektedir (Ueda

vd., 2000). Aynı zamanda bir enkefalinaz inhibitörü olan spinorfinin bu yönüyle de analjezik etki ortaya çıkarabilmesi oldukça önemlidir.

1.14 Migrenin Tedavisi

Migren baş ağrısının akut tedavisinde nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, kombine analjezikler, ergotamin preparatları ile triptanlar, ditanlar ve gepantlar kullanılırken yakın zamanda geliştirilen CGRP ve reseptörüne yönelik monoklonal antikorlar migrene özgü yeni ve oldukça etkili bir tedavi seçeneği olarak karşımıza çıkmaktadır (Puledda, Silva, vd., 2023). Hafif ve orta şiddetli ataklar için aspirin, diklofenak, ibuprofen gibi nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar ile parasetamol ve nonopioid analjezik ilaçlar tercih edilirken bu ilaçların yetersiz kaldığı durumlarda ve yüksek şiddetli ataklarda triptanlar ve ergotamin türevleri gibi migrene özgü ilaçlar kullanmak gerekmektedir (The American Headache Society, 2019).

Ergotamin ve dihidroergotamin gibi ergot alkaloidleri migrende en eski kullanıma sahip ilaçlardandır. 5-hidroksitriptamin (5-HT) 1B ve 5-HT 1D serotoninerjik reseptörlerini aktive ederek meningeal damarlarda vazokonstriksiyona ve trigeminal nöron aktivasyonunda baskılanmaya neden olabilirler (Ong ve De Felice, 2018). Uzun zaman migrenin tedavisi için kullanılmış olan bu bileşiklerin vazokonstriksiyon etkisi ve reseptör seçiciliklerinin düşük olması özellikle dolaşımsal hastalığı olan kişilerde kardiyovasküler yan etkiler ortaya çıkmasına ve bulantı, kusma, bacaklarda güçsüzlük gibi diğer yan etkilere neden olabilmektedir (Ong ve De Felice, 2018; Tfelt-Hansen, 2000). Daha spesifik agonistler olan triptanların keşfiyle birlikte ergot alkaloidleri kısıtlı bir şekilde triptanlara alternatif olarak kullanılmaktadır (Ashina vd., 2021).

Migrenin tedavisi ile ilgili önemli bir gelişme spesifik 5-HT 1B/D reseptör agonistleri olan triptanların kullanılması olmuştur (Goadsby, 2000). Triptanların bağlandığı spesifik 5-HT 1B, 5-HT 1D ve 5-HT 1F reseptörleri trigeminal afferent sinir uçları, TCC, beyin sapı ve talamus nöronları gibi nöral yapılarda bulunduğu gibi kranial ve sistemik kan damarlarında da bulunur (D. W. Dodick, 2018b). Damarlardaki 5-HT 1B reseptörleri üzerinden vazokonstriksiyona neden olurken 5-HT 1D reseptörleri üzerinden nörojenik inflamasyonun bir nedeni olan CGRP gibi vazoaktif peptitlerin salınımını engellemektedirler. Böylece migren patogenezinin katkıda bulunan bu etkenleri baskılayarak ağrıyı hafifletirler (Ong ve De Felice, 2018). Triptanların periferik etkisi olarak nosiseptörlerin aktivasyonunu inhibe edip

vazoaktif peptit salınımı ve plazma protein ekstrasvazasyonu gibi nörojenik inflamasyon basamaklarını baskılaması ifade edilirken merkezi olarak TNC gibi bölgelerde nosiseptif sinyallerin iletimini engelleyebileceği ifade edilmektedir (Ahn ve Basbaum, 2005).

Günümüzde yedi farklı triptan bulunmaktadır ve bunlardan sumatriptan, zolmitriptan, rizatriptan, naratriptan, almotriptan ve rovatriptan 5-HT 1B/D agonisti iken eletriptan 5-HT 1B/D ve 5-HT 1F reseptörlerinin agonistidir (Ong ve De Felice, 2018). Triptanların hepsi moleküler olarak benzer olsa da etkinlik ve tolere edilebilirliklerinde farklılıklar olduğu gibi kişiden kişiye etkinlikleri de değişebilir (Färkkilä vd., 2003; Rapoport vd., 2006). Her ne kadar klinik kullanımda ciddi bir kardiyovasküler risk ortaya çıkarmamış olsalar da güçlü vazokonstriktör oldukları için kardiyovasküler hastalığı olanlarda kullanımları riskli ve kontrendikedir (D. Dodick vd., 2004). Bununla birlikte parestezi, kızarıklık, çarpıntı gibi yan etkilerle kişiye ve cinsiyete göre etkinliklerindeki azalma triptanların dezavantajlı yönleridir (Ashina vd., 2021; Puledda, Silva, vd., 2023).

Vazokonstriktif etkiye neden olmayan yeni tedavi seçeneklerinin araştırılmasıyla daha seçici özellikte bir 5-HT 1F reseptör agonisti olan lasmiditan geliştirilmiştir (Shapiro vd., 2019). 5-HT 1B reseptörlerine bağlanmadığı için vazokonstriktör etki göstermeyen lasmiditan yakın zamanda hastaların kullanımı için onaylanmıştır (Puledda, Younis, vd., 2023). Damar sistemini etkilemeden triptanların etkisine benzer şekilde nosisepsiyonu inhibe eden lasmiditanın baş dönmesi, mide bulantısı ve uyuşukluk gibi yan etkileri vardır (Puledda, Silva, vd., 2023; Vila-Pueyo vd., 2022). Dolayısıyla triptanlara göre daha avantajlı gibi görünseler de henüz çok fazla çalışma yapılmamış ve onların yerini almamışlardır (Ashina vd., 2021).

Migren tedavisiyle ilgili çalışmalarda seratoninerjik reseptörlerin dışında diğer bir araştırma konusu CGRP ve reseptörleri olmuştur. Bu noktada CGRP reseptör antagonistleri olan gepantlar yakın zamanda geliştirilmiştir (Negro ve Martelletti, 2019). Migren sırasında salınan ve güçlü bir vazodilatatör olan CGRP'nin reseptörlerine yönelik geliştirilen gepantlar vazokonstriksiyona neden olmadan migrenin tedavisinde başarı sağlamıştır (Diener vd., 2015). Şu ana kadar geliştirilen gepantların çoğu karaciğer toksisitesi, oral formülasyonunun olmaması ve ticari nedenlerle kullanımdan kaldırılrsa da bu dezavantajları göstermeyen iki gepant (Ubrogepant ve Rimegepant) yakın zamanda onaylanmıştır (Ashina vd.,

2021). Gepantlar yan etki bakımından oldukça avantajlı gibi görünse de bu konudaki klinik veriler henüz çok yenidir ve triptanların kontrendike ve yetersiz olduğu durumlarda kullanılması tavsiye edilmektedir (Al-Hassany vd., 2022; The American Headache Society, 2019).

CGRP'nin migrendeki rolü yeni bir yaklaşım olan CGRP ve reseptörlerine yönelik monoklonal antikorların geliştirilmesine sebep olmuştur (D. W. Dodick, 2018b). CGRP nöropeptidini (fremanezumab, galcanezumab, eptinezumab) ve reseptörünü (erenumab) hedefleyen dört farklı monoklonal antikor geliştirilmiş ve bunlar hem kronik hem de epizodik migrende oldukça başarılı olmuştur (Charles ve Pozo-Rosich, 2019). Günümüzde migrenin önleyici tedavisinde kullanımı tavsiye edilen monoklonal antikorların hedefe özgül olma, uzun yarı ömürlü olma, böbrek ve karaciğer toksisitesi oluşturmama gibi avantajları varken enjeksiyon bölgesindeki reaksiyonlar, immüniteyi olumsuz etkileme riski ve uzun süreli kullanım sonuçlarının kestirilememesi de dezavantajlı yönleri olarak düşünülmektedir (Charles ve Pozo-Rosich, 2019; The American Headache Society, 2019).

Atak sıklığı fazla olan ve akut tedaviye yetersiz cevap veren kişilerde migrenin önleyici tedavisi için ilaçlar kullanılabilir. Bu ilaçlar arasında monoklonal antikorlar, beta blokerler, antiepileptik ilaçlar, frovatriptan, antidepresanlar, kalsiyum kanal düzenleyicileri ve onabotulinumtoxinA gibi seçenekler yer alır (D. W. Dodick, 2018b; Puleda, Silva, vd., 2023). Sonuç olarak migrenin tedavisi ile ilgili oldukça önemli gelişmeler elde edilse de mevcut tedavi edici ajanların yan etkileri ve tedavideki yetersizlikleri bu konuda daha fazla çalışma yapılmasını gerektirmektedir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

Tez çalışmasında kullanılan sıçanlar Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiş ve bakım prosedürleri burada yapılmıştır. Ortalama 250 gr ağırlığında 64 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Standart pelet yem ve çeşme suyuyla beslenen sıçanlar 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü ile ışıklandırılan bireysel kafeslerinde barındırıldı. Oda sıcaklığı da 20-25 °C arasında tutuldu. Çalışmadaki deneysel işlemler Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde ve Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalında bulunan laboratuvarda gerçekleştirildi. Çalışma için gerekli etik izin Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (karar no: 2022/33, değişiklik: 2023/24 ve 2023/46). Ayrıca bu çalışma Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No:2023-TDR-6.12.56-0001).

2.1 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Cihazlar

Çalışmada kullandığımız laboratuvar malzemeleri ile cihazların firma ve model bilgileri aşağıda verilmiştir.

Tablo 2.1. Kullanılan laboratuvar malzemeleri ve cihazlar.

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

2.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Çalışmada kullandığımız kimyasal maddeler ile kitler aşağıda verilmiştir.

Tablo 2.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve kitler.

Kimyasallar ve kitler	Firma
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich® (Schnelldorf, Almanya)
Kapsaisin	Sigma-Aldrich® (Schnelldorf, Almanya)
Nalmefen hidroklorür	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, ABD)
Nitrogliserin	ADEKA (Samsun, Türkiye)
Paraformaldehit (PFA)	Sigma-Aldrich® (Schnelldorf, Almanya)
Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS)	Sigma-Aldrich® (Schnelldorf, Almanya)
Proteaz enzim inhibitörü	Roche (Basel, İsviçre)
Rat CGRP ELISA Kit	Elabscience (Texas, ABD)
Rat c-Fos ELISA Kit	SunRed (Shanghai, China)
Spinorfin	Elabscience (Texas, ABD)
Sumatriptan	TGI (Tokyo, Japonya)
Toluidine blue	Sigma-Aldrich® (Schnelldorf, Almanya)

2.3 Deney Solüsyonları ve Hazırlanışları

2.3.1 Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS) Hazırlanışı

PBS solüsyonu elde etmek için tablet formdaki PBS'ler kullanıldı. İstenilen oranda solüsyon her bir tablet için 200 ml distile su ilave edilerek ve sonrasında manyetik karıştırıcı ile çözülene kadar karıştırılarak oluşturuldu.

2.3.2 Yapay Beyin Omurilik Sıvısı (yBOS)

Bir litrelik yBOS solüsyonu oluşturulurken potasyum klorür (0,16 gr), magnezyum klorür (0,101 gr), sodyum bikarbonat (2,52 gr), sodyum klorür (6,95 gr), monosodyum fosfat (0,138 gr), kalsiyum klorür (0,294 gr), glikoz (1,98 gr) toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suya eklenip manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülene kadar karıştırıldı. Ardından pH'ı 7,4'e ayarlamak için

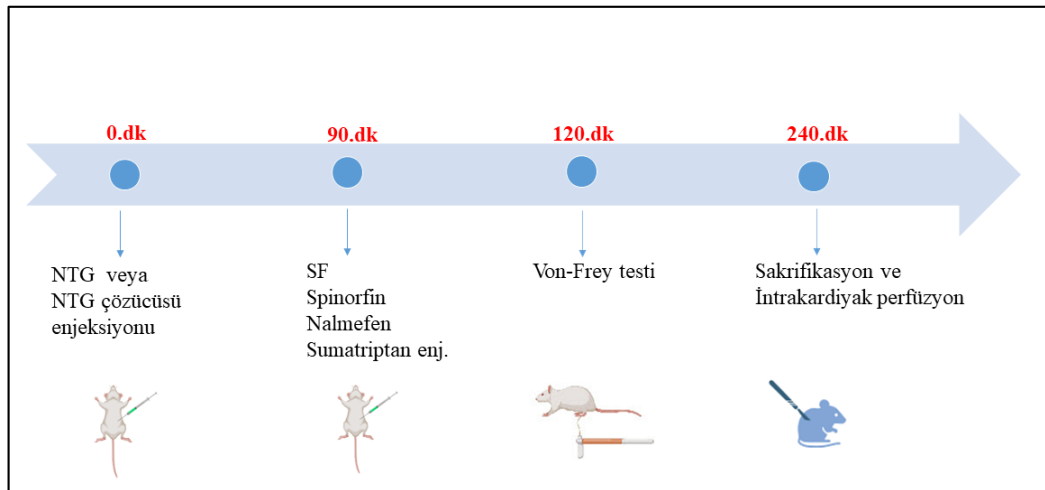
hidroklorik asit eklendi. Hazırlanan yBOS ex-vivo deneylerdeki preparatlar için kullanılmak üzere 30 dk boyunca karbojenlendirildi (%95 O₂ ve %5 CO₂).

2.3.3 Paraformaldehit (PFA) Hazırlanışı

40 gr paraformaldehit (SigmaAldrich® Schnelldorf, Almanya) daha önce hazırlanmış olan PBS solüsyonuna toplam hacim 1 litre olacak şekilde eklendi. Ardından manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve kaynatıldı. İşlem berraklık sağlanana kadar devam ettikten sonra %4'lük PFA solüsyonu elde edilmiş oldu.

2.4 İn Vivo Deney Grupları ve Deneysel Uygulamalar

Migren hastalarında migren atağını tetikleyebilen nitrogliserin kemirgenlerde migren modeli olarak oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kemirgenlerde 10 mg/kg NTG enjeksiyonunun TNC gibi beyin sapı bölgelerinde c-Fos aktivitesini artırdığı, CGRP salınımını artırdığı ve trigeminovasküler aktivasyona neden olarak nosisepsiyonu tetiklediği bildirilmiştir (Sureda-Gibert vd., 2022). Ayrıca migrenin tedavisinde kullanılan triptanlar, ditanlar ve gepantlar NTG'nin bu etkisini tersine çevirmektedir (Akerman vd., 2021). Bizim çalışmamızda da in-vivo migren modeli 10 mg/kg dozunda NTG'nin intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonu yoluyla oluşturuldu.



Şekil 2.1. İn vivo deneysel süreç (Şekildeki fare simgeleri BioRender.com ile oluşturulmuştur.)

2.5 İn Vivo Deney Grupları

Deney grupları her grupta 7 adet sıçan olacak şekilde oluşturuldu ve enjeksiyonlar deneysel süreçte gösterildiği gibi zamanı geldiğinde intraperitoneal yolla uygulandı.

Tablo 2.3. İn vivo deney grupları ve enjeksiyonlar.

Gruplar		Enjeksiyonlar (i.p.)	N
1	Kontrol	NTG çözücüsü + Serum fizyolojik (SF)	7
2	NTG+SF	NTG + SF	7
3	NTG+Spin-1	NTG + Spinorfin 1. Doz	7
4	NTG+Spin-2	NTG + Spinorfin 2. Doz	7
5	NTG+Spin+Nal	NTG + Spinorfin etkin doz + Nalmefen	7
6	NTG+Sumatriptan	NTG + Sumatriptan	7
7	NTG+Sumatriptan+Spin	NTG + Spinorfin etkin doz + Sumatriptan	7

2.5.1 Grup 1: Kontrol Grubu (NTG Çözücüsü + SF)

Kontrol grubu olarak oluşturulan bu gruptaki 7 adet sıçana NTG çözücüsü (%6 alkol + %6 propilen glikol + %0.9 SF) i.p. olarak uygulandı. 90 dakika sonra ikinci enjeksiyonda SF uygulandı. İkinci enjeksiyondan yarım saat sonra ağrı eşiklerini değerlendirmek için von Frey testi yapıldı. NTG çözücüsünün enjeksiyonundan 4 saat sonra deney sonlandırılarak sıçanlar sakrifiye edildi.

2.5.2 Grup 2: NTG + SF Grubu

Model grubu olarak oluşturulan bu gruptaki sıçanlara migreni tetiklemek için 10 mg/kg NTG i.p. olarak enjekte edildi. Bundan 90 dk sonra SF enjekte edildi. SF enjeksiyonundan 30 dk sonra von Frey testi yapıldı. NTG enjeksiyonundan 4 saat sonra da deney sonlandırılarak sıçanlar sakrifiye edildi.

2.5.3 Grup 3: NTG + Spin-1 Grubu

Bu çalışma grubu spinorfinin birinci dozunun (0,5 mg/kg) migren modelindeki etkinliğini araştırmak amacıyla oluşturuldu. Gruptaki sıçanlara ilk olarak 10 mg/kg NTG i.p. olarak enjekte edildi. Bundan 90 dk sonra 0,5 mg/kg spinorfin enjeksiyonu yapıldı. Spinorfin enjeksiyonundan 30 dk sonra von Frey testi

yapıldı. NTG enjeksiyonundan 4 saat sonra deney sonlandırılarak sıçanlar sakrifiye edildi.

2.5.4 Grup 4: NTG + Spin-2 Grubu

Bu grup spinorfinin ikinci dozunun (5 mg/kg) migren modelindeki etkinliğini test etmek amacıyla oluşturuldu. Bu gruptaki sıçanlara ilk olarak 10 mg/kg NTG i.p. olarak enjekte edildi. Bundan 90 dk sonra 5 mg/kg spinorfin enjeksiyonu yapıldı. Spinorfin enjeksiyonundan 30 dk sonra von Frey testi yapıldı. NTG enjeksiyonundan 4 saat sonra deney sonlandırılarak sıçanlar sakrifiye edildi.

2.5.5 Grup 5: NTG + Spin (etkin) + Nal Grubu

Bu çalışma grubunda daha önce von Frey testi ile belirlenen spinorfinin etkin dozunun (Spin-2) migren modelindeki etkinliğini doğrulamak için opioid reseptör antagonisti olan nalmefen kullanıldı. Sıçanlara ilk olarak 10 mg/kg NTG i.p. olarak enjekte edildi. Bundan 90 dk sonra 5 mg/kg spinorfin ve 1 mg/kg Nalmefen enjeksiyonu yapıldı. Bu enjeksiyonlardan 30 dk sonra von Frey testi yapıldı. İlk enjeksiyondan 4 saat sonra deney sonlandırılarak sıçanlar sakrifiye edildi.

2.5.6 Grup 6: NTG + Sumatriptan Grubu

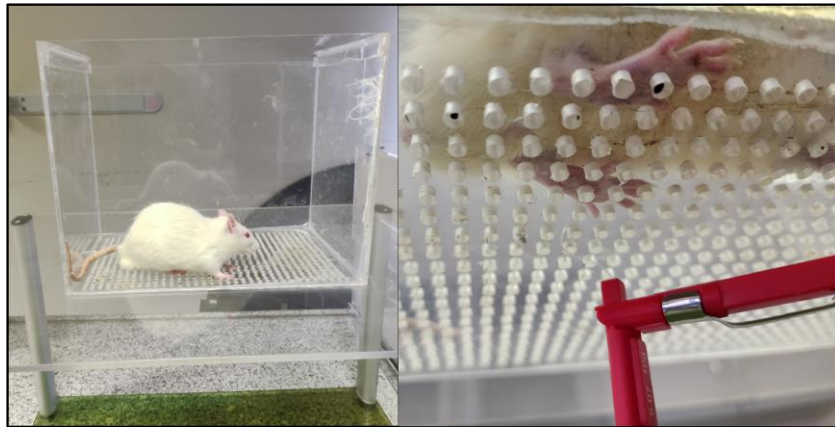
Pozitif kontrol grubu olarak oluşturulan bu grupta migren tedavisinde kullanılan bir ilaç olan sumatriptan kullanıldı. Sıçanlara ilk olarak 10 mg/kg NTG i.p. olarak enjekte edildi. Bundan 90 dk sonra 600 µg/kg sumatriptan enjeksiyonu yapıldı. Sumatriptan enjeksiyonundan 30 dk sonra von Frey testi yapıldı. NTG enjeksiyonundan 4 saat sonra deney sonlandırılarak sıçanlar sakrifiye edildi.

2.5.7 Grup 7: NTG + Sumatriptan + Spin Grubu

Bu grup tedavi ajanı olan sumatriptan ile çalışma konusu madde olan spinorfinin etkin dozunun migren modelinde birlikte etkisini test etmek amacıyla oluşturuldu. Sıçanlara ilk olarak 10 mg/kg NTG i.p. olarak enjekte edildi. Bundan 90 dk sonra 600 µg/kg sumatriptan ve 5 mg/kg spinorfin enjeksiyonu birlikte yapıldı. Bu enjeksiyonlardan 30 dk sonra von Frey testi yapıldı. NTG enjeksiyonundan 4 saat sonra deney sonlandırılarak sıçanlar sakrifiye edildi.

2.6 Von-Frey Testi İle Mekanik Hiperaljezinin Ölçülmesi

Von-Frey testi klinik öncesi migren modellerinde kemirgenlerdeki ağrı davranışını değerlendirmek amacıyla kullanılan bir testtir (Mason vd., 2021). Deney gruplarındaki sıçanlarda ağrı eşiğini değerlendirmek amacıyla içerisinde 0.008 gramdan 300 grama kadar değişik güçlerde filamentler olan von-Frey filament seti kullanıldı. Von-Frey testleri sıçanlara ağrının ortaya çıkmasının beklendiği zaman yani NTG enjeksiyonundan 2 saat sonra yapıldı. Çalışmada sıçanlara von-Frey testi hem plantar hem de periorbital olarak uygulandı (Fotoğraf 2.1., Fotoğraf 2.2.). Sıçanlar plantar test için zemini delikli bir kafese periorbital test için ise küçük yüzeyli yüksek bir platforma koyulup ortama alışmaları sağlandı. Arka ayak orta plantar bölge ve beriorbital yüz bölgesi filamentlerin uygulandığı bölgelerdi. Sıçanların plantar test sırasında pençelerini çekmesi veya sallaması cevap olarak kabul edilirken periorbital test sırasında da başını çekme ve sallama hareketi cevap olarak kabul edildi. Ancak bu esnada başka bir etkenin yanıt oluşturmamasına özen gösterildi. Plantar ve periorbital testlerde filamentler 2 gr seviyesinden başlanarak uygulandı ve uygulama sırasında filament ‘‘C’’ şeklinde bükülene kadar basınç uygulamaya dikkat edildi. Her filament üç kez uygulandı. Uygulamada cevap alınmazsa bir üst filamente geçildi ancak cevap ortaya çıkarsa bir alt filamente geçildi. Aynı filament ile yapılan üç testten en az ikisinde cevap alınan en düşük gram değeri mekanik nosiseptif eşik olarak kabul edildi. Von-Frey testi uygulamasında kullandığımız bu prosedür genel olarak kabul gören bir yöntem olan ‘‘up and down’’ yöntemidir (Mason vd., 2021; Vuralli vd., 2019).



Fotoğraf 2.1. Von-Frey filament testinin plantar uygulaması



Fotoğraf 2.2. Von-Frey filament testinin periorbital uygulaması

2.7 İn Vivo Deneylerin Sonlandırılması ve İntrakardiyak Perfüzyon

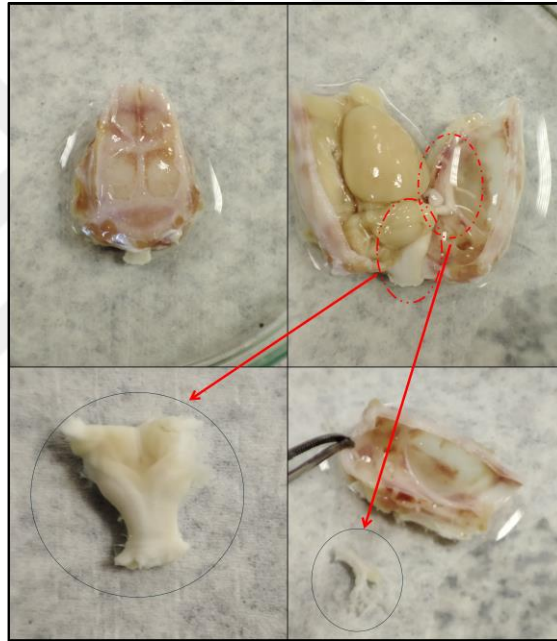
NTG enjeksiyonundan dört saat sonra sıçanlar anestezi (90 mg/kg ketamin + 10 mg/kg ksilazin) altına alınarak perfüzyon işlemine tabi tutuldu. Perfüzyon işlemi sol ventriküle yerleştirilen bir kanül aracılığıyla 200 ml PBS enjeksiyonu yapılarak gerçekleştirildi (Fotoğraf 2.3.).



Fotoğraf 2.3. İntrakardiyak perfüzyon işleminin gerçekleştirilmesi

2.8 Beyin Sapı, Trigeminal Gangliyon ve Dura Materin Çıkarılması

İntrakardiyak perfüzyon işlemi tamamlandıktan sonra kranyum dikkatli bir şekilde kesilerek ortadan ikiye ayrıldı. Ardından beyin dokusu çıkartılıp beyin sapı kesilerek alındı. Trigeminal gangliyon da çıkartılıp alındıktan sonra trigeminal gangliyon ve beyin sapı dokuları -20 °C’de saklandı. Yarım kranyumlar ise daha sonra dura mater kısımları çıkartılıp alınmak üzere % 4’lük PFA solüsyonunun içine konuldu. Böylece dural mast hücreleri fikse edilmiş oldu. Dokuların çıkarılması esnasındaki kranyum, beyin sapı ve trigeminal gangliona ait görseller aşağıdadır (Fotoğraf 2.4.).



Fotoğraf 2.4. Çıkarılan kranyum, beyin sapı ve trigeminal ganglion dokuları

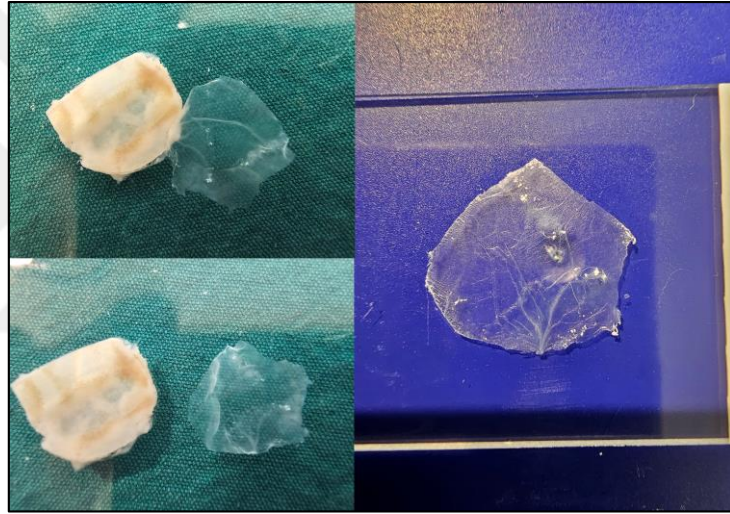
2.9 Dokuların Homojenizasyonu

Daha önce alınıp -20 °C’de saklanan beyin sapı ve trigeminal gangliyon dokuları tartıldı ve içerisinde PBS (100 mg ıslak doku/1 ml) bulunan homojenasyon kaplarına koyuldu. Ardından homojenasyon kapları buzlu beher içerisine alındı ve homojenizatör (ISOLAB, Ultra-Turrax) yardımıyla dokular homojenize edildi. Homojenasyon sonucunda oluşan homojenatlar +4 °C sıcaklıkta 15 dk boyunca 4000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatantlara proteaz

inhibitörü katıldı ve daha sonra ELISA ile CGRP ve c-Fos analizlerini yapmak üzere -20 °C’de saklandı.

2.10 Dura Mater Preparatlarının Hazırlanması

PFA solüsyonu içerisinde çıkarılan yarım kranyumlar PBS solüsyonu ile yıkandı. Sonrasında dura materler hassas bir şekilde çıkartılıp lam üzerine yerleştirildi ve kurumaları beklendi (Fotoğraf 2.5.). Dura materlere hazırlanmış olan Toluidine Blue (% 0.1, pH:2.5) boya solüsyonundan damlatılarak boyama yapıldı. Preparatlar 15 dk inkübe edildikten sonra üç kere distile su ile yıkandı. Sonrasında 1.5 dk %95’lik alkolde 1.5 dk da %100’lük alkolde bekletildi. Preparatlar kuruduktan sonra entellan damlatılıp üzeri lamelle kapatıldı.



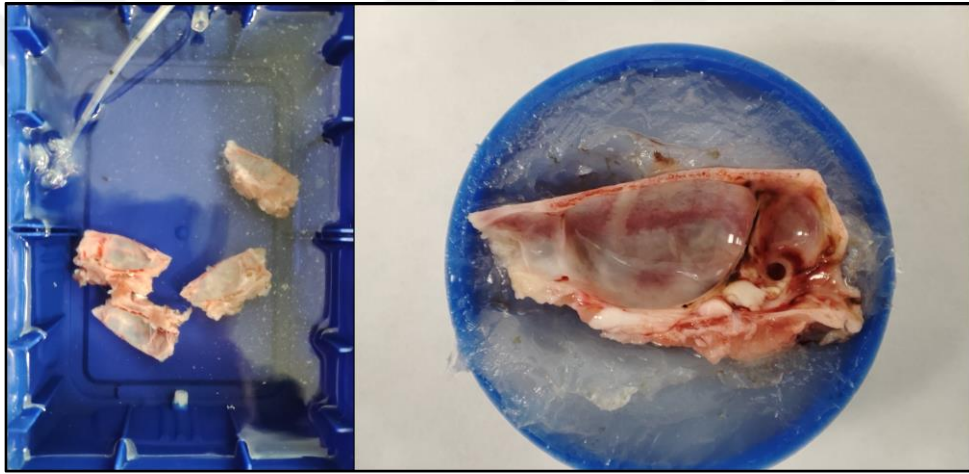
Fotoğraf 2.5. Dura materin çıkarılması ve preparat için yayma

2.11 Mast Hücre Sayı ve Degranülasyonunun Belirlenmesi

Dura materlerdeki mast hücrelerinin değerlendirilmesi için preparatlar ışık mikroskobu ile 40x büyütme yapılarak gözlemlendi. İnceleme sırasında orta meningeal arterin dallanma yaptığı beş farklı alana odaklanıldı. Bu alanlardaki sağlam ve degranüle mast hücreleri sayıldı. Mast hücreleri değerlendirilirken bir mast hücresi eğer etrafında 15’ten fazla granül dağılmışsa veya granül içeriğini kaybettiği için boyanmamış ve hayalet hücre görünümü almışsa degranüle olduğuna karar verildi.

2.12 Ex Vivo Deneysel Uygulamalar ve Hemiskull Preparatlarının Hazırlanması

Sıçanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilip atlanto-oksipital eklem hizasından kafaları kesildi ve kafa derileri uzaklaştırıldı. Sıçanların kafaları sürekli olarak karbojenlendirilen yBOS içerisine alınıp üzerlerindeki dokular temizlendi. Ardından sagittal sütür hizasından kesilerek ikiye bölündü ve dura matere zarar vermeden beyin dokusu uzaklaştırıldı. Elde edilen hemiskull preparatları yBOS içerisinde 30 dk boyunca süperfüzyona tabi tutuldu (Fotoğraf 2.6.). Devamında içerisinde vazelin bulunan petri kaplarına koyularak fikse edilen hemiskull preparatları çalışmaya hazır duruma geldi (Fotoğraf 2.6.).

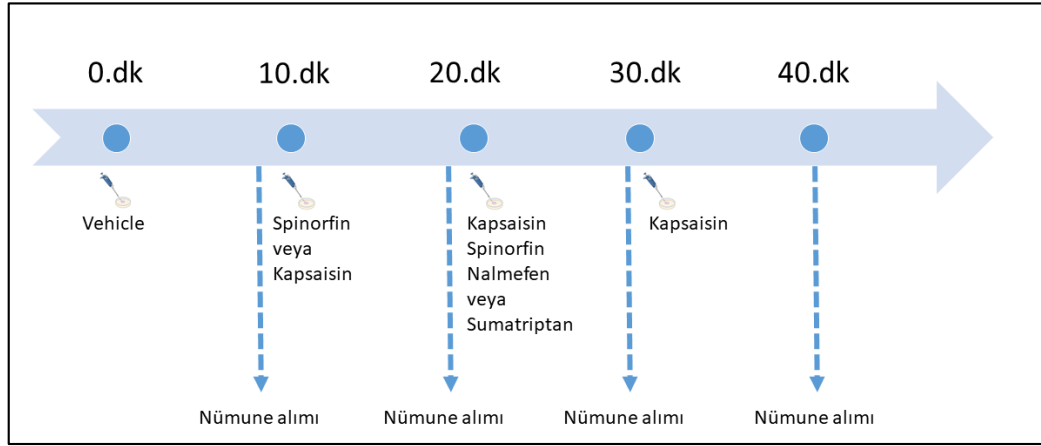


Fotoğraf 2.6. yBOS içerisinde süperfüzyon ve izole hemiskull preparatı

2.13 Ex Vivo Deney Grupları

Ex vivo deneylerde her grup 3 sıçan yani 6 preparattan ($n=6$) oluşuyordu. Vazelin üzerinde sabitlenen preparatlarda gruplara göre hazırlanmış kimyasal ve solüsyonlar dura mater ile kaplı kraniyal boşluğa 400 μ l hacimde uygulanarak çalışıldı. Her preparata öncelikle stabilizasyon amacıyla 400 μ l yBOS eklenip 37 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra bu örnekler alınıp uzaklaştırıldı. Bu işlem bir daha tekrarlandıktan sonra çalışma gruplarına göre kimyasalların uygulanışına geçildi. Deneysel uygulamalardan sonra elde edilen süpernatantlar CGRP yıkımını engelleyen proteaz inhibitor kokteyli eklenerek -20 °C'de saklandı. Süpernatantların içerdiği CGRP düzeyleri daha sonra ELISA yöntemi ile analiz

edildi. Ex vivo deney gruplarında yapılan işlemlerin süreci aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Ex vivo deneysel süreç (Şekildeki simgeler BioRender.com ile oluşturulmuştur.)

2.13.1 Grup 1: Spinorfin, Nalmefen ve Kapsaisin Ayrı Uygulamaları

Preparatlara ilk olarak kontrol amacıyla yani bazal CGRP salınımını tespit etmek için 400 µl vehicle (yBOS içinde çözülmüş %0.1 DMSO) solüsyonu eklendi. Devamında inkübatöre koyularak 37 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alındı ve -20 °C'de saklandı. İkinci işlem olarak preparatlara 100 µM konsantrasyonda spinorfin içeren 400 µl yBOS eklendi. Devamında inkübatöre koyularak 37 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alındı ve -20 °C'de saklandı. Üçüncü işlem olarak preparatlara 10 µM konsantrasyonda nalmefen içeren 400 µl yBOS eklendi. Devamında inkübatöre koyularak 37 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alındı ve -20 °C'de saklandı. Dördüncü işlem olarak preparatlara 100 nM konsantrasyonda kapsaisin içeren 400 µl yBOS eklendi. Devamında inkübatöre koyularak 37 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alındı ve -20 °C'de saklandı. Bu deney grubu ile ex vivo preparatlarda bazal CGRP salınımı ile spinorfin, nalmefen ve kapsaisin uygulamaları sırasındaki CGRP salınımlarının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Diğer gruplarda da uygulanan işlemler benzer şekildedir ancak yalnızca uygulanan kimyasallar değişiklik göstermektedir.

2.13.2 Grup 2: Kapsaisin + Spinorfin

İkinci grup preparatlara öncelikle kontrol için 400 µl vehicle solüsyonu eklendi. Ardından 37 °C’de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alınıp -20 °C’de saklandı. İkinci işlem olarak preparatlara yukarıda bahsedildiği gibi kapsaisin (100 nM) eklendi. Ardından 37 °C’de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alınıp -20 °C’de saklandı. Üçüncü işlem olarak preparatlara yukarıda bahsedildiği gibi kapsaisin (100 nM) ve spinorfin (100 µM) birlikte uygulandı. Ardından 37 °C’de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alınıp -20 °C’de saklandı. Bu deney grubunda kapsaisin ile indüklenen CGRP salınımı ile bu salınımı engellemesi beklenen spinorfinin birlikte uygulandığı zaman ki CGRP salınımının kıyaslanması amaçlanmıştır.

2.13.3 Grup 3: Kapsaisin + Spinorfin + Nalmefen

Üçüncü grup preparatlara öncelikle kontrol için 400 µl vehicle solüsyonu eklendi. Ardından 37 °C’de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alınıp -20 °C’de saklandı. İkinci işlem olarak preparatlara yukarıda bahsedildiği gibi kapsaisin (100 nM) eklendi. Ardından 37 °C’de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alınıp -20 °C’de saklandı. Üçüncü işlem olarak preparatlara yukarıda bahsedildiği gibi kapsaisin (100 nM), spinorfin (100 µM) ve nalmefen (10 µM) birlikte uygulandı. Ardından 37 °C’de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alınıp -20 °C’de saklandı. Bu deney grubunda nalmefen eklenerek spinorfinin CGRP salınımı üzerindeki olası etkisinin doğrulanması amaçlanmıştır.

2.13.4 Grup 4: Kapsaisin + Sumatriptan

Dördüncü grup preparatlara öncelikle kontrol için 400 µl vehicle solüsyonu eklendi. Ardından 37 °C’de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alınıp -20 °C’de saklandı. İkinci işlem olarak preparatlara yukarıda bahsedildiği gibi kapsaisin (100 nM) eklendi. Ardından 37 °C’de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alınıp -20 °C’de saklandı. Üçüncü işlem olarak preparatlara yukarıda bahsedildiği gibi kapsaisin (100 nM) ve sumatriptan (30 µM) birlikte uygulandı. Ardından 37 °C’de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki

örnekler alınıp -20 °C’de saklandı. Bu grup CGRP alımının bloke edilmesi için pozitif kontrol grubu olarak oluşturulmuştur.

2.13.5 Grup 5: Kapsaisin + Sumatriptan + Spinorfin

Beşinci grup preparatlara öncelikle kontrol için 400 µl vehicle solüsyonu eklendi. Ardından 37 °C’de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alınıp -20 °C’de saklandı. İkinci işlem olarak preparatlara yukarıda bahsedildiği gibi kapsaisin (100 nM) eklendi. Ardından 37 °C’de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alınıp -20 °C’de saklandı. Üçüncü işlem olarak preparatlara yukarıda bahsedildiği gibi kapsaisin (100 nM), sumatriptan (30 µM) ve spinorfin (100 µM) birlikte uygulandı. Ardından 37 °C’de 10 dk inkübe edildikten sonra preparatlardaki örnekler alınıp -20 °C’de saklandı. Bu deney grubunda spinorfin sumatriptan ile birlikte uygulanarak kombine etkilerinin araştırılması ve spinorfinin sumatriptanın etkisini artırıp artıramayacağının araştırılması amaçlanmıştır.

2.14 CGRP ve C-Fos Düzeylerinin ELISA Yöntemiyle Analizi

İn vivo gruplardan elde edilen trigeminal gangliyon süpernatantlarının CGRP analizi, beyin sapı süpernatantlarının CGRP ve c-Fos analizi, ex vivo gruplardan elde edilen süpernatantların da CGRP analizi ELISA yöntemi ile yapıldı. ELISA çalışması kitleri üreten firmaların yönergesindeki prosedüre göre gerçekleştirildi.

2.14.1 ELISA Prosedürünün Uygulanması

ELISA analizi için 96 kuyucuklu araştırma kitleri firmalardan temin edildi. Beyin sapı, trigeminal gangliyon süpernatantlarının ve ex vivo gruplardan elde edilen süpernatantların CGRP analizi firmanın (Elabscience Texas, ABD) talimatlarına göre yapıldı. CGRP kiti ile çalışırken öncelikle plakanın standart kuyucuklarına 100 µL CGRP standart örneği eklendi. Diğer örnek kuyucuklarına da 100 µL örnek eklendikten sonra inkübatöre konulup 37 °C’de 90 dakika inkübe edildi. Sonrasında kuyucuklara 100 µL Biotinlenmiş Tespit Ab eklendi ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Ardından kuyucuklara 100 µL HRP konjugat eklenip 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi. Sonrasında kuyucuklara 90 µL substrat reaktifi eklendi ve 37°C’de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında

kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu eklenerek plaka üzerindeki işlem tamamlandı. Plaka ELISA okuyucuya (Biotek, Epoch) yerleştirilip örneklerin optik yoğunlukları 450 nm'de ölçüldü. Örneklerdeki CGRP konsantrasyonları optik yoğunluk eğrisine göre hesaplandı.

Beyin sapı süpernatantlarının c-Fos analizi de firmanın (SunRed Shanghai, China) talimatlarına göre yapıldı. C-Fos kitinin çalışılması CGRP kitininkine benzer şekilde yapıldı. C-Fos kiti ile çalışırken plakanın standart kuyucuklarına 50 µL c-Fos standart örneği ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Örnek kuyucuklarına 40 µL c-Fos örneği, 10 µL c-Fos antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Sonrasında kuyucuklara 50 µL Chromogen-A ve 50 µL Chromogen-B eklenip 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu eklenerek plaka üzerindeki işlem tamamlandı. Plaka ELISA okuyucuya yerleştirilip örneklerin optik yoğunlukları 450 nm'de ölçüldü.

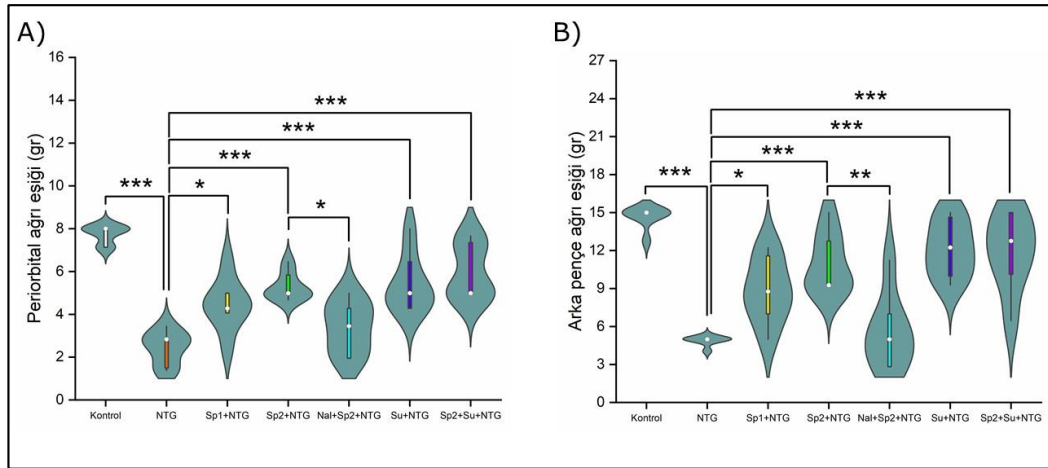
2.15 Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışmadaki verilerin istatistiksel analizi için SPSS 22.0 yazılımı kullanıldı. Elde edilen verilerin normal dağılım analizi için Shapiro–Wilk testi kullanıldı. İn vivo gruplardan elde edilen veriler One-Way ANOVA testi ve ardından Tukey post-hoc testi ile analiz edildi. Ex vivo gruplardan elde edilen veriler ise One-Way Repeated Measures ANOVA ve ardından Bonferroni post-hoc testi ile analiz edildi. $P < 0.05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1 Migrenin İn Vivo Gruplarında Ağrı Eşiğindeki Değişimler

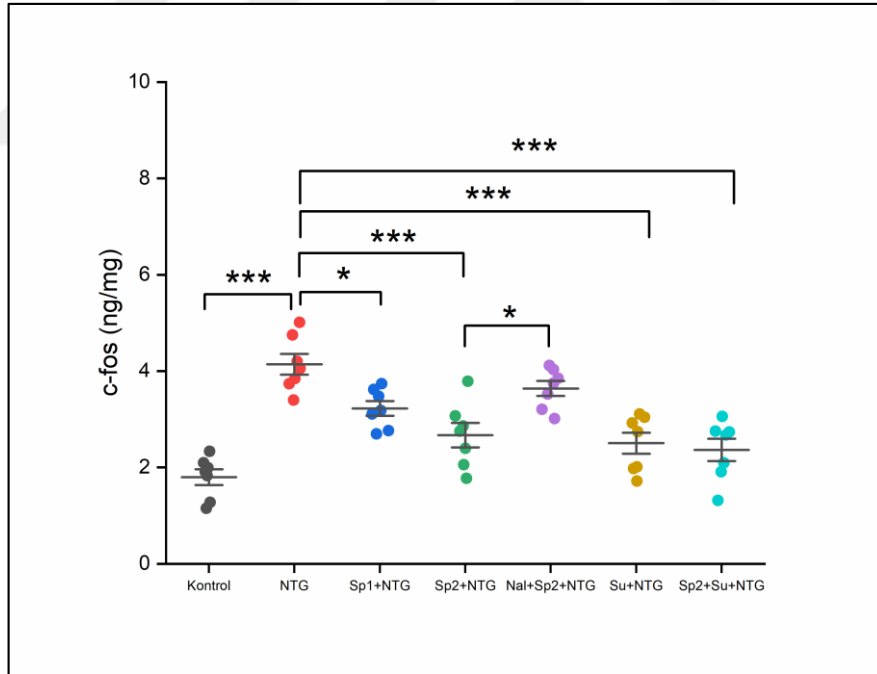
İn vivo deney gruplarındaki nosiseptif ağrı eşiğini gösteren periorbital ve plantar test sonuçları benzerdi (Şekil 3.1.A ve B). NTG uygulanarak migrenin deneysel modelinin oluşturulduğu grupta mekanik nosiseptif eşik kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldı ($P<0.001$, Şekil 3.1.A ve B). Migrenin tedavisinde kullanılan sumatriptan ise NTG'in neden olduğu nosiseptif eşikteki azalmayı tersine çevirdi ($P<0.001$, Şekil 3.1.A ve B). Spinorfinin 1. doz (0,5 mg/kg) ve 2. doz (5 mg/kg) uygulamaları NTG kaynaklı olarak azalmış olan nosiseptif eşiği artırdı ($P<0.05$; $P<0.001$, Şekil 3.1.A ve B). Spinorfinin 5 mg/kg dozu nosiseptif eşiği daha fazla artırdı ve bu sumatriptanın etkisi ile benzerdi ($P<0.001$, Şekil 3.1.A ve B). Bu sebeple spinorfinin 5 mg/kg dozu etkin doz olarak belirlendi ve sonraki deneylerde bu doz kullanıldı. Opioid reseptör antagonisti olan nalmefen spinorfinin etkisini tersine çevirdi (Periorbital; $P<0.05$, Plantar; $P<0.01$, Şekil 3.1.A ve B). Bu durum spinorfinin antinosiseptif etkisinin endojen opioid sistem aracılığıyla gerçekleştiğini gösterdi. Spinorfin etkin dozu (5 mg/kg) ile sumatriptanın birlikte uygulanması NTG kaynaklı mekanik hiperaljeziyi azalttı ($P<0.001$, Şekil 3.1.A ve B). Fakat bu birlikte etkinin spinorfin ve sumatriptanın ayrı ayrı uygulamalarına bir üstünlüğü yoktu ($P<0.001$, Şekil 3.1.A ve B). İn vivo grupların ağrı eşiği değerlerine ait grafikler aşağıdadır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. İn vivo deney gruplarında periorbital ve plantar ağrı eşiği değerleri

3.2 İn Vivo Gruplarda Beyin Sapı C-Fos Düzeyleri

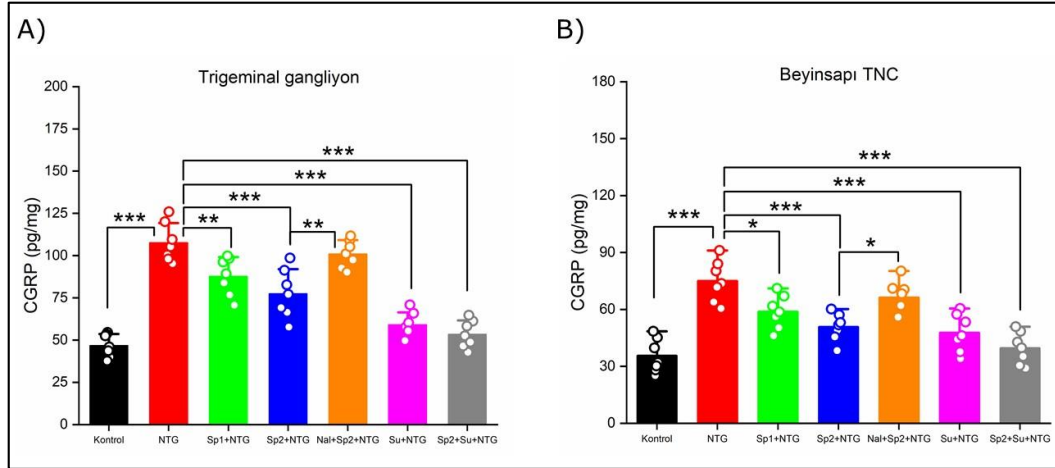
Migrenin deneysel modelini oluşturmak için uygulanan NTG sıçanların beyin sapında c-Fos düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artırdı ($P<0.001$, Şekil 3.2.). Spinorfinin birinci ve ikinci doz uygulamaları NTG kaynaklı beyin sapı c-Fos artışını azalttı ve bu etkin doz için daha fazlaydı ($P<0.05$; $P<0.001$, Şekil 3.2.). Sumatriptan da NTG kaynaklı beyin sapı c-Fos artışını tersine çevirdi ve bu spinorfinin etkin dozun etkisi ile benzerdi ($P<0.001$, Şekil 3.2.). Nalmefen spinorfinin beyin sapı c-Fos artışını engelleyici etkisini anlamlı düzeyde bloke etti ($P<0.05$, Şekil 3.2.). Bu sonuç ağrı eşiğindeki bulgulara paralel olarak spinorfinin endojen opioid sistem aracılığıyla beyin sapı nosiseptif iletimi inhibe ettiğini göstermektedir. Spinorfin (5 mg/kg) ve sumatriptanın birlikte uygulanması ise NTG kaynaklı beyin sapı c-Fos artışını engelledi ($P<0.001$, Şekil 3.2.) ancak bu etki tek tek uygulandıkları zamankinden üstün değildi ($P<0.001$, Şekil 3.2.). İn vivo gruplara ait c-Fos düzeyleri aşağıdadır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. İn vivo deney gruplarında beyin sapı c-Fos düzeyleri

3.3 İn Vivo Gruplarda Beyin Sapı ve Trigeminal Gangliyon CGRP Düzeyleri

NTG sıçanların beyin sapı ve trigeminal gangliyon CGRP seviyelerini kontrol grubu sıçanlarınkine göre anlamlı düzeyde artırdı ($P<0.001$, Şekil 3.3.A ve B). Antimigren ajan olan sumatriptan bu CGRP artışını tersine çevirdi ($P<0.001$, Şekil 3.3.A ve B). Beyin sapı ve trigeminal gangliyon dokularındaki NTG kaynaklı CGRP düzeyindeki artışlar spinorfin birinci doz (0,5 mg/kg) uygulaması ile anlamlı düzeyde tersine çevrildi (Trigeminal gangliyon; $P<0.01$, Beyin sapı; $P<0.05$, Şekil 3.3.A ve B). Spinorfin etkin dozu (5 mg/kg) ise beyin sapı ve trigeminal gangliyon CGRP artışlarını daha fazla oranda tersine çevirdi ki bu sumatriptanın etkisi ile benzerdi ($P<0.001$, Şekil 3.3.A ve B). Opioid reseptör antagonisti nalmeften CGRP seviyelerindeki spinorfin (5 mg/kg) kaynaklı azalmayı anlamlı düzeyde bloke etti (Trigeminal gangliyon: $P<0.01$, Beyin sapı: $P<0.05$, Şekil 3.3.A ve B). Böylece spinorfinin bu etkisinin endojen opioid sistem aktivasyonu ile gerçekleştiği teyit edilmiş oldu. Spinorfin (5 mg/kg) ve sumatriptanın birlikte uygulanması ise tek tek uygulandıklarındaki etkiye benzer şekilde NTG kaynaklı CGRP artışlarını anlamlı düzeyde inhibe etti ($P<0.001$, Şekil 3.3.A ve B).

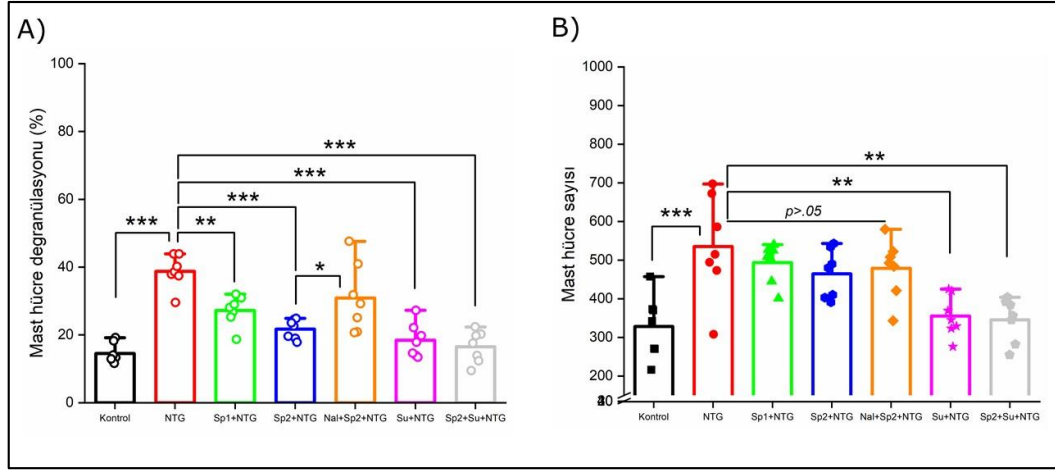


Şekil 3.3. İn vivo deney gruplarında trigeminal gangliyon ve beyin sapı CGRP düzeyleri

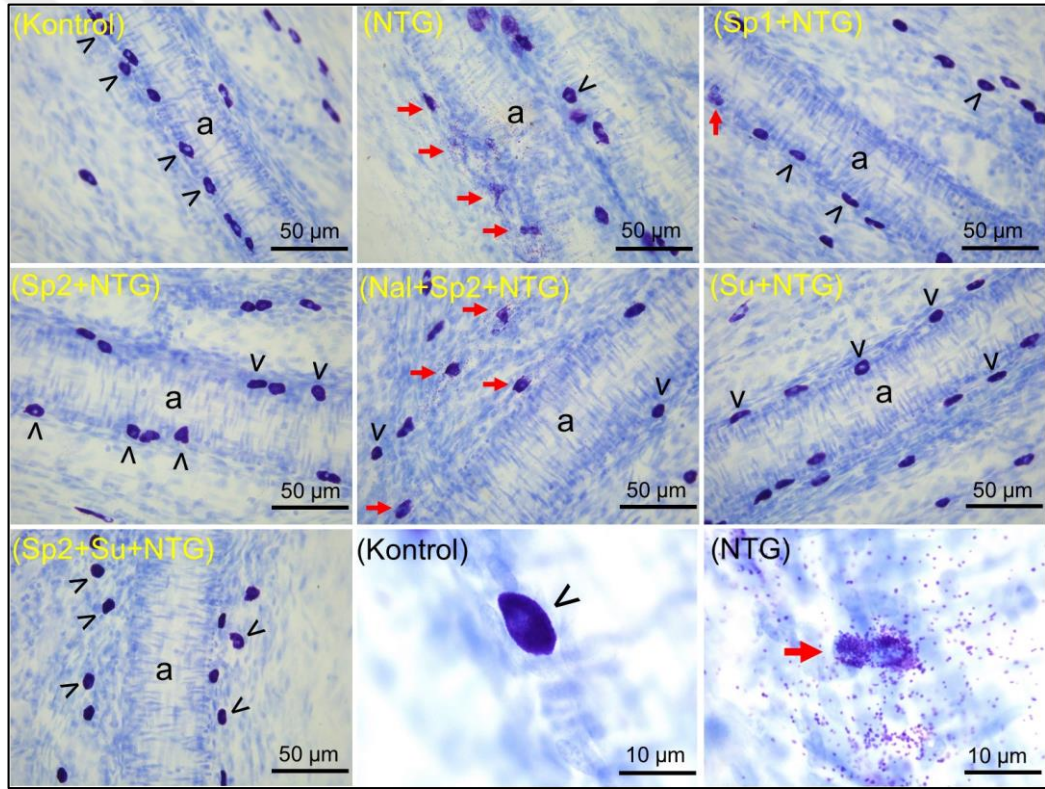
3.4 İn Vivo Deney Gruplarında Meningeal Mast Hücrelerinin Sayıları ve Degranülasyon Düzeyleri

NTG uygulanan gruptaki sıçanların meningeal mast hücre sayıları ve mast hücre degranülasyon miktarı kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttı ($P<0.001$, Şekil 3.4.A ve B). Pozitif kontrol grubundaki sumatriptan uygulaması ise NTG'in neden olduğu mast hücre sayı ve degranülasyonundaki artışı anlamlı düzeyde tersine çevirdi (Mast hücre degranülasyonu: $P<0.001$, Mast hücre sayısı: $P<0.01$, Şekil 3.4.A ve B). Spinorfin birinci dozu (0,5 mg/kg) uygulanan grupta NTG kaynaklı mast hücre degranülasyonu artışını anlamlı düzeyde azaltırken ($P<0.01$, Şekil 3.4.A) mast hücre sayısını da azalttı ancak anlamlı düzeyde değildi ($P>0.05$, Şekil 3.4.B). Spinorfin ikinci dozu ise (5 mg/kg) NTG kaynaklı mast hücre degranülasyonu artışını daha da azalttı ve sumatriptanın etkisine benzer bir etki ortaya çıkardı ($P<0.001$, Şekil 3.4.A). Mast hücre sayısındaki artışı da birinci doza göre daha fazla azalttı ancak bu anlamlı düzeyde değildi ($P>0.05$, Şekil 3.4.B). Opioid reseptör antagonisti nalmefen spinorfinin etkin dozunun NTG kaynaklı meningeal mast hücre degranülasyonundaki artışı inhibe edici etkisini bloke etti ($P<0.05$, Şekil 3.4.A). Bu durum endojen opioid sistemin meningeal mast hücre degranülasyonunu inhibe edici etki gösterdiğini ve spinorfinin buna aracılık ettiğini doğruladı. Spinorfin (5 mg/kg) ile sumatriptanın birlikte uygulanması ayrı ayrı uygulandıklarındakine benzer şekilde NTG kaynaklı mast hücre degranülasyonundaki artışları inhibe etti ($P<0.001$, Şekil 3.4.A). Ayrıca mast hücre sayısındaki artışları da spinorfin (5 mg/kg) ve sumatriptanın birlikte uygulanması sumatriptanın etkisine benzer şekilde azalttı ($P<0.01$, Şekil 3.4.B).

İn vivo deney gruplarına ait meningeal mast hücre sayıları ve degranülasyon miktarlarının grafikleri aşağıdadır (Şekil 3.4.). Ayrıca bu gruplardaki intakt ve degranüle mast hücrelerine ait mikroskop görüntüleri Şekil 3.5.'de verilmiştir.



Şekil 3.4. İn vivo deney gruplarında meningeal mast hücre sayıları ve degranülasyon düzeyleri

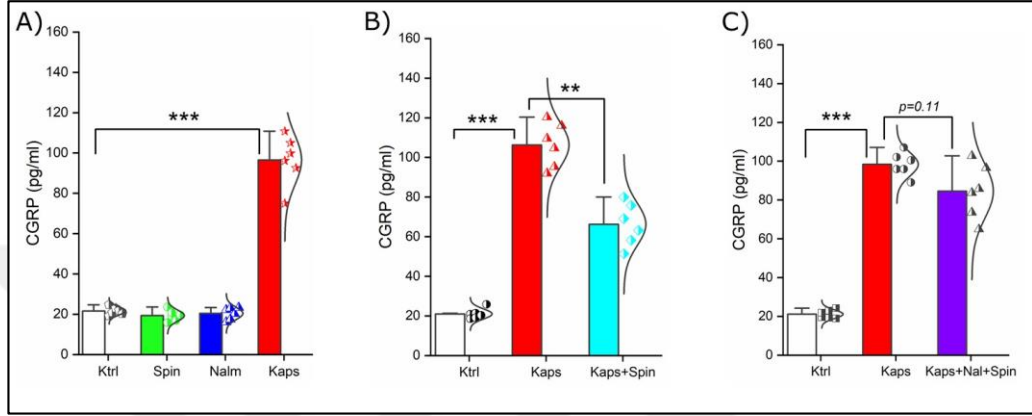


Şekil 3.5. İn vivo deney gruplarında intact ve degranüle meningeal mast hücrelerinin gösterimine ait görüntüler

3.5 Ex Vivo Hemiskull Preparatlarında CGRP Düzeyleri

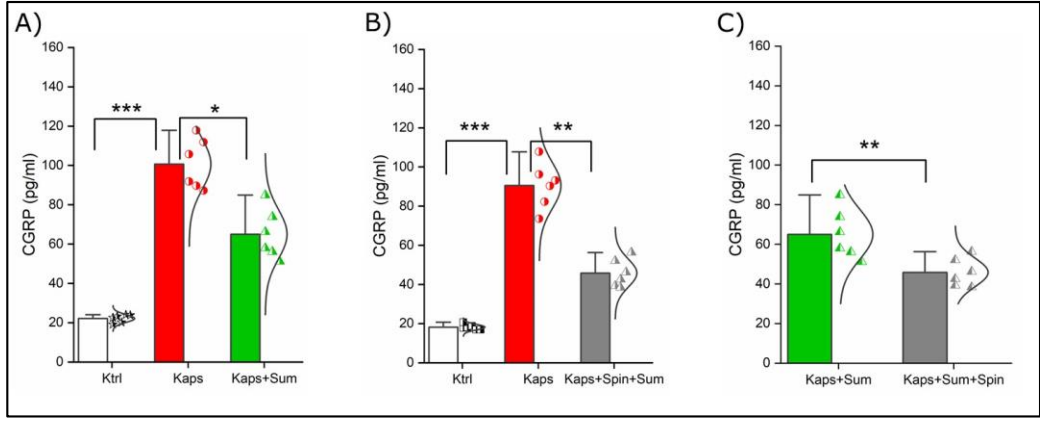
Ex vivo hemiskull preparatlarında kapsaisin CGRP salınımını kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artırdı ($P < 0.001$, Şekil 3.6.A). Spinorfin ve nalmefenin tek başına uygulanması preparatlardaki bazal CGRP salınımını

değiştirmede ($P>0.05$, Şekil 3.6.A). Kapsaisin ile birlikte spinorfin uygulanan preparatlarda kapsaisinin neden olduğu CGRP salınımı anlamlı düzeyde azaldı ($P<0.01$, Şekil 3.6.B). Opioid reseptör antagonisti nalmefenin kapsaisin ve spinorfinle birlikte uygulandığı preparatlarda nalmefen spinorfinin etkisini bloke etti, çünkü kapsaisin ile Kapsaisin+Nalmefen+Spinorfin uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($P=0.11$, Şekil 3.6.C).



Şekil 3.6. Ex vivo hemiskull preparatlarında (Grup 1, 2, 3) CGRP salınım düzeyleri

Pozitif kontrol grubu oluşturmak için kapsaisinle birlikte sumatriptan uygulanan preparatlarda sumatriptan kapsaisinin neden olduğu CGRP salınımındaki artışı anlamlı düzeyde tersine çevirdi ($P<0.05$, Şekil 3.7.A). Sumatriptan ile spinorfinin birlikte uygulandığı preparatlarda ise kapsaisinin neden olduğu CGRP salınımındaki artış oldukça anlamlı bir şekilde azaldı ($P<0.01$, Şekil 3.7.B). Öyle ki kapsaisin kaynaklı CGRP salınımı üzerine spinorfin ve sumatriptanın birlikte etkisi sumatriptanın tek başına etkisinden anlamlı bir şekilde çok daha fazlaydı ($P<0.01$, Şekil 3.7.C).



Şekil 3.7. Ex vivo hemiskull preparatlarında (Grup 4, 5) CGRP salınım düzeyleri

4. TARTIŞMA

Migren patofizyolojisi ile ilgili uzun zamandır çalışmalar yapılmasına ve oldukça önemli bilgiler elde edilmesine rağmen, hâlâ açıklığa kavuşturulmayan noktalar vardır. Migren baş ağrısının tetiklenmesinde trigeminovasküler sistemin aktive olmasıyla birlikte CGRP, SP, VIP (Vazoaktif intestinal peptit) gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınması rol oynamaktadır. Devamında gelişen meningeal vazodilatasyon ve inflamasyon süreçleri ile bu nöropeptitlerin salındığı trigeminal afferentler daha duyarlı hale gelmekte ve artan ağrı duyusu merkezi yapılara iletilmektedir (Khan vd., 2021). Migren baş ağrısı sırasında mast hücre aktivasyonu (degranülasyonu) sonucunda salınan mediyatörlerin de nosiseptif duyarlılığa katkısı olmaktadır. CGRP migren ile ilişkilendirilmiş çok önemli bir belirteçtir ve migren atağı sırasında miktarı artar.

Endojen opioid sistemi vücudun ağrıyı düzenlemede önemli bir parçasıdır ve ağrı ile ilişkili birçok bölgede bileşenleri mevcuttur. Spinorfin ise endojen opioidlerden enkefalinlerin yıkımına sebep olan enzimleri (aminopeptidaz N (APN), neprilisin (NEP) ve dipeptidil peptidaz-3 (DPP III)) bloke ederek endojen enkefalinlerjik aktiviteyi artıran bir endojen peptittir. Endojen opioidlerin yıkımının engellenmesinin migren dışındaki ağrıyı hafifletmek için önemli bir strateji olabileceği daha önce ileri sürülmüştür (Roques vd., 2012). Yakın zamanda DENKI olarak ifade edilen enkefalinleri parçalayıcı enzimleri inhibe eden sentetik kimyasal bileşiklerin migren tedavisinde yeni ve farklı mekanizmaya sahip bir tedavi yaklaşımını temsil edebileceğine dikkat çekilmiştir (Southerland vd., 2021).

Sunulan çalışmada doğal bir enkefalinaz inhibitörü olan spinorfin kullanarak endojen enkefalinlerin miktarının ve etki süresinin artırılmasının deneysel migren modellerindeki etkisini araştırdık.

NTG migren araştırmalarında deneysel migren modellerini oluşturmak için yaygın olarak kullanılan ve nitrik oksit kaynağı olan bir nitrattır. Migren hastalarına intravenöz NTG uygulanması baş ağrısını tetiklediği gibi kemirgenlere uygulanması da migren benzeri belirtilere neden olmaktadır. Mekanik hiperaljezi, migrenle ilişkili yapılarda CGRP ve c-Fos ekspresyonundaki artış bu belirtilerden başlıcalarıdır (Spekker vd., 2024). Sıçanlardaki mekanik hiperaljeziyi değerlendirmek için genellikle von Frey testi kullanılmaktadır (Mason vd., 2021). Biz de sunulan çalışmada migren modelini oluşturmak için sıçanlara NTG

intraperitoneal enjeksiyonu gerçekleştirdik. Sıçanların mekanik nosiseptif eşik düzeylerini von Frey filamentleri kullanarak ölçtük. Daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak NTG uygulaması sıçanlardaki mekanik hiperaljeziyi tetiklediği gibi migrenle ilişkili bulgular olan CGRP ve c-Fos seviyelerini de artırdı (Kilinc vd., 2020, 2022, 2024, 2025; Torun vd., 2024). Öte yandan spinorfin NTG'in neden olduğu mekanik nosiseptif eşikteki azalmayı tersine çevirerek mekanik hiperaljeziyi önledi. Nalmefen ise spinorfinin sebep olduğu nosiseptif eşikteki artışı engelledi. Daha önce yapılan bir in vivo çalışmada spinorfinin, nosiseptin uygulamasıyla ortaya çıkarılan allodiniyi azaltarak antinosiseptif etki gösterdiği buna karşın opioid reseptör antagonisti naloksonun bu etkiyi tersine çevirdiği gösterilmiştir (Honda vd., 2001). Başka bir çalışmada diyabetik nöropatili sıçanlara intraperitoneal olarak spinorfin uygulanmış ve sıcak plaka testlerinde antinosiseptif etki göstermiştir (Cakmak, 2021). Bulgularımız, spinorfinin antinosiseptif etkilerini gösteren bu çalışmalar ile birbirlerini destekler niteliktedir. Ancak çalışmamız spinorfinin migren modellerinde anti-nosiseptif etkisini göstermesi açısından özgündür. Önceki bir çalışmada, inflamatuvar ağrı modeli olarak arka pençe iltihabı oluşturulan sıçanlarda APN ve NEP inhibitörleri ve bunların ikili inhibitörleri mekanik nosiseptif eşik değerlerini önemli düzeyde artırmıştır (Schreiter vd., 2012). Üstelik bu etki enkefalin antikorları ve opioid antagonistleri ile tersine çevrilmiştir (Schreiter vd., 2012). Migrende CGRP salımı ve mast hücre aktivasyonunun nörojenik inflamasyona yol açtığı, bunun da migren ağrısını kötüleştirdiği göz önüne alındığında bulgularımız önceki çalışmada enkefalinaz inhibisyonunun inflamatuvar ağrıyı azaltması ile uyumludur.

Trigeminal aktivasyonu takiben merkezi nosiseptif iletimin önemli bir göstergesi olarak beyin sapı TNC'de c-Fos ekspresyonu yaygın olarak ölçülmektedir (Mitsikostas ve Sanchez del Rio, 2001). Deneysel çalışmalarda migreni tetiklemek için kemirgenlere NTG uygulanması TNC'de c-Fos ekspresyonunu artırmakta buna karşın sumatriptan gibi migren ilaçları bu artışı engellemektedir (Tassorelli ve Joseph, 1995; Wu vd., 2022). Literatürle uyumlu olarak bizim çalışmamızda da NTG uygulaması beyin sapı c-Fos seviyesini artırırken pozitif kontrol olarak uygulanan sumatriptan bu artışı baskıladı. Spinorfin ise sumatriptana benzer şekilde NTG'nin neden olduğu c-Fos artışını baskıladı. Bu bulgular spinorfinin mekanik hiperaljezi üzerindeki etkileri ile uyumludur. Öte

yandan nalmefenin, spinorfinin etkilerini ortadan kadırmış olması spinorfinin opioidlerjik sistem aracılığıyla c-Fos aktivitesini baskıladığını göstermektedir.

CGRP migren baş ağrısının oluşumunda ve devam etmesinde etkili rol oynayan bir nöropeptittir. Trigeminoasküler sistemin aktive olmasıyla nöral yapılardan salınan CGRP trigeminal duysal sinirlerin sensitizasyonu, vazodilatasyon, mast hücre degranülasyonu ve nörojenik inflamasyon gibi değişikliklere neden olarak nosisepsiyonu tetikleyebilmektedir (Balcziak ve Russo, 2022). Ayrıca migrenli bireylerde atak sırasında kanda CGRP düzeyleri artmakta ve migren hastalarına intravenöz yolla CGRP uygulanması migren semptomlarını tetiklemektedir. Patogenezdaki baskın rolü nedeniyle CGRP migren tedavisi için umut verici bir odak haline gelmiştir. CGRP'yi bloke eden ilaçlar geliştirilerek migrenin tedavisini sağlamaya yönelik farmakolojik araştırmalar yapılmaktadır. Migren tedavisinde kullanılan ilaçlardan triptanlar ve ditanlar trigeminal nöronlardaki serotonin reseptörlerinin agonistleridir ve etkinlik gösterdiklerinde CGRP salınımını baskırlar. CGRP reseptör antagonistleri olan gepantlar da CGRP'nin etkisini bloke edebilmekte ve migrende fayda sağlamaktadır. CGRP'nin etkisini bloke etmek için CGRP ve reseptörüne yönelik geliştirilen monoklonal antikorlar ise migren tedavisinde ümit verici yeni yaklaşımlar olmuştur (Edvinsson vd., 2018). Geliştirilen bu ilaçlar migren baş ağrısında oldukça faydalı olmuştur ancak potansiyel yan etkileri ve her hastada aynı etkiyi gösterememeleri gibi kısıtlı yönleri vardır. Bu yüzden migren tedavisi için yeni terapötik ajanların araştırılması gerekmektedir. Bu bağlamda, mevcut çalışmamızda CGRP salınımını azaltarak migren semptomlarını hafifletmek için endojen opioid sistem üzerinde düzenleyici etkisi olan spinorfini kullandık. Endojen opioid sistem enkefalinler gibi opioidleri ve bunların reseptörlerini içerir. Spinorfin ise enkefalinlerin yıkımını sağlayan enkefalinazları inhibe ederek enkefalinlerin seviyelerini ve opioid reseptörleri üzerindeki aktivitesini artırmaktadır. Önceki bir çalışmada, enkefalinlerin güçlü afinite gösterdiği reseptörler olan delta-opioid reseptörlerinin seçici agonisti olan SNC80'in trigeminal gangliyon ve beyin sapı TNC'deki CGRP artışını ve sefalik allodiniyi azalttığı gösterildi (Moye vd., 2021). Bulgularımız enkefalinlerjik aktivite artışının migren modelindeki etkileri açısından bu önceki çalışmayla uyumludur. Buna ek olarak DOR reseptörlerinin beyin sapı TNC, trigeminal gangliyon ve dura materde CGRP salınan liflerde bolca ekspresse edildiği, MOR reseptörlerinin ise daha az oranda bulunduğu bildirilmiştir (Moye vd., 2021; Rice vd., 2017). Dolayısıyla

spinorfin etkisiyle düzeyi artan enkefalinlerin anti-migren etkisi ile DOR reseptörlerinin trigeminovasküler sistemdeki bu yaygın dağılımı birbiri ile uyumludur. Bu durum enkefalinlerin DOR reseptörleri aracılığıyla CGRP salınımını baskıladığının bilimsel gerekçesine temel oluşturmaktadır. Sunulan çalışmada spinorfin sıçanlardaki beyin sapı ve trigeminal gangliyon dokularında NTG kaynaklı CGRP salınımındaki artışı baskılamıştır. Bu etki spinorfinin enkefalinazları inhibe edip enkefalinlerin etkinliğini artırmasıyla ortaya çıkmıştır. Çünkü opioid reseptör antagonisti nalmefenin CGRP salınımındaki baskılanmayı tersine çevirmesi bunu doğrulamaktadır. İn vivo deneylerdeki bulguları destekleyici olarak ex vivo preparatlarda da spinorfinin CGRP salınımını baskıladığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda spinorfinin CGRP salınımını engelleyici etkisi sumatriptanın etkisine benzerdi. Dolayısıyla spinorfinin trigeminovasküler sistemin nöral yapılarından CGRP salınımını baskılayarak migren baş ağrısının tetiklenmesini engellemede etkili bir ajan olduğu söylenebilir.

Opioid reseptörlerinin aktivasyonu, sinir hücrelerinde hiperpolarizasyon ve nörotransmitter salınımında azalma gibi inhibitör etkilere neden olmaktadır. Spinorfinin CGRP salınımını inhibe etmesi de büyük bir ihtimalle bu mekanizma ile gerçekleşmiş olabilir. Sıçan DRG nöronlarından oluşturulan bir kültür çalışmasında spinorfinin DRG nöronlarındaki kapsaisin ile uyarılmış olan sitoplazmik Ca^{+2} geçişlerini ve depolarizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Ayar vd., 2015). Çalışmamızdaki ex vivo preparatlarda da spinorfinin dura materdeki trigeminal afferentlerden kapsaisin ile uyarılmış olan CGRP salınımını engellediği gösterilmiştir. Üstelik bu opioid reseptörlerinin aracılık ettiği nalmefen ile doğrulanmıştır. Çalışmalar her ne kadar farklı olsa da spinorfinin trigeminal nöron yapılarında CGRP salınımını baskılaması ve bunu CGRP salınımı için gerekli olan Ca^{+2} sinyallemesini inhibe ederek gerçekleştirebileceğinin gösterilmesi bakımından birbirini destekler niteliktedir.

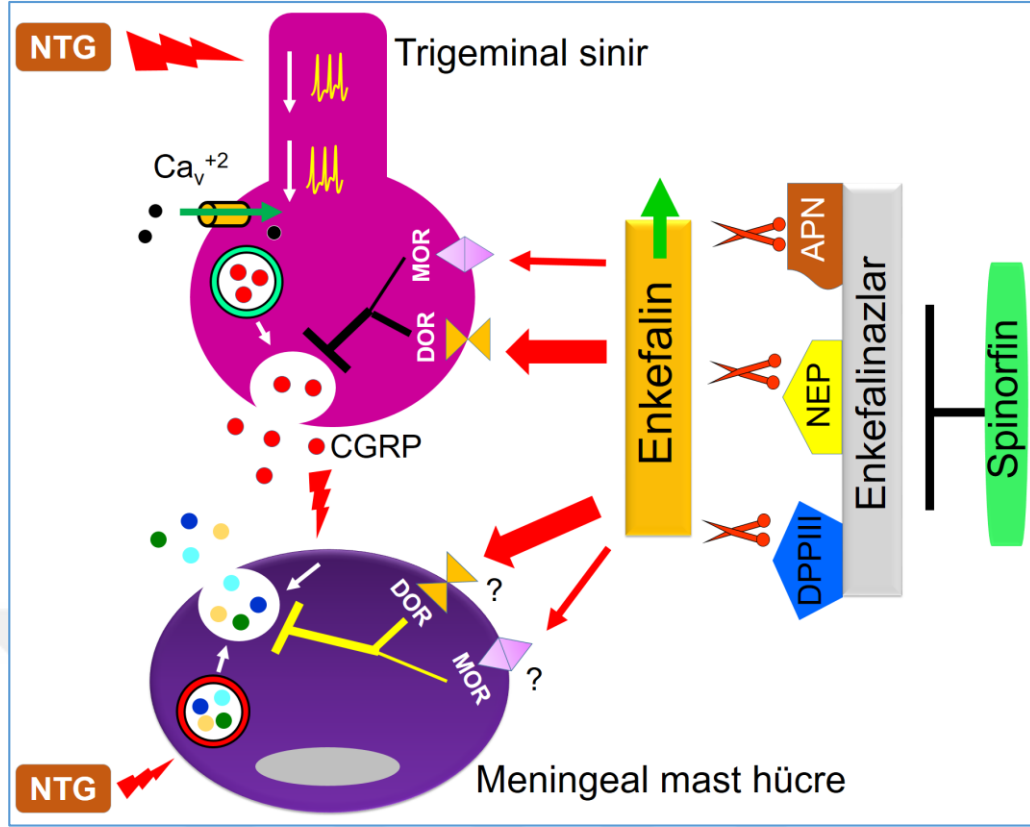
Spinorfinin enkefalinazları inhibe etmenin dışında başka bir özelliği de P2X3 reseptör antagonisti olmasıdır. Yapılan çalışmalarda spinorfinin ATP ile aktive olan insan P2X3 reseptörlerine güçlü antagonist etki gösterdiği bildirilmiştir (K. Y. Jung vd., 2007). İlk olarak duyuşal nöronlarda tespit edilmiş olan P2X3 reseptörleri dorsal kök gangliyonları ile trigeminal nöronlar gibi ağrı ile ilişkili yapılarda ifade edilmektedir ve nosiseptif iletimde önemli rol oynamaktadır (Dong vd., 2022; Lewis vd., 1995). Bununla birlikte nöropatik ağrı gibi kronik ağrı

modellerinde P2X3 reseptörlerinin ekspresyonunun arttığı ve P2X3 reseptörlerinin inaktive edilmesinin ağrı iletimini baskıladığı gösterilmiştir (Dong vd., 2022). Migrenle ilişkili olarak yapılan bir çalışmada CGRP'nin sıçan meningeal preparatlarında ve trigeminal nöron kültürlerinde ATP sentezini artırdığı ve böylece P2X3 reseptörlerini aktive ederek trigeminovasküler sistemden nosiseptif ateşlemeyi indükleyebildiği gösterilmiştir (Yegutkin vd., 2016). Ayrıca aynı çalışmada, α,β -meATP ile P2X3 reseptörleri aktivasyonunun migren ağrı yolağındaki meningeal trigeminal afferentlerde nosiseptif ateşlemeyi tetiklediği gösterildi (Yegutkin vd., 2016). Sunulan çalışmada ise spinorfinin in vivo deney gruplarında nosisepsiyonu inhibe ettiğini ve hem in vivo hem de ex vivo deneylerde CGRP salınımını baskıladığını gösterdik. Spinorfinin bu etkilerinde P2X3 reseptörleri üzerindeki antagonist etkisinin de katkısı olmuş olabilir. Öte yandan nalmeferen kullanarak spinorfinin bu etkilerinin büyük ölçüde opioid reseptörleri aracılığıyla gerçekleştiğini doğruladık ancak spinorfinin P2X3 reseptörlerini antagonize edici etkisinin migrendeki bu anti-nosiseptif etkisine katkısının ne düzeyde olduğu aydınlatılması gereken bir ayrıntıdır. Sonuçta spinorfin hem enkefalin ve opioid reseptör aktivitesini artırarak hem de P2X3 reseptörlerine antagonist etki ederek CGRP salınımını ve nosisepsiyonu inhibe etmiş olabilir.

Migren patogeneğinde mast hücre degranülasyonunun önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Mast hücreleri dura materde özellikle kan damarları ve trigeminal nosiseptif nöronlara yakın olarak bol miktarda bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda trigeminovasküler sistemin nosiseptif liflerinin aktiflenmesiyle salınan CGRP ve SP gibi nöropeptitlerin hemen yakında bulunan mast hücrelerinde degranülasyona neden olduğu bildirilmiştir. Mast hücreleri degranüle olduklarında lokal inflamasyonu tetikleyebilen inflamatuvar mediyatörler salgılamaktadır. Mast hücre degranülasyonu sonucunda salınan inflamatuvar mediyatörler nörojenik inflamasyona ve nosiseptif liflerin uzun süreli aktivasyonuna neden olarak migren baş ağrısını tetikliyor gibi görünmektedir (Levy vd., 2007; H. Xu vd., 2020). Deneysel çalışmalarda migren modeli oluşturmak amacıyla sıçanlara NTG uygulanması meningeal mast hücrelerinin degranülasyonunu tetiklemekte buna karşın migren tedavisinde kullanılan sumatriptan uygulaması ise NTG'in neden olduğu mast hücre degranülasyonundaki artışı engellemektedir (Pedersen vd., 2015; Kilinc vd., 2020, 2024; Torun vd., 2024). Yaptığımız çalışmada da NTG uygulanan sıçanlarda meningeal mast hücrelerinin hem sayısı hemde

degranülasyonu kontrollere göre arttı. Sumatriptan ise sıçanlarda NTG'in neden olduğu mast hücre degranülasyonu ve sayısındaki artışı baskıladı. Meningeal mast hücrelerinin migrenle ilişkili rolünü destekleyen bu bulgular literatürle uyumludur. Bununla birlikte mast hücre degranüle edici bir ajanın sıçanlara uygulanmasıyla oluşan meningeal mast hücre degranülasyonunun migren patogenezindeki yapılar olan meningeal nosiseptörlerde uzun süreli aktivasyona neden olduğu deneysel bir çalışmada gösterilmiştir (Levy vd., 2007). Bu çalışmalar meningeal mast hücrelerinin degranülasyonu sonucunda salınan içeriklerinin migren baş ağrısının oluşum sürecinde önemli katkı sağlayabileceğini ve migrenin patogenezi ile tedavisine yönelik çalışmalarda mast hücrelerine de odaklanılması gerektiğini göstermektedir.

Sunulan çalışmada spinorfin in vivo migren modelinde NTG kaynaklı meningeal mast hücre degranülasyonundaki artışı engellemiştir. Bu durum spinorfinin in vivo deneylerde mekanik hiperaljezi, CGRP ve c-Fos ekspresyonunu inhibe etmesinde mast hücre aktivasyonunu baskılamasının katkısının olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bunlardan hangisinin önce gerçekleştiği ve ana etkenin hangisi olduğu çok açık değildir. Yaptığımız çalışma spinorfinin mast hücre degranülasyonu üzerine inhibe edici etkisinin gösterilmesi açısından ayrıca önemlidir. Spinorfinin mast hücre aktivasyonunu baskılaması antiinflamatuvar etkisinin olduğunu göstermektedir. Yamamoto ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada spinorfinin farelerdeki akut inflamasyon modelinde nötrofil birikimini inhibe edebildiğini göstermesi ve başka bir çalışmada ise spinorfinin bir kemotaktik faktör ile uyarılmış olan insan nötrofillerinin inflamatuvar tepkilerini azalttığını göstermesi bu anlamda önemli bulgulardır (Y. Yamamoto vd., 1997, 1998). Spinorfin ve onun gibi doğal enkefalinaz inhibitörleri olan sialorfin ve opiorfinin farelerdeki deneysel kolit üzerinde antiinflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir (Kamysz vd., 2016; Luo vd., 2022; Sařaga vd., 2017; Sobocí Nska vd., 2020). Bu çalışmalarla uyumlu olarak yaptığımız çalışmada spinorfin mast hücre degranülasyonunu baskılayarak antiinflamatuvar etki gösterdi ve bu etki opioid sistem modülasyonu aracılığıyla gerçekleşti. Spinorfinin mast hücre aktivasyonu üzerine inhibitör etkisinin gösterilmesi ve bunun migren patogenezinin önemli bir bileşeni olan nörojenik inflamasyonu önlemede etkili bir yaklaşım olabileceğinin ortaya konulması çalışmanın önemli sonuçlarındandır.



Şekil 4.1. NTG ile oluşturulan migren modelinde Spinorfin'in etkilerinin şematik gösterimi.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada spinorfinin in vivo deneysel migren modellerinde NTG ile uyarılan hiperaleji, beyin sapı c-Fos ekspresyonu, trigeminal gangliyon ve beyin sapı TNC'de CGRP salımı ve meningeal mast hücre degranülasyonu üzerine inhibitör etkisi gösterilmiştir. Ayrıca ex vivo deneysel preparatlarda trigeminal sinirin meninksleri innerve eden primer afferentlerinden kapsaisin aracılığıyla uyarılan CGRP salınımını da inhibe ettiği gösterilmiştir. Spinorfin deneysel migren modellerinde sumatriptana benzer olarak ortaya çıkardığı bu etkilerinden dolayı migrenin tedavisinde fayda sağlayabilecek etkili bir ajan olma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte sunulan çalışma spinorfinin endojen opioid sistem modülasyonu aracılığıyla migren belirtilerini baskılayabildiğinin gösterildiği ilk çalışma olması bakımından literatüre önemli katkı sağlamaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Migrenin in vivo deneysel modelinde sıçanlara uygulanan NTG trigeminovasküler aktivasyona neden olarak mekanik nosiseptif eşiği azalttı. Beyin sapı c-Fos ekspresyonunu artırdı. Trigeminal gangliyon ve beyin sapında CGRP salınımını artırdı. Meningeal mast hücrelerinin degranülasyonunu artırdı.
- Migrenin tedavisinde kullanılan ilaçlardan sumatriptan in vivo deneylerde NTG'in neden olduğu etkilerin tamamını tersine çevirdi.
- Doğal enkefalinaz inhibitörü olan spinorfin migrenin in vivo deneysel modelinde NTG ile uyarılan mekanik hiperaljezi, beyin sapı c-Fos ekspresyonu, beyin sapı ve trigeminal gangliyon CGRP salımı ve meningeal mast hücre degranülasyonu seviyelerindeki artışları önemli ölçüde azalttı.
- Opioid reseptör antagonisti olan nalmefen in vivo deneylerde spinorfinin neden olduğu etkileri önemli ölçüde ortadan kaldırdı ve böylece spinorfinin bu etkilerini endojen opioid sistem aktivitesini artırarak gerçekleştirdiğini doğruladı.
- Kapsaisin ex vivo hemiskull preparatlarda trigeminal nosiseptif afferentlerden CGRP salımını artırdı.
- Spinorfin ex vivo hemiskull preparatlarında kapsaisin tarafından indüklenen CGRP salınımındaki artışı önemli ölçüde azalttı. Sumatriptan pozitif kontrol olarak kapsaisin tarafından indüklenen CGRP salınımındaki artışı önemli ölçüde azalttı. Spinorfin ile sumatriptanın birlikte uygulanması tek tek uygulamalarından daha güçlü etki gösterdi.
- Spinorfinin migren patogenezinin temel yapısı olan trigeminovasküler sistemden CGRP salımını engellemesi migrende önemli düzeyde tedavi potansiyeline sahip olduğunu gösterdi.
- Spinorfinin in vivo deneylerde meningeal mast hücre degranülasyonunu engellemesi migren patogenezinin bir parçası olan nörojenik inflamasyonu baskılamada önemli bir ajan olabileceğini göstermektedir.
- Doğal enkefalinaz inhibitörü olan spinorfinin in vivo ve ex vivo deneylerde ortaya çıkardığı etkiler endojen opioid sistem bileşenlerinin migren baş ağrısının tedavisinde fayda sağlayabilen önemli hedefler olduğunu göstermektedir.

- Spinorfinin P2X3 reseptörleri üzerine olan antagonist etkisinin deneysel migren modellerinde araştırılması terapötik etkinliğe dair farklı mekanizmaları aydınlayabilir.
- Spinorfinin etkilerinin ileride migrenin kortikal yayılan depresyon modelinde de çalışılması ile spinorfinin migren aurasına karşı etkili olup olmadığı konusunda değerli bilgiler sunacaktır.
- Mevcut çalışmada akut migren modeli kullanılmış olup ileride spinorfinin kronik migren modellerinde etkisinin değerlendirilmesi ile kronik migrendeki olası terapötik etkinliği hakkında değerli bilgiler sağlayacaktır.
- Bu modellere ek olarak diğer migren modelleri olan inflamatuvar çorba ve suction electrode tekniği gibi farklı migren modellerinde spinorfinin etkinliğinin test edilmesi etki yelpazesinin ne kadar geniş olduğunun anlaşılmasına ve migrendeki terapötik etkisinin daha fazla doğrulanmasına katkıda bulunacaktır.
- Spinorfinin ve endojen opioid sistem modülasyonunun migren modelindeki terapötik etkilerinin gösterildiği çalışmamız bu konuda yapılacak olan daha ileri çalışmalar için temel oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abrimian, A., Kraft, T., & Pan, Y.-X. (2021). Endogenous Opioid Peptides and Alternatively Spliced Mu Opioid Receptor Seven Transmembrane Carboxyl-Terminal Variants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3779. <https://doi.org/10.3390/ijms22073779>
- Ahn, A. H., & Basbaum, A. I. (2005). Where do triptans act in the treatment of migraine? *Pain*, 115(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.03.008>
- Akerman, S., Romero-Reyes, M., Karsan, N., Bose, P., Hoffmann, J. R., Holland, P. R., & Goadsby, P. J. (2021). Therapeutic targeting of nitroglycerin-mediated trigeminovascular neuronal hypersensitivity predicts clinical outcomes of migraine abortives. *Pain*, 162(5), 1567–1577. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002142>
- Al-Hasani, R., & Bruchas, M. R. (2011). Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-dependent Signaling and Behavior. *Anesthesiology*, 115(6), 1363–1381. <https://doi.org/10.1097/ALN.0B013E318238BBA6>
- Al-Hassany, L., Goadsby, P. J., Danser, A. H. J., & MaassenVanDenBrink, A. (2022). Calcitonin gene-related peptide-targeting drugs for migraine: how pharmacology might inform treatment decisions. *The Lancet Neurology*, 21(3), 284–294. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00409-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00409-9)
- Albert-Vartanian, A., Boyd, M. R., Hall, A. L., Morgado, S. J., Nguyen, E., Nguyen, V. P. H., Patel, S. P., Russo, L. J., Shao, A. J., & Raffa, R. B. (2016). Will peripherally restricted kappa-opioid receptor agonists (pKORAs) relieve pain with less opioid adverse effects and abuse potential? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 41(4), 371–382. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12404>
- Amiri, P., Kazeminasab, S., Nejadghaderi, S. A., Mohammadinasab, R., Pourfathi, H., Araj-Khodaie, M., Sullman, M. J. M., Kolahi, A. A., & Safiri, S. (2021). Migraine: A Review on Its History, Global Epidemiology, Risk Factors, and Comorbidities. *Frontiers in Neurology*, 12, 800605. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2021.800605>
- Andreev, Y. A., Vassilevski, A. A., & Kozlov, S. A. (2012). Molecules to selectively target receptors for treatment of pain and neurogenic inflammation. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, 6(1), 35–45. <https://doi.org/10.2174/187221312798889266>
- Aparicio, L., Fierro, L., Abreu, A., Cárdenas, T., Durán, R., Denes, M., Current, al, Yasbeth Lara Aparicio, S., de Jesús Laureani Fierro, Á., Emiliano Aranda Abreu, G., Toledo Cárdenas, R., Isauro García Hernández, L., Alfonso Coria Ávila, G., Rojas Durán, F., Elena Hernández Aguilar, M., Manzo Denes, J., Donají Chi-Castañeda, L., & Antonio Pérez Estudillo, C. (2022). Current Opinion on the Use of c-Fos in Neuroscience. *NeuroSci 2022, Vol. 3, Pages 687-702*, 3(4), 687–702. <https://doi.org/10.3390/NEUROSCI3040050>
- Asghar, M. S., Hansen, A. E., Amin, F. M., Van Der Geest, R. J., Koning, P. Van Der, Larsson, H. B. W., Olesen, J., & Ashina, M. (2011). Evidence for a vascular factor in migraine. *Annals of Neurology*, 69(4), 635–645. <https://doi.org/10.1002/ANA.22292>
- Ashina, M., Buse, D. C., Ashina, H., Pozo-Rosich, P., Peres, M. F. P., Lee, M. J., Terwindt, G. M., Halker Singh, R., Tassorelli, C., Do, T. P., Mitsikostas, D. D., & Dodick, D. W. (2021). Migraine: integrated approaches to clinical management and emerging treatments. *The Lancet*, 397(10283), 1505–1518. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32342-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32342-4)
- Auh, Q.-S., & Ro, J. Y. (2012). Effects of peripheral κ opioid receptor activation on inflammatory mechanical hyperalgesia in male and female rats. *Neuroscience Letters*, 524(2), 111–115. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.07.018>
- Ayar, A., Ozcan, M., Kuzgun, K. T., & Kalkan, O. F. (2015). Spinorphin inhibits membrane depolarization- and capsaicin-induced intracellular calcium signals in rat primary nociceptive

- dorsal root ganglion neurons in culture. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 35(6), 550–558. <https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1024850>
- Balcziaik, L. K., & Russo, A. F. (2022). Dural Immune Cells, CGRP, and Migraine. *Frontiers in Neurology*, 13, 874193. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2022.874193>
- Ballantyne, J. C., & Chavkin, C. (2020). Will biased ligands be the opioids of the future? *Pain*, 161(9), 1945–1948. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001913>
- Barnett, V., Twycross, R., Mihalyo, M., & Wilcock, A. (2014). Opioid Antagonists. *Journal of Pain and Symptom Management*, 47(2), 341–352. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2013.12.223>
- Bartsch, T., Akerman, S., & Goadsby, P. J. (2002). The ORL-1 (NOP1) receptor ligand nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) inhibits neurogenic dural vasodilatation in the rat. *Neuropharmacology*, 43(6), 991–998. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00148-X](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00148-X)
- Baun, M., Pedersen, M. H. F., Olesen, J., & Jansen-Olesen, I. (2012). Dural mast cell degranulation is a putative mechanism for headache induced by PACAP-38. *Cephalalgia*, 32(4), 337–345. https://doi.org/10.1177/0333102412439354/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0333102412439354-FIG3.JPEG
- Becerra, L., Bishop, J., Barmettler, G., Kainz, V., Burstein, R., & Borsook, D. (2017). Brain network alterations in the inflammatory soup animal model of migraine. *Brain Research*, 1660, 36–46. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2017.02.001>
- Belluzzi, J. D., Grant, N., Garsky, V., Sarantakis, D., Wise, C. D., & Stem, L. (1976). Analgesia induced in vivo by central administration of enkephalin in rat. *Nature*, 260(5552), 625–626. <https://doi.org/10.1038/260625a0>
- Benarroch, E. E. (2012). Endogenous opioid systems: Current concepts and clinical correlations. *Neurology*, 79(8), 807–814. <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E3182662098/ASSET/AA0FA35B-AF54-45E4-B3F1-344F3A13D45A/ASSETS/GRAPHIC/ZNL03212-0243-T01.JPEG>
- Berezniuk, I., & Fricker, L. D. (2011). Endogenous Opioids. In *The Opiate Receptors* (pp. 93–120). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-993-2_5
- Berthiaume, S., Abdallah, K., Blais, V., & Gendron, L. (2020). Alleviating pain with delta opioid receptor agonists: evidence from experimental models. *Journal of Neural Transmission*, 127(4), 661–672. <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02172-4>
- Bohár, Z., Fejes-Szabó, A., Tar, L., Varga, H., Tajti, J., Párdutz, Á., & Vécsei, L. (2013). Evaluation of c-Fos immunoreactivity in the rat brainstem nuclei relevant in migraine pathogenesis after electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neurological Sciences*, 34(9), 1597–1604. <https://doi.org/10.1007/S10072-013-1292-1/FIGURES/5>
- Bolay, H., Reuter, U., Dunn, A. K., Huang, Z., Boas, D. A., & Moskowitz, M. A. (2002). Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nature Medicine* 2002 8:2, 8(2), 136–142. <https://doi.org/10.1038/nm0202-136>
- Börner, C., Lanciotti, S., Koch, T., Höllt, V., & Kraus, J. (2013). Mu opioid receptor agonist-selective regulation of interleukin-4 in T lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 263(1–2), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.07.012>
- Bourinet, E., Soong, T. W., Stea, A., & Snutch, T. P. (1996). Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(4), 1486–1491. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.4.1486>
- Brackley, A. D., Sarrami, S., Gomez, R., Guerrero, K. A., & Jeske, N. A. (2017). Identification of a signaling cascade that maintains constitutive δ -opioid receptor incompetence in peripheral sensory neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 292(21), 8762–8772.

- Brain, S. D., & Grant, A. D. (2004). Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiological Reviews*, 84(3), 903–934. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00037.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0030403120004.JPEG>
- Biscini, L., Corradini, L., Ongini, E., & Bertorelli, R. (2002). Up-regulation of ORL-1 receptors in spinal tissue of allodynic rats after sciatic nerve injury. *European Journal of Pharmacology*, 447(1), 59–65. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01833-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01833-2)
- Bruchas, M. R., Land, B. B., & Chavkin, C. (2010). The dynorphin/kappa opioid system as a modulator of stress-induced and pro-addictive behaviors. *Brain Research*, 1314, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.08.062>
- Bullitt, E. (1990). Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 296(4), 517–530. <https://doi.org/10.1002/CNE.902960402>
- Burgos-Vega, C., Moy, J., & Dussor, G. (2015). Meningeal Afferent Signaling and the Pathophysiology of Migraine. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 131, 537–564. <https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2015.01.001>
- Burstein, R., & Jakubowski, M. (2005). Unitary hypothesis for multiple triggers of the pain and strain of migraine. *Journal of Comparative Neurology*, 493(1), 9–14. <https://doi.org/10.1002/CNE.20688>
- Burstein, R., Jakubowski, M., Garcia-Nicas, E., Kainz, V., Bajwa, Z., Hargreaves, R., Becerra, L., & Borsook, D. (2010). Thalamic sensitization transforms localized pain into widespread allodynia. *Annals of Neurology*, 68(1), 81–91. <https://doi.org/10.1002/ANA.21994>
- Burstein, R., Nosedá, R., & Borsook, D. (2015). Migraine: Multiple Processes, Complex Pathophysiology. *Journal of Neuroscience*, 35(17), 6619–6629. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0373-15.2015>
- Burstein, R., Yarnitsky, D., Goor-Aryeh, I., Ransil, B. J., & Bajwa, Z. H. (2000). An Association between Migraine and Cutaneous Allodynia. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200005\)47:5](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200005)47:5)
- Busserolles, J., Lolignier, S., Kerckhove, N., Bertin, C., Authier, N., & Eschalier, A. (2020). Replacement of current opioid drugs focusing on MOR-related strategies. *Pharmacology & Therapeutics*, 210, 107519. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107519>
- Butler, R. K., & Finn, D. P. (2009). Stress-induced analgesia. *Progress in Neurobiology*, 88(3), 184–202. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2009.04.003>
- Buzzi, M. G., Dimitriadou, V., Theoharides, T. C., & Moskowitz, M. A. (1992). 5-Hydroxytryptamine receptor agonists for the abortive treatment of vascular headaches block mast cell, endothelial and platelet activation within the rat dura mater after trigeminal stimulation. *Brain Research*, 583(1–2), 137–149. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(10\)80017-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(10)80017-4)
- Buzzi, M. G., Moskowitz, M. A., Peroutka, S. J., & Byun, B. (1991). Further characterization of the putative 5-HT receptor which mediates blockade of neurogenic plasma extravasation in rat dura mater. *British Journal of Pharmacology*, 103(2), 1421–1428. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1991.TB09805.X>
- Cahill, C. M., Lueptow, L., Kim, H., Shusharla, R., Bishop, A., & Evans, C. J. (2021). *Kappa Opioid Signaling at the Crossroads of Chronic Pain and Opioid Addiction* (pp. 315–350). https://doi.org/10.1007/164_2021_434
- Cakmak, E. (2021). Study of the effects of spinorphin on painful diabetic neuropathy: A behavioral study in vivo. *Annals of Clinical and Analytical Medicine*, 12(02), 208–211.

<https://doi.org/10.4328/ACAM.20475>

- Calzà, L., Pozza, M., Zanni, M., Manzini, C., Manzini, E., & Hökfelt, T. (1997). Peptide plasticity in primary sensory neurons and spinal cord during adjuvant-induced arthritis in the rat: an immunocytochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience*, 82(2), 575–589. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00272-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00272-8)
- Cansız, D., Emekli-Alturfan, E., & Ata Alturfan, A. (2021). Endojen Opioidlerin Ağrı Mekanizması Üzerine Etkileri. *Experimed*, 11(1), 49–56. <https://doi.org/10.26650/EXPERIMED.2021.884254>
- Capuano, A., Curró, D., Russo, C. Dello, Tringali, G., Pozzoli, G., Trapani, G. Di, & Navarra, P. (2007). Nociceptin (1–13)NH₂ Inhibits Stimulated Calcitonin-Gen-Related-Peptide Release From Primary Cultures of Rat Trigeminal Ganglia Neurons. *Cephalalgia*, 27(8), 868–876. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2007.01354.x>
- Capuano, A., Greco, M. C., Navarra, P., & Tringali, G. (2014). Correlation between algogenic effects of calcitonin-gene-related peptide (CGRP) and activation of trigeminal vascular system, in an in vivo experimental model of nitroglycerin-induced sensitization. *European Journal of Pharmacology*, 740, 97–102. <https://doi.org/10.1016/J.EJP.2014.06.046>
- Carlino, E., Pollo, A., & Benedetti, F. (2011). Placebo analgesia and beyond: A melting pot of concepts and ideas for neuroscience. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 24(5), 540–544. <https://doi.org/10.1097/ACO.0B013E328349D0C2>
- Cernuda-Morollón, E., Larrosa, D., Ramón, C., Vega, J., Martínez-Camblor, P., & Pascual, J. (2013). Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine. *Neurology*, 81(14), 1191–1196. https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E3182A6CB72/SUPPL_FILE/CARNUDA_1191.PDF
- Charles, A. (2013). The Evolution of a Migraine Attack – A Review of Recent Evidence. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 53(2), 413–419. <https://doi.org/10.1111/HEAD.12026>
- Charles, A. (2018). The Migraine Aura. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*, 24(4-Headache), 1009–1022. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000627>
- Charles, A., & Pozo-Rosich, P. (2019). Targeting calcitonin gene-related peptide: a new era in migraine therapy. *The Lancet*, 394(10210), 1765–1774. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32504-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32504-8)
- Charles, A., & Pradhan, A. A. (2016). Delta-opioid receptors as targets for migraine therapy. *Current Opinion in Neurology*, 29(3), 314–319. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000311>
- Chavkin, C. (2013). Dynorphin--still an extraordinarily potent opioid peptide. *Molecular Pharmacology*, 83(4), 729–736. <https://doi.org/10.1124/mol.112.083337>
- Chen, Y., & Sommer, C. (2006). Nociceptin and its receptor in rat dorsal root ganglion neurons in neuropathic and inflammatory pain models: implications on pain processing. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 11(3), 232–240. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2006.0093.x>
- Chiu, I. M., Von Hehn, C. A., & Woolf, C. J. (2012). Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nature Neuroscience* 2012 15:8, 15(8), 1063–1067. <https://doi.org/10.1038/nn.3144>
- Choi, H. Y., & Lee, C.-H. (2019). Can Beta-Endorphin Be Used as a Biomarker for Chronic Low Back Pain? A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Pain Medicine*, 20(1), 28–36. <https://doi.org/10.1093/pm/pny186>
- Citak, A., Kilinc, E., Torun, I. E., Ankarali, S., Dagistan, Y., & Yoldas, H. (2022). The effects of certain TRP channels and voltage-gated KCNQ/Kv7 channel opener retigabine on calcitonin gene-related peptide release in the trigeminovascular system. *Cephalalgia*, 42(13), 1375–

1386.

https://doi.org/10.1177/03331024221114773/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_03331024221114773-FIG5.JPEG

- Close, L. N., Eftekhari, S., Wang, M., Charles, A. C., & Russo, A. F. (2019). Cortical spreading depression as a site of origin for migraine: Role of CGRP. *Cephalalgia*, 39(3), 428–434. https://doi.org/10.1177/0333102418774299/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0333102418774299-FIG1.JPEG
- Coles, J. A., Myburgh, E., Brewer, J. M., & McMenamin, P. G. (2017). Where are we? The anatomy of the murine cortical meninges revisited for intravital imaging, immunology, and clearance of waste from the brain. *Progress in Neurobiology*, 156, 107–148. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2017.05.002>
- Commons, K. G. (2003). Translocation of presynaptic delta opioid receptors in the ventrolateral periaqueductal gray after swim stress. *Journal of Comparative Neurology*, 464(2), 197–207. <https://doi.org/10.1002/cne.10788>
- Corder, G., Castro, D. C., Bruchas, M. R., & Scherrer, G. (2018). Endogenous and exogenous opioids in pain. *Annual Review of Neuroscience*, 41(Volume 41, 2018), 453–473. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-080317-061522/CITE/REFWORKS>
- Corradini, L., Briscini, L., Ongini, E., & Bertorelli, R. (2001). The putative OP4 antagonist, [Nphe1]nociceptin(1-13)NH₂, prevents the effects of nociceptin in neuropathic rats. *Brain Research*, 905(1–2), 127–133. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02520-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02520-3)
- Courteix, C., Coudoré-Civiale, M.-A., Privat, A.-M., Pélissier, T., Eschalier, A., & Fialip, J. (2004). Evidence for an exclusive antinociceptive effect of nociceptin/orphanin FQ, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, in two animal models of neuropathic pain. *Pain*, 110(1), 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.03.037>
- Cox, B. M., Christie, M. J., Devi, L., Toll, L., & Traynor, J. R. (2015). Challenges for opioid receptor nomenclature: IUPHAR Review 9. *British Journal of Pharmacology*, 172(2), 317–323. <https://doi.org/10.1111/bph.12612>
- Cullen, J. M., & Cascella, M. (2024). *Physiology, Enkephalin*.
- Curran, T., MacConnell, W. P., Straaten, F. van, & Verma, I. M. (1983). Structure of the FBJ Murine Osteosarcoma Virus Genome: Molecular Cloning of Its Associated Helper Virus and the Cellular Homolog of the v-fos Gene from Mouse and Human Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 3(5), 914–921. <https://doi.org/10.1128/MCB.3.5.914-921.1983>
- Curran, T., & Teich, N. M. (1982). Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: characterization of a 55,000-dalton phosphoprotein. *Journal of Virology*, 42(1), 114–122. <https://doi.org/10.1128/JVI.42.1.114-122.1982>
- da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C., & Oliver, C. (2014). Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 62(10), 698–738. https://doi.org/10.1369/0022155414545334/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1369_0022155414545334-FIG2.JPEG
- Darcq, E., & Kieffer, B. L. (2018). Opioid receptors: drivers to addiction? *Nature Reviews Neuroscience*, 19(8), 499–514. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0028-x>
- DaSilva, A. F., Nascimento, T. D., DosSantos, M. F., Lucas, S., van Holsbeeck, H., DeBoer, M., Maslowski, E., Love, T., Martikainen, I. K., Koeppe, R. A., Smith, Y. R., & Zubieta, J. K. (2014). μ -Opioid activation in the prefrontal cortex in migraine attacks – brief report I. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(6), 439–444. <https://doi.org/10.1002/ACN3.65>
- DaSilva, A. F., Nascimento, T. D., Love, T., DosSantos, M. F., Martikainen, I. K., Cummingford, C. M., DeBoer, M., Lucas, S. R., Bender, M. A., Koeppe, R. A., Hall, T., Petty, S., Maslowski, E., Smith, Y. R., & Zubieta, J.-K. (2014). 3D-Neuronavigation In Vivo Through a Patient's

Brain During a Spontaneous Migraine Headache. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 88, 50682. <https://doi.org/10.3791/50682>

de Lourdes Figuerola, M., Levin, G., Leston, J., & Barontini, M. (1997). Plasma met-enkephalin and catecholamine changes during the menstrual cycle and pain episode in menstrual migraine. *Functional Neurology*, 12(2), 69–75.

de Vries Lentsch, S., Verhagen, I. E., van den Hoek, T. C., MaassenVanDenBrink, A., & Terwindt, G. M. (2021). Treatment with the monoclonal calcitonin gene-related peptide receptor antibody erenumab: A real-life study. *European Journal of Neurology*, 28(12), 4194–4203. <https://doi.org/10.1111/ENE.15075>

Deng, H., Li, G. G., Nie, H., Feng, Y. Y., Guo, G. Y., Guo, W. L., & Tang, Z. P. (2020). Efficacy and safety of calcitonin-gene-related peptide binding monoclonal antibodies for the preventive treatment of episodic migraine - An updated systematic review and meta-analysis. *BMC Neurology*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12883-020-01633-3/FIGURES/7>

Descheemaeker, A., Poras, H., Wurm, M., Luccarini, P., Ouimet, T., & Dallel, R. (2022). Dual enkephalinase inhibitor PL37 as a potential novel treatment of migraine: evidence from a rat model. *Brain*, 145(8), 2664–2670. <https://doi.org/10.1093/brain/awac139>

Diener, H.-C., Charles, A., Goadsby, P. J., & Holle, D. (2015). New therapeutic approaches for the prevention and treatment of migraine. *The Lancet Neurology*, 14(10), 1010–1022. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00198-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00198-2)

Dodick, D., Lipton, R. B., Martin, V., Papademetriou, V., Rosamond, W., MaassenVanDenBrink, A., Loutfi, H., Welch, K. M., Goadsby, P. J., Hahn, S., Hutchinson, S., Matchar, D., Silberstein, S., Smith, T. R., Purdy, R. A., & Saiers, J. (2004). Consensus Statement: Cardiovascular Safety Profile of Triptans (5-HT_{1B/1D} Agonists) in the Acute Treatment of Migraine. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 44(5), 414–425. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2004.04078.x>

Dodick, D. W. (2018a). A Phase-by-Phase Review of Migraine Pathophysiology. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 58, 4–16. <https://doi.org/10.1111/HEAD.13300>

Dodick, D. W. (2018b). Migraine. *The Lancet*, 391(10127), 1315–1330. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30478-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30478-1)

Dong, C., Zhang, W., & Luo, H. (2022). Association between P2X3 receptors and neuropathic pain: As a potential therapeutic target for therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 113029. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113029>

DosSantos, M. F., Martikainen, I. K., Nascimento, T. D., Love, T. M., Deboer, M. D., Maslowski, E. C., Monteiro, A. A., Vincent, M. B., Zubieta, J. K., & DaSilva, A. F. (2012). Reduced basal ganglia μ -opioid receptor availability in trigeminal neuropathic pain: A pilot study. *Molecular Pain*, 8. https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-74/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1186_1744-8069-8-74-FIG2.JPEG

Dripps, I. J., Boyer, B. T., Neubig, R. R., Rice, K. C., Traynor, J. R., & Jutkiewicz, E. M. (2018). Role of signalling molecules in behaviours mediated by the δ opioid receptor agonist SNC80. *British Journal of Pharmacology*, 175(6), 891–901. <https://doi.org/10.1111/bph.14131>

Drissi, H., Lasmoles, F., Mellay, V. Le, Marie, P. J., & Lieberherr, M. (1998). Activation of phospholipase C- β 1 via G α (q/11) during calcium mobilization by calcitonin gene-related peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 20168–20174. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.32.20168/ASSET/D9B9C25B-A435-4D2E-9FBB-49864B0715E2/MAIN.ASSETS/GR9.JPG>

Duque-Díaz, E., Alvarez-Ojeda, O., & Coveñas, R. (2019). *Enkephalins and ACTH in the mammalian nervous system* (pp. 147–193). <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.05.001>

Dux, M., Rosta, J., Sántha, P., & Jancsó, G. (2009). Involvement of capsaicin-sensitive afferent

- nerves in the proteinase-activated receptor 2-mediated vasodilatation in the rat dura mater. *Neuroscience*, 161(3), 887–894. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.04.010>
- Dux, M., Sántha, P., & Jancsó, G. (2003). Capsaicin-sensitive neurogenic sensory vasodilatation in the dura mater of the rat. *Journal of Physiology*, 552(3), 859–867. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2003.050633>
- Edvinsson, L. (2018). The CGRP Pathway in Migraine as a Viable Target for Therapies. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 58, 33–47. <https://doi.org/10.1111/HEAD.13305>
- Edvinsson, L., Eftekhari, S., Salvatore, C. A., & Warfvinge, K. (2011). Cerebellar distribution of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its receptor components calcitonin receptor-like receptor (CLR) and receptor activity modifying protein 1 (RAMP1) in rat. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(1), 333–339. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2010.10.005>
- Edvinsson, L., Ekman, R., Jansen, I., McCulloch, J., & Uddman, R. (1987). Calcitonin Gene-Related Peptide and Cerebral Blood Vessels: Distribution and Vasomotor Effects. *Http://Dx.Doi.Org/10.1038/Jcbfm.1987.126*, 7(6), 720–728. <https://doi.org/10.1038/JCBFM.1987.126>
- Edvinsson, L., Haanes, K. A., Warfvinge, K., & Krause, D. N. (2018). CGRP as the target of new migraine therapies — successful translation from bench to clinic. *Nature Reviews Neurology*, 14(6), 338–350. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0003-1>
- Eftekhari, S., & Edvinsson, L. (2011). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its receptor components in human and rat spinal trigeminal nucleus and spinal cord at C1-level. *BMC Neuroscience*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-112/FIGURES/12>
- Eftekhari, S., Salvatore, C. A., Calamari, A., Kane, S. A., Tajti, J., & Edvinsson, L. (2010). Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human trigeminal ganglion. *Neuroscience*, 169(2), 683–696. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2010.05.016>
- Emery, M. A., & Akil, H. (2020). Endogenous Opioids at the Intersection of Opioid Addiction, Pain, and Depression: The Search for a Precision Medicine Approach. *Annual Review of Neuroscience*, 43(1), 355–374. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-110719-095912>
- Erdener, Ş. E., Kaya, Z., & Dalkara, T. (2021). Parenchymal neuroinflammatory signaling and dural neurogenic inflammation in migraine. *The Journal of Headache and Pain* 2021 22:1, 22(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S10194-021-01353-0>
- Ertsey, C., Hantos, M., Bozsik, G., & Tekes, K. (2005). Plasma Nociceptin Levels are Reduced in Migraine without Aura. *Cephalalgia*, 25(4), 261–266. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2004.00849.x>
- Evans, B. N., Rosenblatt, M. I., Mnayer, L. O., Oliver, K. R., & Dickerson, I. M. (2000). CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31438–31443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005604200>
- Farajdokht, F., Mohaddes, G., Shانهbandi, D., Karimi, P., & Babri, S. (2018). Ghrelin attenuated hyperalgesia induced by chronic nitroglycerin: CGRP and TRPV1 as targets for migraine management. *Cephalalgia*, 38(11), 1716–1730. https://doi.org/10.1177/0333102417748563/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0333102417748563-FIG6.JPG
- Färkkilä, M., Olesen, J., Dahlöf, C., Stovner, L., ter Brugge, J., Rasmussen, S., Muirhead, N., & Sikes, C. (2003). Eletriptan for the Treatment of Migraine in Patients with Previous Poor Response or Tolerance to Oral Sumatriptan. *Cephalalgia*, 23(6), 463–471. <https://doi.org/10.1046/j.1468-2982.2003.00554.x>
- Franck, J., & Jayaram-Lindström, N. (2013). Pharmacotherapy for alcohol dependence: status of

- current treatments. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(4), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.05.005>
- Fricker, L. D., Margolis, E. B., Gomes, I., & Devi, L. A. (2020). Five Decades of Research on Opioid Peptides: Current Knowledge and Unanswered Questions. *Molecular Pharmacology*, 98(2), 96–108. <https://doi.org/10.1124/mol.120.119388>
- Friedman, A., & Nabong, L. (2020). Opioids. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 31(2), 289–303. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2020.01.007>
- Gach-Janczak, K., Biernat, M., Kuczer, M., Adamska-Bartłomiejczyk, A., & Kluczyk, A. (2024). Analgesic Peptides: From Natural Diversity to Rational Design. *Molecules* 2024, Vol. 29, Page 1544, 29(7), 1544. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES29071544>
- Ganesh, C. B. (2021). The stress – Reproductive axis in fish: The involvement of functional neuroanatomical systems in the brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 112, 101904. <https://doi.org/10.1016/J.JCHEMNEU.2020.101904>
- García-Domínguez, M. (2024). Enkephalins and Pain Modulation: Mechanisms of Action and Therapeutic Perspectives. *Biomolecules*, 14(8), 926. <https://doi.org/10.3390/biom14080926>
- Gendron, L., Cahill, C. M., von Zastrow, M., Schiller, P. W., & Pineyro, G. (2016). Molecular Pharmacology of δ -Opioid Receptors. *Pharmacological Reviews*, 68(3), 631–700. <https://doi.org/10.1124/pr.114.008979>
- Geppetti, P., Rossi, E., Chiarugi, A., & Benemei, S. (2012). Antidromic vasodilatation and the migraine mechanism. *Journal of Headache and Pain*, 13(2), 103–111. <https://doi.org/10.1007/S10194-011-0408-3/FIGURES/1>
- Giffin, N. J., Ruggiero, L., Lipton, R. B., Silberstein, S. D., Tvedskov, J. F., Olesen, J., Altman, J., Goadsby, P. J., & Macrae, A. (2003). Premonitory symptoms in migraine: An electronic diary study. *Neurology*, 60(6), 935–940. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000052998.58526.A9/ASSET/F2B0D523-4EC3-4A30-96ED-E581BC196376/ASSETS/GRAPHIC/14FF5.JPEG>
- Giraldo, J. P., & Zarifkar, P. (2024). Migraine Headache. *Encyclopedia of Child and Adolescent Health, First Edition*, 1, 151–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818872-9.00149-7>
- Goadsby, P. J. (2000). The pharmacology of headache. *Progress in Neurobiology*, 62(5), 509–525. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00010-1)
- Goadsby, P. J., & Edvinsson, L. (1993). The trigeminovascular system and migraine: Studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Annals of Neurology*, 33(1), 48–56. <https://doi.org/10.1002/ANA.410330109>
- Goadsby, P. J., Edvinsson, L., & Ekman, R. (1988). Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system. *Annals of Neurology*, 23(2), 193–196. <https://doi.org/10.1002/ANA.410230214>
- Goadsby, P. J., Edvinsson, L., & Ekman, R. (1990). Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Annals of Neurology*, 28(2), 183–187. <https://doi.org/10.1002/ANA.410280213>
- Goadsby, P. J., Holland, P. R., Martins-Oliveira, M., Hoffmann, J., Schankin, C., & Akerman, S. (2017). Pathophysiology of Migraine: A Disorder of Sensory Processing. *Physiological Reviews*, 97(2), 553. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00034.2015>
- Goldfarb, A. H., & Jamurtas, A. Z. (1997). ??-Endorphin Response to Exercise. *Sports Medicine*, 24(1), 8–16. <https://doi.org/10.2165/00007256-199724010-00002>
- Green, M., Veltri, C., & Grundmann, O. (2024). Nalmefene Hydrochloride: Potential Implications for Treating Alcohol and Opioid Use Disorder. *Substance Abuse and Rehabilitation, Volume*

- Greenberg, M. E., Greene, L. A., & Ziff, E. B. (1985). Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 260(26), 14101–14110. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38689-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38689-1)
- Greenberg, M. E., & Ziff, E. B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 1984 311:5985, 311(5985), 433–438. <https://doi.org/10.1038/311433a0>
- Guan, L. C., Dong, X., & Green, D. P. (2023). Roles of mast cells and their interactions with the trigeminal nerve in migraine headache. *Molecular Pain*, 19. https://doi.org/10.1177/17448069231181358/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_17448069231181358-FIG2.JPEG
- Gupta, J., & Gaurkar, S. S. (2022). Migraine: An Underestimated Neurological Condition Affecting Billions. *Cureus*, 14(8). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.28347>
- Ha, D. K., Kim, M. J., Han, N., Kwak, J. H., & Baek, I. hwan. (2021). Comparative Efficacy of Oral Calcitonin-Gen-Related Peptide Antagonists for the Treatment of Acute Migraine: Updated Meta-analysis. *Clinical Drug Investigation*, 41(2), 119–132. <https://doi.org/10.1007/S40261-020-00997-1/FIGURES/8>
- Han, J. S., Adwanikar, H., Li, Z., Ji, G., & Neugebauer, V. (2010). Facilitation of synaptic transmission and pain responses by CGRP in the amygdala of normal rats. *Molecular Pain*, 6. https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-10/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1186_1744-8069-6-10-FIG6.JPEG
- Hansen, J. M., Hauge, A. W., Olesen, J., & Ashina, M. (2010). Calcitonin gene-related peptide triggers migraine-like attacks in patients with migraine with aura. *Cephalalgia*, 30(10), 1179–1186. https://doi.org/10.1177/0333102410368444/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0333102410368444-FIG2.JPEG
- Hargreaves, K. M., Schmidt, E. A., Mueller, G. P., & Dionne, R. A. (1987). Dexamethasone alters plasma levels of beta-endorphin and postoperative pain. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 42(6), 601–607. <https://doi.org/10.1038/clpt.1987.206>
- Hauge, A. W., Asghar, M. S., Schytz, H. W., Christensen, K., & Olesen, J. (2009). Effects of tonabersat on migraine with aura: a randomised, double-blind, placebo-controlled crossover study. *The Lancet Neurology*, 8(8), 718–723. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70135-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70135-8)
- Hay, D. L., Poyner, D. R., & Sexton, P. M. (2006). GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacology & Therapeutics*, 109(1–2), 173–197. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2005.06.015>
- Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). (2013). The international classification of headache disorders, (beta version). *Cephalalgia*, 33(9), 629–808.
- Heatley, R. V., Denburg, J. A., Bayer, N., & Bienenstock, J. (1982). Increased plasma histamine levels in migraine patients. *Clinical & Experimental Allergy*, 12(2), 145–149. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2222.1982.TB01633.X>
- Heinricher, M. M., McGaraughty, S., & Grandy, D. K. (1997). Circuitry Underlying AntiOpioid Actions of Orphanin FQ in the Rostral Ventromedial Medulla. *Journal of Neurophysiology*, 78(6), 3351–3358. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.6.3351>
- Herman, T. F., Cascella, M., & Muzio, M. R. (2024). Mu Receptors. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551554/>
- Higginbotham, J. A., Markovic, T., Massaly, N., & Morón, J. A. (2022). Endogenous opioid systems

- alterations in pain and opioid use disorder. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 16, 1014768. <https://doi.org/10.3389/FNSYS.2022.1014768/BIBTEX>
- Honda, M., Okutsu, H., Matsuura, T., Miyagi, T., Yamamoto, Y., Hazato, T., & Ono, H. (2001). Spinorphin, an Endogenous Inhibitor of Enkephalin-Degrading Enzymes, Potentiates Leu-Enkephalin-Induced Anti-allodynic and Antinociceptive Effects in Mice. *Japanese Journal of Pharmacology*, 87(4), 261–267. <https://doi.org/10.1254/JJP.87.261>
- HOSKIN, K. L., BULMER, D. C. E., LASALANDRA, M., JONKMAN, A., & GOADSBY, P. J. (2001). Fos expression in the midbrain periaqueductal grey after trigeminovascular stimulation. *The Journal of Anatomy*, 198(1), 29–35. <https://doi.org/10.1046/J.1469-7580.2001.19810029.X>
- Hosobuchi, Y., Adams, J. E., & Linchitz, R. (1977). Pain Relief by Electrical Stimulation of the Central Gray Matter in Humans and Its Reversal by Naloxone. *Science*, 197(4299), 183–186. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.301658>
- Hosokawa, S., Endoh, T., Shibukawa, Y., Tsumura, M., Ichikawa, H., Tazaki, M., & Furusawa, M. (2010). Calcitonin gene-related peptide- and adrenomedullin-induced facilitation of calcium current by different signal pathways in nucleus tractus solitarius. *Brain Research*, 1327, 47–55. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2010.02.006>
- Hou, M., Uddman, R., Tajti, J., & Edvinsson, L. (2003). Nociceptin immunoreactivity and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *Brain Research*, 964(2), 179–186. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)03927-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03927-6)
- Hunt, S. P., Pini, A., & Evan, G. (1987). Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 1987 328:6131, 328(6131), 632–634. <https://doi.org/10.1038/328632a0>
- Iyengar, S., Johnson, K. W., Ossipov, M. H., & Aurora, S. K. (2019). CGRP and the Trigeminal System in Migraine. *Headache*, 59(5), 659. <https://doi.org/10.1111/HEAD.13529>
- Janecka, A., Staniszevska, R., Gach, K., & Fichna, J. (2008). Enzymatic degradation of endomorphins. *Peptides*, 29(11), 2066–2073. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2008.07.015>
- Jung, K. Y., Moon, H. D., Lee, G. E., Lim, H.-H., Park, C.-S., & Kim, Y.-C. (2007). Structure–Activity Relationship Studies of Spinorphin as a Potent and Selective Human P2X₃ Receptor Antagonist. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(18), 4543–4547. <https://doi.org/10.1021/jm070114m>
- Jung, Y. H., Kim, Y. O., Lin, H., Cho, J.-H., Park, J.-H., Lee, S.-D., Bae, J., Kang, K. M., Kim, Y.-G., Pae, A. N., Ko, H., Park, C.-S., Yoon, M. H., & Kim, Y.-C. (2017). Discovery of Potent Antiallodynic Agents for Neuropathic Pain Targeting P2X₃ Receptors. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(7), 1465–1478. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.6b00401>
- Kajander, K. C., Sahara, Y., Iadarola, M. J., & Bennett, G. J. (1990). Dynorphin increases in the dorsal spinal cord in rats with a painful peripheral neuropathy. *Peptides*, 11(4), 719–728. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(90\)90187-A](https://doi.org/10.1016/0196-9781(90)90187-A)
- Kamysz, E., Sałaga, M., Sobocińska, M., Giełdoń, A., & Fichna, J. (2016). Anti-Inflammatory Effect of Novel Analogs of Natural Enkephalinase Inhibitors in a Mouse Model of Experimental Colitis. *Future Medicinal Chemistry*, 8(18), 2231–2243. <https://doi.org/10.4155/FMC-2016-0156>
- Kapitzke, D., Vetter, I., & Cabot, P. J. (2005). Endogenous opioid analgesia in peripheral tissues and the clinical implications for pain control. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 1(4), 279–297.
- Karatas, H., Erdener, S. E., Gursoy-Ozdemir, Y., Lule, S., Eren-Koçak, E., Sen, Z. D., & Dalkara, T. (2013). Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels.

Science, 339(6123). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1231897/SUPPL_FILE/KARATAS-SOM.PDF

- Kelman, L. (2006). The postdrome of the acute migraine attack. *Cephalalgia*, 26(2), 214–220. https://doi.org/10.1111/J.1468-2982.2005.01026.X/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1111_J.1468-2982.2005.01026.X-FIG1.JPEG
- Kelman, L., & Tanis, D. (2006). The relationship between migraine pain and other associated symptoms. *Cephalalgia*, 26(5), 548–553. https://doi.org/10.1111/J.1468-2982.2006.01075.X/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1111_J.1468-2982.2006.01075.X-FIG3.JPEG
- Khan, J., Asoom, L. I. Al, Sunni, A. Al, Rafique, N., Latif, R., Saif, S. Al, Almandil, N. B., Almohazey, D., AbdulAzeez, S., & Borgio, J. F. (2021). Genetics, pathophysiology, diagnosis, treatment, management, and prevention of migraine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111557. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.111557>
- Kibaly, C., Xu, C., Cahill, C. M., Evans, C. J., & Law, P.-Y. (2019). Non-nociceptive roles of opioids in the CNS: opioids' effects on neurogenesis, learning, memory and affect. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(1), 5–18. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0092-2>
- Kilinc, E., Ankarali, S., Torun, I. E., & Dagistan, Y. (2022). Receptor mechanisms mediating the anti-neuroinflammatory effects of endocannabinoid system modulation in a rat model of migraine. *European Journal of Neuroscience*, 55(4), 1015–1031. <https://doi.org/10.1111/EJN.14897>
- Kilinc, E., Tore, F., Dagistan, Y., & Bugdayci, G. (2020). Thymoquinone Inhibits Neurogenic Inflammation Underlying Migraine Through Modulation of Calcitonin Gene-Related Peptide Release and Stabilization of Meningeal Mast Cells in Glyceryltrinitrate-Induced Migraine Model in Rats. *Inflammation*, 43(1), 264–273. <https://doi.org/10.1007/S10753-019-01115-W/FIGURES/3>
- Kilinc, E., Torun, I. E., & Baranoglu Kilinc, Y. (2024). Meningeal mast cell-mediated mechanisms of cholinergic system modulation in neurogenic inflammation underlying the pathophysiology of migraine. *European Journal of Neuroscience*, 59(9), 2181–2192. <https://doi.org/10.1111/EJN.15888>
- Kilinc, E., Torun, I. E., Baranoglu Kilinc, Y., & Töre, F. (2025). Proposed receptor-mediated mechanisms of melatonin in nitroglycerin-induced migraine-like hyperalgesic conditions in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 136, 109800. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2024.109800>
- Kivell, B., & Prisinzano, T. E. (2010). Kappa opioids and the modulation of pain. *Psychopharmacology*, 210(2), 109–119. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1819-6>
- Knotkova, H., & Pappagallo, M. (2007). Imaging intracranial plasma extravasation in a migraine patient: A case report. *Pain Medicine*, 8(4), 383–387. https://doi.org/10.1111/J.1526-4637.2006.00197.X/2/PME_197_F2.JPEG
- Knyihár-Csillik, E., Tajti, J., Csillik, A. E., Chadaide, Z., Mihály, A., & Vécsei, L. (2000). Effects of eletriptan on the peptidergic innervation of the cerebral dura mater and trigeminal ganglion, and on the expression of c-fos and c-jun in the trigeminal complex of the rat in an experimental migraine model. *European Journal of Neuroscience*, 12(11), 3991–4002. <https://doi.org/10.1046/J.1460-9568.2000.00299.X>
- König, M., Zimmer, A. M., Steiner, H., Holmes, P. V., Crawley, J. N., Brownstein, M. J., & Zimmer, A. (1996). Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. *Nature*, 383(6600), 535–538. <https://doi.org/10.1038/383535a0>
- Kopruszinski, C. M., Navratilova, E., Swiokla, J., Dodick, D. W., Chessell, I. P., & Porreca, F. (2021). A novel, injury-free rodent model of vulnerability for assessment of acute and

- preventive therapies reveals temporal contributions of CGRP-receptor activation in migraine-like pain. *Cephalalgia*, 41(3), 305–317. <https://doi.org/10.1177/0333102420959794>
- Koyuncu Irmak, D., Kilinc, E., & Tore, F. (2019). Shared fate of meningeal mast cells and sensory neurons in migraine. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 448565. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00136/BIBTEX>
- Kraenzlin, M. E., Ch'ng, J. L. C., Mulderry, P. K., Ghatei, M. A., & Bloom, S. R. (1985). Infusion of a novel peptide, calcitonin gene-related peptide (CGRP) in man. Pharmacokinetics and effects on gastric acid secretion and on gastrointestinal hormones. *Regulatory Peptides*, 10(2–3), 189–197. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(85\)90013-8](https://doi.org/10.1016/0167-0115(85)90013-8)
- Kropotova, E. S., Ivleva, I. S., Karpenko, M. N., & Mosevitsky, M. I. (2020). Design of enkephalin modifications protected from brain extracellular peptidases providing long-term analgesia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28(1), 115184. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115184>
- Krug, G., Rathsack, R., Schöntube, E., & Schädlich, M. (1990). [The dynamics of beta-endorphins in plasma in the peri- and intraoperative phase of radical gynecologic surgery]. *Anaesthesiologie Und Reanimation*, 15(2), 101–106.
- Kulka, M., Sheen, C. H., Tancowny, B. P., Grammer, L. C., & Schleimer, R. P. (2008). Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology*, 123(3), 398. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2007.02705.X>
- Lassen, L. H., Haderslev, P. A., Jacobsen, V. B., Iversen, H. K., Sperling, B., & Olesen, J. (2002). CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia*, 22(1), 54–61. https://doi.org/10.1046/J.1468-2982.2002.00310.X/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1046_J.1468-2982.2002.00310.X-FIG2.JPEG
- Launer, L. J., Terwindt, G. M., & Ferrari, M. D. (1999). The prevalence and characteristics of migraine in a population-based cohort: The GEM study. *Neurology*, 53(3), 537–542. <https://doi.org/10.1212/WNL.53.3.537/ASSET/AD24F6FD-E4C7-4D08-9B5D-D79EC3F3C502/ASSETS/GRAPHIC/G3267F2.JPEG>
- Laurell, K., Artto, V., Bendtsen, L., Hagen, K., Häggström, J., Linde, M., Söderström, L., Tronvik, E., Wessman, M., Zwart, J. A., & Kallela, M. (2016). Premonitory symptoms in migraine: A cross-sectional study in 2714 persons. *Cephalalgia*, 36(10), 951–959. https://doi.org/10.1177/0333102415620251/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0333102415620251-FIG2.JPEG
- Lennerz, J. K., Rühle, V., Ceppa, E. P., Neuhuber, W. L., Bunnett, N. W., Grady, E. F., & Messlinger, K. (2008). Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system: Differences between peripheral and central CGRP receptor distribution. *Journal of Comparative Neurology*, 507(3), 1277–1299. <https://doi.org/10.1002/CNE.21607>
- Levy, D., Burstein, R., Kainz, V., Jakubowski, M., & Strassman, A. M. (2007). Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache. *Pain*, 130(1–2), 166–176. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2007.03.012>
- Levy, D., Jakubowski, M., & Burstein, R. (2004). Disruption of communication between peripheral and central trigeminovascular neurons mediates the antimigraine action of 5HT1B/1D receptor agonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12), 4274–4279. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0306147101>
- Levy, D., Labastida-Ramirez, A., & MaassenVanDenBrink, A. (2019). Current understanding of meningeal and cerebral vascular function underlying migraine headache. *Cephalalgia*, 39(13), 1606–1622. https://doi.org/10.1177/0333102418771350/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0333102418771350-FIG2.JPEG

- Levy, D., & Moskowitz, M. A. (2023). Meningeal Mechanisms and the Migraine Connection. *Annual Review of Neuroscience*, 46, 39–58. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-080422-105509>
- Levy, D., & Strassman, A. M. (2002). Mechanical response properties of A and C primary afferent neurons innervating the rat intracranial dura. *Journal of Neurophysiology*, 88(6), 3021–3031. <https://doi.org/10.1152/JN.00029.2002/ASSET/IMAGES/LARGE/9K1222738007.JPEG>
- Levy, D., & Strassman, A. M. (2004). Modulation of dural nociceptor mechanosensitivity by the nitric oxide-cyclic GMP signaling cascade. *Journal of Neurophysiology*, 92(2), 766–772. <https://doi.org/10.1152/JN.00058.2004/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9K0080440030004.JPG>
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G., & Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature*, 377(6548), 432–435. <https://doi.org/10.1038/377432a0>
- Liang, T. S., Gao, J.-L., Fatemi, O., Lavigne, M., Leto, T. L., & Murphy, P. M. (2001). The Endogenous Opioid Spinorphin Blocks fMet-Leu-Phe-Induced Neutrophil Chemotaxis by Acting as a Specific Antagonist at the N-Formylpeptide Receptor Subtype FPR. *The Journal of Immunology*, 167(11), 6609–6614. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6609>
- Lin, A. P., & Ko, M.-C. (2013). The Therapeutic Potential of Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Agonists as Analgesics without Abuse Liability. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(2), 214–224. <https://doi.org/10.1021/cn300124f>
- Lipton, R. B., Stewart, W. F., Diamond, S., Diamond, M. L., & Reed, M. (2001). Prevalence and Burden of Migraine in the United States: Data From the American Migraine Study II. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 41(7), 646–657. <https://doi.org/10.1046/J.1526-4610.2001.041007646.X>
- Liu, S. (Steve), Pickens, S., Burma, N. E., Ibarra-Lecue, I., Yang, H., Xue, L., Cook, C., Hakimian, J. K., Severino, A. L., Lueptow, L., Komarek, K., Taylor, A. M. W., Olmstead, M. C., Carroll, F. I., Bass, C. E., Andrews, A. M., Walwyn, W., Trang, T., Evans, C. J., ... Cahill, C. M. (2019). Kappa Opioid Receptors Drive a Tonic Aversive Component of Chronic Pain. *The Journal of Neuroscience*, 39(21), 4162–4178. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0274-19.2019>
- Liu, S., Shu, H., Crawford, J., & Tao, F. (2023). Trigeminal Dynorphin In Comorbid Temporomandibular Disorders And Migraine-Like Pain. *The Journal of Pain*, 24(4), 42. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2023.02.130>
- Llorca-Torrallba, M., Pilar-Cuellar, F., da Silva Borges, G., Mico, J. A., & Berrocoso, E. (2020). Opioid receptors mRNAs expression and opioids agonist-dependent G-protein activation in the rat brain following neuropathy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 99, 109857. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109857>
- Loder, E., Burch, R., & Rizzoli, P. (2012). The 2012 AHS/AAN Guidelines for Prevention of Episodic Migraine: A Summary and Comparison With Other Recent Clinical Practice Guidelines. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 52(6), 930–945. <https://doi.org/10.1111/J.1526-4610.2012.02185.X>
- Luo, P., Li, X., Gao, Y., Chen, Z., Zhang, Q., Wang, Z., & Tian, X. (2022). Central administration of human opiorphin alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice through activation of the endogenous opioid system. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.904926>
- Lutz, P. E., & Kieffer, B. L. (2013). Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends in Neurosciences*, 36(3), 195–206. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2012.11.002>

- Ma, F., Xie, H., Dong, Z.-Q., Wang, Y.-Q., & Wu, G.-C. (2003). Effect of intrathecal nocistatin on nociceptin/orphanin FQ analgesia in chronic constriction injury rat. *Brain Research*, 988(1–2), 189–192. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)03361-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)03361-4)
- Ma, F., Xie, H., Dong, Z.-Q., Wang, Y.-Q., & Wu, G.-C. (2005). Expression of ORL1 mRNA in some brain nuclei in neuropathic pain rats. *Brain Research*, 1043(1–2), 214–217. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.01.037>
- Mahmoudi, J., Mohaddes, G., Erfani, M., Sadigh-Eteghad, S., Karimi, P., Rajabi, M., Reyhani-Rad, S., & Farajdokht, F. (2018). Cerebrolysin attenuates hyperalgesia, photophobia, and neuroinflammation in a nitroglycerin-induced migraine model in rats. *Brain Research Bulletin*, 140, 197–204. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2018.05.008>
- Malan, P. T., Ossipov, M. H., Gardell, L. R., Ibrahim, M., Bian, D., Lai, J., & Porreca, F. (2000). Extraterritorial neuropathic pain correlates with multisegmental elevation of spinal dynorphin in nerve-injured rats. *Pain*, 86(1), 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(00\)00243-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(00)00243-8)
- Malick, A., Strassman, A. M., & Burstein, R. (2000). Trigeminothalamic and reticulohypothalamic tract neurons in the upper cervical spinal cord and caudal medulla of the rat. *Journal of Neurophysiology*, 84(4), 2078–2112. <https://doi.org/10.1152/JN.2000.84.4.2078>
- Mansour, A., Hoversten, M. T., Taylor, L. P., Watson, S. J., & Akil, H. (1995). The cloned μ , δ and κ receptors and their endogenous ligands: Evidence for two opioid peptide recognition cores. *Brain Research*, 700(1–2), 89–98. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00928-J](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00928-J)
- Markowitz, S., Saito, K., & Moskowitz, M. A. (1987). Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *Journal of Neuroscience*, 7(12), 4129–4136. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-12-04129.1987>
- Marquez, P., Nguyen, A. T., Hamid, A., & Lutfy, K. (2008). The endogenous OFQ/N/ORL-1 receptor system regulates the rewarding effects of acute cocaine. *Neuropharmacology*, 54(3), 564–568. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.11.003>
- Martínez-Cuevas, F. L., Cruz, S. L., & González-Espinosa, C. (2024). Methadone Requires the Co-Activation of μ -Opioid and Toll-Like-4 Receptors to Produce Extracellular DNA Traps in Bone-Marrow-Derived Mast Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4), 2137. <https://doi.org/10.3390/ijms25042137>
- Mason, B. N., Avona, A., Lackovic, J., & Dussor, G. (2021). Dural Stimulation and Periorbital von Frey Testing in Mice As a Preclinical Model of Headache. *Journal of Visualized Experiments*, 173. <https://doi.org/10.3791/62867>
- McLatchie, L. M., Fraser, N. J., Main, M. J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M. G., & Foord, S. M. (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998 393:6683, 393(6683), 333–339. <https://doi.org/10.1038/30666>
- Mei, H., Hu, Y., Kapadia, S., Ouimet, T., Poras, H., & Dussor, G. (2023). Efficacy of dual μ -opioid and calcitonin receptor-like receptor (CRLR) inhibition in a preclinical migraine model is mediated by activation of peripheral delta opioid receptors. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 63(5), 621–633. <https://doi.org/10.1111/head.14517>
- Messlinger, K. (2009). Migraine: where and how does the pain originate? *Experimental Brain Research* 2009 196:1, 196(1), 179–193. <https://doi.org/10.1007/S00221-009-1756-Y>
- Messlinger, K., Fischer, M. J. M., & Lennerz, J. K. (2011). Neuropeptide Effects in the Trigeminal System: Pathophysiology and Clinical Relevance in Migraine. *The Keio Journal of Medicine*, 60(3), 82–89. <https://doi.org/10.2302/KJM.60.82>
- Meßlinger, K., Hanesch, U., Baumgärtel, M., Trost, B., & Schmidt, R. F. (1993). Innervation of the dura mater encephali of cat and rat: ultrastructure and calcitonin gene-related peptide-like and

- substance P-like immunoreactivity. *Anatomy and Embryology*, 188(3), 219–237. <https://doi.org/10.1007/BF00188214/METRICS>
- Meunier, J.-C. (1997). Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *European Journal of Pharmacology*, 340(1), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01411-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01411-8)
- Meunier, J.-C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J.-L., Guillemot, J.-C., Ferrara, P., Monsarrat, B., Mazarguil, H., Vassart, G., Parmentier, M., & Costentin, J. (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*, 377(6549), 532–535. <https://doi.org/10.1038/377532a0>
- Mika, J., Obara, I., & Przewlocka, B. (2011). The role of nociceptin and dynorphin in chronic pain: Implications of neuro–glial interaction. *Neuropeptides*, 45(4), 247–261. <https://doi.org/10.1016/J.NPEP.2011.03.002>
- Mika, J., Rojewska, E., Makuch, W., & Przewlocka, B. (2010). Minocycline reduces the injury-induced expression of prodynorphin and pronociceptin in the dorsal root ganglion in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience*, 165(4), 1420–1428. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.064>
- Miller, S., Liu, H., Warfvinge, K., Shi, L., Dovlatyan, M., Xu, C., & Edvinsson, L. (2016). Immunohistochemical localization of the calcitonin gene-related peptide binding site in the primate trigeminovascular system using functional antagonist antibodies. *Neuroscience*, 328, 165–183. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2016.04.046/ASSET/C2F1B724-2A87-4D25-9824-46C31F57C015/MAIN.ASSETS/GR11.SML>
- Mitsikostas, D. D., & Sanchez del Rio, M. (2001). Receptor systems mediating c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis in animal models of migraine. *Brain Research Reviews*, 35(1), 20–35. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00048-5)
- Mitsikostas, D. D., Sanchez Del Rio, M., Waeber, C., Moskowitz, M. A., & Cutrer, F. M. (1998). The NMDA receptor antagonist MK-801 reduces capsaicin-induced c-fos expression within rat trigeminal nucleus caudalis. *Pain*, 76(1–2), 239–248. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(98\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(98)00051-7)
- Mizoguchi, H., Watanabe, C., Sakurada, T., & Sakurada, S. (2012). New vistas in opioid control of pain. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(1), 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.10.020>
- Mogil, J. ., Grisel, J. ., Reinscheid, R. ., Civelli, O., Belknap, J. ., & Grandy, D. . (1996). Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience*, 75(2), 333–337. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00338-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00338-7)
- Mogil, J. S., Grisel, J. E., Zhangs, G., Belknap, J. K., & Grandy, D. K. (1996). Functional antagonism of μ -, δ - and κ -opioid antinociception by orphanin FQ. *Neuroscience Letters*, 214(2–3), 131–134. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12917-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12917-7)
- Mohammed, N., Allam, H., Elghoroury, E., Zikri, E. N., Helmy, G. A., & Elgendy, A. (2018). Evaluation of serum beta-endorphin and substance P in knee osteoarthritis patients treated by laser acupuncture. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 15(2). <https://doi.org/10.1515/jcim-2017-0010>
- Mollaoğlu, M. (2013). Trigger factors in migraine patients. *Journal of Health Psychology*, 18(7), 984–994. <https://doi.org/10.1177/1359105312446773>
- Morgan, J. I., & Curran, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience*, 14(Volume 14, 1991), 421–451. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NE.14.030191.002225/CITE/REFWORKS>
- Moskowitz, M. A., Nozaki, K., & Kraig, R. P. (1993). Neocortical spreading depression provokes

- the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 13(3), 1167–1177. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-03-01167.1993>
- Mosnaim, A. D., Chevesich, J., Wolf, M. E., Freitag, F. G., & Diamond, S. (1986). Plasma Methionine Enkephalin. Increased Levels During a Migraine Episode. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 26(6), 278–281. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.1986.hed2606278.x>
- Mosnaim, A. D., Nguyen, T. D., Tse, R., Puente, J., Couceyro, P., & Wolf, M. E. (2008). In vitro methionine5-enkephalin degradation kinetics by human brain preparations. *Neurochemical Research*, 33(1), 81–86. <https://doi.org/10.1007/S11064-007-9418-6/FIGURES/2>
- Mosnaim, A. D., Wolf, M. E., Chevesich, J., Callaghan, O. H., & Diamond, S. (1985). Plasma Methionine Enkephalin Levels — A Biological Marker for Migraine? *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 25(5), 259–267. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.1985.hed2505259.x>
- Moye, L. S., Novack, M. L., Tipton, A. F., Krishnan, H., Pandey, S. C., & Pradhan, A. A. (2019). The development of a mouse model of mTBI-induced post-traumatic migraine, and identification of the delta opioid receptor as a novel therapeutic target. *Cephalalgia*, 39(1), 77–90. <https://doi.org/10.1177/0333102418777507>
- Moye, L. S., Siegersma, K., Dripps, I., Witkowski, W., Mangutov, E., Wang, D., Scherrer, G., & Pradhan, A. A. (2021). Delta opioid receptor regulation of calcitonin gene-related peptide dynamics in the trigeminal complex. *Pain*, 162(8), 2297–2308. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002235>
- Moye, L. S., Tipton, A. F., Dripps, I., Sheets, Z., Crombie, A., Violin, J. D., & Pradhan, A. A. (2019). Delta opioid receptor agonists are effective for multiple types of headache disorders. *Neuropharmacology*, 148, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.12.017>
- Murthy, K. S., & Makhlof, G. M. (1996). Opioid mu, delta, and kappa receptor-induced activation of phospholipase C-beta 3 and inhibition of adenylyl cyclase is mediated by Gi2 and G(o) in smooth muscle. *Molecular Pharmacology*, 50(4).
- Nascimento, T. D., DosSantos, M. F., Lucas, S., Holsbeeck, H., DeBoer, M., Maslowski, E., Love, T., Martikainen, I. K., Koeppe, R. A., Smith, Y. R., Zubieta, J., & DaSilva, A. F. (2014). μ - Opioid activation in the midbrain during migraine allodynia – brief report II. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(6), 445–450. <https://doi.org/10.1002/acn3.66>
- Nation, K. M., De Felice, M., Hernandez, P. I., Dodick, D. W., Neugebauer, V., Navratilova, E., & Porreca, F. (2018). Lateralized kappa opioid receptor signaling from the amygdala central nucleus promotes stress-induced functional pain. *Pain*, 159(5), 919–928. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001167>
- Negro, A., & Martelletti, P. (2019). Gepants for the treatment of migraine. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 28(6), 555–567. <https://doi.org/10.1080/13543784.2019.1618830>
- Nishimura, K., & Hazato, T. (1993a). [Spinorphin, a new inhibitor of enkephalin-degrading enzymes derived from the bovine spinal cord]. *Masui. The Japanese Journal of Anesthesiology*, 42(10), 1497–1503.
- Nishimura, K., & Hazato, T. (1993b). Isolation and Identification of an Endogenous Inhibitor of Enkephalin-Degrading Enzymes from Bovine Spinal Cord. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 194(2), 713–719. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1993.1880>
- Noble, F., Banisadr, G., Jardinaud, F., Popovici, T., Lai-Kuen, R., Chen, H., Bischoff, L., Parsadianiantz, S. M., Fournie-Zaluski, M.-C., & Roques, B. . (2001). First discrete autoradiographic distribution of aminopeptidase N in various structures of rat brain and spinal cord using the selective iodinated inhibitor [125I]RB 129. *Neuroscience*, 105(2), 479–488. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00185-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00185-3)

- Noble, F., Benturquia, N., Bilkei-Gorzo, A., Zimmer, A., & Roques, B. P. (2008). Use of preproenkephalin knockout mice and selective inhibitors of enkephalinases to investigate the role of enkephalins in various behaviours. *Psychopharmacology*, 196(2), 327–335. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0964-z>
- North, R. A., & Williams, J. T. (1985). On the potassium conductance increased by opioids in rat locus coeruleus neurones. *The Journal of Physiology*, 364(1), 265–280. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1985.SP015743>
- Nosedá, R., & Burstein, R. (2013). Migraine pathophysiology: Anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, cortical spreading depression, sensitization, and modulation of pain. *Pain*, 154(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2013.07.021>
- Nosedá, R., Jakubowski, M., Kainz, V., Borsook, D., & Burstein, R. (2011). Cortical Projections of Functionally Identified Thalamic Trigemino-vascular Neurons: Implications for Migraine Headache and Its Associated Symptoms. *Journal of Neuroscience*, 31(40), 14204–14217. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3285-11.2011>
- Nozaki, K., Boccalini, P., & Moskowitz, M. A. (1992). Expression of c-fos-like immunoreactivity in brainstem after meningeal irritation by blood in the subarachnoid space. *Neuroscience*, 49(3), 669–680. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90235-T](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90235-T)
- Nozaki, K., Moskowitz, M. A., & Boccalini, P. (1992). CP-93,129, sumatriptan, dihydroergotamine block c-fos expression within rat trigeminal nucleus caudalis caused by chemical stimulation of the meninges. *British Journal of Pharmacology*, 106(2), 409–415. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1992.tb14348.x>
- Nurkhametova, D., Kudryavtsev, I., Guselnikova, V., Serebryakova, M., Giniatullina, R. R., Wojciechowski, S., Tore, F., Rizvanov, A., Koistinaho, J., Malm, T., & Giniatullin, R. (2019). Activation of P2X7 receptors in peritoneal and meningeal mast cells detected by uptake of organic dyes: Possible purinergic triggers of neuroinflammation in meninges. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 429966. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00045/BIBTEX>
- Olesen, J. (2018). Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalgia: An International Journal of Headache*, 38(1), 1–211. <https://doi.org/10.1177/0333102417738202>
- Olesen, J., Friberg, L., Olsen, T. S., Iversen, H. K., Lassen, N. A., Andersen, A. R., & Karle, A. (1990). Timing and topography of cerebral blood flow, aura, and headache during migraine attacks. *Annals of Neurology*, 28(6), 791–798. <https://doi.org/10.1002/ANA.410280610>
- Ong, J. J. Y., & De Felice, M. (2018). Migraine Treatment: Current Acute Medications and Their Potential Mechanisms of Action. *Neurotherapeutics*, 15(2), 274–290. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0592-1>
- Ottosson, A., & Edvinsson, L. (1997). Release of Histamine from Dural Mast Cells by Substance P and Calcitonin Gene-Related Peptide. <https://doi.org/10.1046/j.1468-2982.1997.1703166.x>, 17(3), 166–174. <https://doi.org/10.1046/J.1468-2982.1997.1703166.X>
- Ozawa, A., Brunori, G., Cippitelli, A., Toll, N., Schoch, J., Kieffer, B. L., & Toll, L. (2018). Analysis of the distribution of spinal NOP receptors in a chronic pain model using NOP-eGFP knock-in mice. *British Journal of Pharmacology*, 175(13), 2662–2675. <https://doi.org/10.1111/bph.14225>
- Palmisano, M., Caputi, F. F., Mercatelli, D., Romualdi, P., & Candeletti, S. (2019). Dynorphinergic system alterations in the corticostriatal circuitry of neuropathic mice support its role in the negative affective component of pain. *Genes, Brain and Behavior*, 18(6). <https://doi.org/10.1111/gbb.12467>
- Parker, K. E., Sugiarto, E., Taylor, A. M. W., Pradhan, A. A., & Al-Hasani, R. (2020). Pain, Motivation, Migraine, and the Microbiome: New Frontiers for Opioid Systems and Disease. *Molecular Pharmacology*, 98(4), 433–444. <https://doi.org/10.1124/mol.120.119438>

- Pathan, H., & Williams, J. (2012). Basic opioid pharmacology: an update. *British Journal of Pain*, 6(1), 11–16. <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2049463712438493>
- Patwardhan, A. M., Berg, K. A., Akopain, A. N., Jeske, N. A., Gamper, N., Clarke, W. P., & Hargreaves, K. M. (2005). Bradykinin-Induced Functional Competence and Trafficking of the δ -Opioid Receptor in Trigeminal Nociceptors. *The Journal of Neuroscience*, 25(39), 8825–8832. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0160-05.2005>
- Paungmali, A., Joseph, L. H., Punturee, K., Silitertpisan, P., Pirunsan, U., & Uthaikhup, S. (2018). Immediate Effects of Core Stabilization Exercise on β -Endorphin and Cortisol Levels Among Patients With Chronic Nonspecific Low Back Pain: A Randomized Crossover Design. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, 41(3), 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.jmpt.2018.01.002>
- Pedersen, S. H., Ramachandran, R., Amrutkar, D. V., Petersen, S., Olesen, J., & Jansen-Olesen, I. (2015). Mechanisms of glyceryl trinitrate provoked mast cell degranulation. *Cephalalgia*, 35(14), 1287–1297. <https://doi.org/10.1177/0333102415574846>
- Perini, F., D'Andrea, G., Galloni, E., Pignatelli, F., Billo, G., Alba, S., Bussone, G., & Toso, V. (2005). Plasma Cytokine Levels in Migraineurs and Controls. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 45(7), 926–931. <https://doi.org/10.1111/J.1526-4610.2005.05135.X>
- Persson, J. K. E., Hongpaisan, J., & Molander, C. (1993). c-fos Expression in Gracilothalamic Tract Neurons after Electrical Stimulation of the Injured Sciatic Nerve in the Adult Rat. *Somatosensory & Motor Research*, 10(4), 475–483. <https://doi.org/10.3109/08990229309028852>
- Pert, C. B., Pert, A., Chang, J.-K., & Fong, B. T. (1976). [D-Ala²]-Met-Enkephalinamide: A Potent, Long-Lasting Synthetic Pentapeptide Analgesic. *Science*, 194(4262), 330–332. <https://doi.org/10.1126/science.968485>
- Pilozzi, A., Carro, C., & Huang, X. (2020). Roles of β -Endorphin in Stress, Behavior, Neuroinflammation, and Brain Energy Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 338. <https://doi.org/10.3390/ijms22010338>
- Pinho-Ribeiro, F. A., Deng, L., Neel, D. V., Erdogan, O., Basu, H., Yang, D., Choi, S., Walker, A. J., Carneiro-Nascimento, S., He, K., Wu, G., Stevens, B., Doran, K. S., Levy, D., & Chiu, I. M. (2023). Bacteria hijack a meningeal neuroimmune axis to facilitate brain invasion. *Nature* 2023 615:7952, 615(7952), 472–481. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05753-x>
- Pol, O., Murtra, P., Caracul, L., Valverde, O., Puig, M. M., & Maldonado, R. (2006). Expression of opioid receptors and c-fos in CB1 knockout mice exposed to neuropathic pain. *Neuropharmacology*, 50(1), 123–132. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2005.11.002>
- Pradhan, A. A., Smith, M. L., Zyuzin, J., & Charles, A. (2014). δ -Opioid receptor agonists inhibit migraine-related hyperalgesia, aversive state and cortical spreading depression in mice. *British Journal of Pharmacology*, 171(9), 2375–2384. <https://doi.org/10.1111/bph.12591>
- Puledda, F., Silva, E. M., Suwanlaong, K., & Goadsby, P. J. (2023). Migraine: from pathophysiology to treatment. *Journal of Neurology* 2023 270:7, 270(7), 3654–3666. <https://doi.org/10.1007/S00415-023-11706-1>
- Puledda, F., Younis, S., Huessler, E.-M., Haghdoust, F., Lisicki, M., Goadsby, P. J., & Tassorelli, C. (2023). Efficacy, safety and indirect comparisons of lasmiditan, rimegepant, and ubrogepant for the acute treatment of migraine: A systematic review and network meta-analysis of the literature. *Cephalalgia*, 43(3). <https://doi.org/10.1177/03331024231151419>
- Quirion, B., Bergeron, F., Blais, V., & Gendron, L. (2020). The Delta-Opioid Receptor; a Target for the Treatment of Pain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00052>

- Rapoport, A. M., Tepper, S. J., Sheftell, F. D., Kung, E., & Bigal, M. E. (2006). Which triptan for which patient? *Neurological Sciences*, 27(S2), s123–s129. <https://doi.org/10.1007/s10072-006-0586-y>
- Ray, B. S., & Wolff, H. G. (1940). Experimental studies on headache: pain-sensitive structures of the head and their significance in headache. *Archives of Surgery*, 41(4), 813–856. <https://doi.org/10.1001/ARCHSURG.1940.01210040002001>
- Recober, A., & Russo, A. F. (2009). Calcitonin gene-related peptide: An update on the biology. *Current Opinion in Neurology*, 22(3), 241–246. <https://doi.org/10.1097/WCO.0B013E32832B2427>
- Reeves, K. C., Shah, N., Muñoz, B., & Atwood, B. K. (2022). Opioid receptor-mediated regulation of neurotransmission in the brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 919773.
- Rice, F. L., Xie, J. Y., Albrecht, P. J., Acker, E., Bourgeois, J., Navratilova, E., Dodick, D. W., & Porreca, F. (2017). Anatomy and immunochemical characterization of the non-arterial peptidergic diffuse dural innervation of the rat and Rhesus monkey: Implications for functional regulation and treatment in migraine. *Cephalalgia*, 37(14), 1350–1372. <https://doi.org/10.1177/0333102416677051>
- Rivera-Mancilla, E., Villalón, C. M., & MaassenVanDenBrink, A. (2020). CGRP inhibitors for migraine prophylaxis: a safety review. *Expert Opinion on Drug Safety*, 19(10), 1237–1250. <https://doi.org/10.1080/14740338.2020.1811229>
- Rogawski, M. A. (2008). Common Pathophysiologic Mechanisms in Migraine and Epilepsy. *Archives of Neurology*, 65(6), 709–714. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.65.6.709>
- Roques, B. P., Fournié-Zaluski, M. C., & Wurm, M. (2012). Inhibiting the breakdown of endogenous opioids and cannabinoids to alleviate pain. *Nature Reviews Drug Discovery* 2012 11:4, 11(4), 292–310. <https://doi.org/10.1038/nrd3673>
- Rougeot, C., Messaoudi, M., Hermitte, V., Gaëlle Rigault, A., Blisnick, T., Dugave, C., Desor, D., & Rougeon, F. (2003). Sialorphan, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8549–8554. https://doi.org/10.1073/PNAS.1431850100/SUPPL_FILE/1850TABLE1.PDF
- Rullo, L., Morosini, C., Lacorte, A., Cristani, M., Coluzzi, F., Candeletti, S., & Romualdi, P. (2024). Opioid system and related ligands: from the past to future perspectives. *Journal of Anesthesia, Analgesia and Critical Care* 2024 4:1, 4(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S44158-024-00201-2>
- Russell, M. B., & Ducros, A. (2011). Sporadic and familial hemiplegic migraine: pathophysiological mechanisms, clinical characteristics, diagnosis, and management. *The Lancet Neurology*, 10(5), 457–470. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70048-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70048-5)
- Rustenhoven, J., Drieu, A., Mamuladze, T., de Lima, K. A., Dykstra, T., Wall, M., Papadopoulos, Z., Kanamori, M., Salvador, A. F., Baker, W., Lemieux, M., Da Mesquita, S., Cugurra, A., Fitzpatrick, J., Sviben, S., Kossina, R., Bayguinov, P., Townsend, R. R., Zhang, Q., ... Kipnis, J. (2021). Functional characterization of the dural sinuses as a neuroimmune interface. *Cell*, 184(4), 1000–1016.e27. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.12.040/ASSET/8E402CCD-DD9D-43E5-AA0D-89CC51046B1E/MAIN.ASSETS/FIGS8.JPG>
- Rutten, K., De Vry, J., Bruckmann, W., & Tzschentke, T. M. (2010). Pharmacological blockade or genetic knockout of the NOP receptor potentiates the rewarding effect of morphine in rats. *Drug and Alcohol Dependence*. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2010.10.004>
- Sałaga, M., Mokrowiecka, A., Jacenik, D., Cygankiewicz, A. I., Małecka-Panas, E., Kordek, R., Krajewska, W. M., Sobocinska, M. K., Kamysz, E., & Fichna, J. (2017). Systemic Administration of Sialorphan Attenuates Experimental Colitis in Mice via Interaction With Mu and Kappa Opioid Receptors. *Journal of Crohn's and Colitis*, 11(8), 988–998.

<https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx043>

- Salaga, M., Sobczak, M., & Fichna, J. (2013). Inhibition of proteases as a novel therapeutic strategy in the treatment of metabolic, inflammatory and functional diseases of the gastrointestinal tract. *Drug Discovery Today*, 18(15–16), 708–715. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2013.03.004>
- Saloman, J. L., Niu, K. Y., & Ro, J. Y. (2011). Activation of peripheral delta-opioid receptors leads to anti-hyperalgesic responses in the masseter muscle of male and female rats. *Neuroscience*, 190, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.062>
- SAMUELSSON, H., EKMAN, R., & HEDNER, T. (1993). CSF neuropeptides in cancer pain: effects of spinal opioid therapy. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 37(5), 502–508. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.1993.tb03755.x>
- Santino, F., & Gentilucci, L. (2023). Design of κ -Opioid Receptor Agonists for the Development of Potential Treatments of Pain with Reduced Side Effects. *Molecules*, 28(1), 346. <https://doi.org/10.3390/molecules28010346>
- Sarchielli, P., Alberti, A., Baldi, A., Coppola, F., Rossi, C., Pierguidi, L., Floridi, A., & Calabresi, P. (2006). Proinflammatory Cytokines, Adhesion Molecules, and Lymphocyte Integrin Expression in the Internal Jugular Blood of Migraine Patients Without Aura Assessed Ictally. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 46(2), 200–207. <https://doi.org/10.1111/J.1526-4610.2006.00337.X>
- Scheffler, A., Schenk, H., Wurthmann, S., Nsaka, M., Kleinschnitz, C., Glas, M., & Holle, D. (2021). CGRP antibody therapy in patients with drug resistant migraine and chronic daily headache: a real-world experience. *Journal of Headache and Pain*, 22(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S10194-021-01323-6/FIGURES/2>
- Scherrer, G., Imamachi, N., Cao, Y.-Q., Contet, C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B. L., & Basbaum, A. I. (2009). Dissociation of the Opioid Receptor Mechanisms that Control Mechanical and Heat Pain. *Cell*, 137(6), 1148–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.019>
- Schiene, K., Tzschentke, T. M., Schröder, W., & Christoph, T. (2015). Mechanical hyperalgesia in rats with diabetic polyneuropathy is selectively inhibited by local peripheral nociceptin/orphanin FQ receptor and μ -opioid receptor agonism. *European Journal of Pharmacology*, 754, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.049>
- Schreiter, A., Gore, C., Labuz, D., Fournie-Zaluski, M., Roques, B. P., Stein, C., & Machelska, H. (2012). Pain inhibition by blocking leukocytic and neuronal opioid peptidases in peripheral inflamed tissue. *The FASEB Journal*, 26(12), 5161–5171. <https://doi.org/10.1096/fj.12-208678>
- Schröder, W., Lambert, D. G., Ko, M. C., & Koch, T. (2014). Functional plasticity of the NOP / OFQ-NOP receptor system determines analgesic properties of NOP receptor agonists. *British Journal of Pharmacology*, 171(16), 3777–3800. <https://doi.org/10.1111/bph.12744>
- Schumacher, G. A., & Wolff, H. G. (1941). EXPERIMENTAL STUDIES ON HEADACHE: A. CONTRAST OF HISTAMINE HEADACHE WITH THE HEADACHE OF MIGRAINE AND THAT ASSOCIATED WITH HYPERTENSION B. CONTRAST OF VASCULAR MECHANISMS IN PREHEADACHE AND IN HEADACHE PHENOMENA OF MIGRAINE. *Archives of Neurology & Psychiatry*, 45(2), 199–214. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEURPSYC.1941.02280140009001>
- Schwenger, N., Dux, M., De Col, R., Carr, R., & Messlinger, K. (2007). Interaction of calcitonin gene-related peptide, nitric oxide and histamine release in neurogenic blood flow and afferent activation in the rat cranial dura mater. *Cephalalgia*, 27(6), 481–491. https://doi.org/10.1111/J.1468-2982.2007.01321.X/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1111_J.1468-2982.2007.01321.X-

- Sekido, R., Ishimaru, K., & Sakita, M. (2003). Differences of electroacupuncture-induced analgesic effect in normal and inflammatory conditions in rats. *The American journal of Chinese medicine*, 31(06), 955-965.
- Shapiro, R. E., Hochstetler, H. M., Dennehy, E. B., Khanna, R., Doty, E. G., Berg, P. H., & Starling, A. J. (2019). Lasmiditan for acute treatment of migraine in patients with cardiovascular risk factors: post-hoc analysis of pooled results from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials. *The Journal of Headache and Pain*, 20(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s10194-019-1044-6>
- Shenoy, S. S., & Lui, F. (2023). Biochemistry, Endogenous Opioids. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532899/>
- Shevel, E. (2011). The Extracranial Vascular Theory of Migraine—A Great Story Confirmed by the Facts. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 51(3), 409–417. <https://doi.org/10.1111/J.1526-4610.2011.01844.X>
- Skofitsch, G., & Jacobowitz, D. M. (1985). Calcitonin gene-related peptide: Detailed immunohistochemical distribution in the central nervous system. *Peptides*, 6(4), 721–745. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90178-0](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90178-0)
- Sliepen, S. H. J., Koriath, J., Christoph, T., Tzschentke, T. M., Diaz-delCastillo, M., Heegaard, A., & Rutten, K. (2021). The nociceptin/orphanin FQ receptor system as a target to alleviate cancer-induced bone pain in rats: Model validation and pharmacological evaluation. *British Journal of Pharmacology*, 178(9), 1995–2007. <https://doi.org/10.1111/bph.14899>
- Smith, J. M., Bradley, D. P., James, M. F., & Huang, C. L. H. (2006). Physiological studies of cortical spreading depression. *Biological Reviews*, 81(4), 457–481. <https://doi.org/10.1017/S1464793106007081>
- Sobocińska, M., Salaga, M., Fichna, J., Zbieta Kamysz, E., Bojarska, J., Wolf, W. M., Remko, M., Zielenkiewicz, P., Saviano, M., Zabrocki, J., & Kaczmarek, K. (2020). Anti-Inflammatory Effect of Homo- and Heterodimers of Natural Enkephalinase Inhibitors in Experimental Colitis in Mice. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 5820, 25(24), 5820. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245820>
- Somjen, G. G. (2001). Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiological Reviews*, 81(3), 1065–1096. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.2001.81.3.1065/ASSET/IMAGES/LARGE/9J0310148009.JPEG>
- Southerland, W. A., Gillis, J., Kuppalli, S., Fonseca, A., Mendelson, A., Horine, S. V., Bansal, N., & Gulati, A. (2021). Dual Enkephalinase Inhibitors and Their Role in Chronic Pain Management. *Current Pain and Headache Reports*, 25(5), 29. <https://doi.org/10.1007/s11916-021-00949-0>
- Spekker, E., Fejes-Szabó, A., & Nagy-Grócz, G. (2024). Models of Trigeminal Activation: Is There an Animal Model of Migraine? *Brain Sciences*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/BRAINS14040317>
- Spekker, E., Tanaka, M., Szabó, Á., & Vécsei, L. (2021). Neurogenic Inflammation: The Participant in Migraine and Recent Advancements in Translational Research. *Biomedicines* 2022, Vol. 10, Page 76, 10(1), 76. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10010076>
- Sprouse-Blum, A. S., Smith, G., Sugai, D., & Parsa, F. D. (2010). Understanding endorphins and their importance in pain management. *Hawaii Medical Journal*, 69(3), 70–71.
- Stein, C. (2016). Opioid receptors. *Annual Review of Medicine*, 67(Volume 67, 2016), 433–451. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MED-062613-093100/CITE/REFWORKS>

- Steiner, T. J., Jensen, R., Katsarava, Z., Linde, M., MacGregor, E. A., Osipova, V., Paemeleire, K., Olesen, J., Peters, M., & Martelletti, P. (2019). Aids to management of headache disorders in primary care (2nd edition): On behalf of the European Headache Federation and Lifting the Burden: The Global Campaign against Headache. *Journal of Headache and Pain*, 20(1), 1–52. <https://doi.org/10.1186/S10194-018-0899-2/TABLES/20>
- Steiner, T. J., Stovner, L. J., & Vos, T. (2016). GBD 2015: migraine is the third cause of disability in under 50s. *The Journal of Headache and Pain*, 17(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s10194-016-0699-5>
- Stolbach, A. I., Mazer-Amirshahi, M. E., Nelson, L. S., & Cole, J. B. (2023). American College of Medical Toxicology and the American Academy of Clinical Toxicology position statement: nalmeferene should not replace naloxone as the primary opioid antidote at this time. *Clinical Toxicology*, 61(11), 952–955. <https://doi.org/10.1080/15563650.2023.2283391>
- Stovner, L., Hagen, K., Jensen, R., Katsarava, Z., Lipton, R., Scher, A., Steiner, T., & Zwart, J.-A. (2007). The Global Burden of Headache: A Documentation of Headache Prevalence and Disability Worldwide. *Cephalalgia*, 27(3), 193–210. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2007.01288.x>
- Stovner, L. J., Nichols, E., Steiner, T. J., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Al-Raddadi, R. M., Ansha, M. G., Barac, A., Bensenor, I. M., Doan, L. P., Edessa, D., Endres, M., Foreman, K. J., Gankpe, F. G., Gopalkrishna, G., Goulart, A. C., Gupta, R., Hankey, G. J., Hay, S. I., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national burden of migraine and tension-type headache, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 17(11), 954–976. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30322-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30322-3)
- Strassman, A. M., Raymond, S. A., & Burstein, R. (1996). Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature* 1996 384:6609, 384(6609), 560–564. <https://doi.org/10.1038/384560a0>
- Sukhtankar, D. D., Zaveri, N. T., Husbands, S. M., & Ko, M. C. (2013). Effects of spinally administered bifunctional nociceptin/orphanin FQ peptide receptor/ μ -opioid receptor ligands in mouse models of neuropathic and inflammatory pain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 346(1), 11–22.
- Sureda-Gibert, P., Romero-Reyes, M., & Akerman, S. (2022). Nitroglycerin as a model of migraine: Clinical and preclinical review. *Neurobiology of Pain*, 12, 100105. <https://doi.org/10.1016/J.YNPAL.2022.100105>
- Sutherland, H. G., Albury, C. L., & Griffiths, L. R. (2019). Advances in genetics of migraine. *The Journal of Headache and Pain* 2019 20:1, 20(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/S10194-019-1017-9>
- Suyama, H., Kawamoto, M., Gaus, S., & Yuge, O. (2003). Effect of JTC-801 (nociceptin antagonist) on neuropathic pain in a rat model. *Neuroscience Letters*, 351(3), 133–136. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00502-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00502-0)
- Tajti, J., Uddman, R., Möller, S., Sundler, F., & Edvinsson, L. (1999). Messenger molecules and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 76(2–3), 176–183. [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(99\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(99)00024-7)
- Tamai, H., Sawamura, S., Takeda, K., Orii, R., & Hanaoka, K. (2005). Anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of nociceptin receptor antagonist, JTC-801, in rats after spinal nerve injury and inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 510(3), 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.01.033>
- Targowska-Duda, K. M., Ozawa, A., Bertels, Z., Cipitelli, A., Marcus, J. L., Mielke-Maday, H. K., Zribi, G., Rainey, A. N., Kieffer, B. L., Pradhan, A. A., & Toll, L. (2020). NOP receptor agonist attenuates nitroglycerin-induced migraine-like symptoms in mice. *Neuropharmacology*, 170, 108029. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108029>

- Tassorelli, C., & Joseph, S. A. (1995). Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Research*, 682(1–2), 167–181. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00348-T](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00348-T)
- Teive, H. A. G., Kowacs, P. A., Maranhão Filho, P., Piovesan, E. J., & Werneck, L. C. (2005). Leão's cortical spreading depression: From experimental "artifact" to physiological principle. *Neurology*, 65(9), 1455–1459. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000183281.12779.CD/ASSET/85043349-DFAB-4BED-B6DD-215E0C2EEA62/ASSETS/GRAPHIC/25FF3.JPEG>
- Tfelt-Hansen, P. (2000). Ergotamine in the acute treatment of migraine: A review and European consensus. *Brain*, 123(1), 9–18. <https://doi.org/10.1093/brain/123.1.9>
- Thanawala, V., Kadam, V., & Ghosh, R. (2008). Enkephalinase Inhibitors: Potential Agents for the Management of Pain. *Current Drug Targets*, 9(10), 887–894. <https://doi.org/10.2174/138945008785909356>
- The American Headache Society (2019). The American Headache Society Position Statement On Integrating New Migraine Treatments Into Clinical Practice. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 59(1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/head.13456>
- Theoharides, T. C., Donelan, J., Kandere-Grzybowska, K., & Konstantinidou, A. (2005). The role of mast cells in migraine pathophysiology. *Brain Research Reviews*, 49(1), 65–76. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2004.11.006>
- Thompson, S. J., Pitcher, M. H., Stone, L. S., Tarum, F., Niu, G., Chen, X., Kiesewetter, D. O., Schweinhardt, P., & Catherine Bushnell, M. (2018). Chronic neuropathic pain reduces opioid receptor availability with associated anhedonia in rat. *Pain*, 159(9), 1856–1866. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001282>
- Tian, X. zhu, Chen, J., Xiong, W., He, T., & Chen, Q. (2009). Effects and underlying mechanisms of human opiorphin on colonic motility and nociception in mice. *Peptides*, 30(7), 1348–1354. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2009.04.002>
- Todorov, P., Georgieva, S., Tchekalarova, J., Subaer, S., Peneva, P., & Hartati, H. (2022). Synthesis, Characterization and Biological Investigation of New N-Modified Spinorphin Analogs. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1251. <https://doi.org/10.3390/ph15101251>
- Toll, L., Ozawa, A., & Cippitelli, A. (2019). *NOP-Related Mechanisms in Pain and Analgesia* (pp. 165–186). https://doi.org/10.1007/164_2019_214
- Torun, I. E., Kilinc, Y. B., Kilinc, E., & Töre, F. (2024). TRESK channel activation ameliorates migraine-like pain via modulation of CGRP release from the trigeminovascular system and meningeal mast cells in experimental migraine models. *Life Sciences*, 357, 123091. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2024.123091>
- Turnes, J. de M., Araya, E. I., Barroso, A. R., Baggio, D. F., Koren, L. de O., Zanoveli, J. M., & Chichorro, J. G. (2022). Blockade of kappa opioid receptors reduces mechanical hyperalgesia and anxiety-like behavior in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Behavioural Brain Research*, 417, 113595. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113595>
- Uddman, R., Edvinsson, L., Ekman, R., Kingman, T., & McCulloch, J. (1985). Innervation of the feline cerebral vasculature by nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide: Trigeminal origin and co-existence with substance P. *Neuroscience Letters*, 62(1), 131–136. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90296-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90296-4)
- Ueda, H., Matsunaga, S., Inoue, M., Yamamoto, Y., & Hazato, T. (2000). Complete inhibition of purinoceptor agonist-induced nociception by spinorphin, but not by morphine. *Peptides*, 21(8), 1215–1221. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(00\)00262-X](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(00)00262-X)
- Værøy, H., Nyberg, F., & Terenius, L. (1991). No evidence for endorphin deficiency in fibromyalgia following investigation of cerebrospinal fluid (CSF) dynorphin A and Met-

- enkephalin-Arg6-Phe7. *Pain*, 46(2), 139–143. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(91\)90068-9](https://doi.org/10.1016/0304-3959(91)90068-9)
- Van Dongen, R. M., & Haan, J. (2019). Symptoms related to the visual system in migraine. *F1000Research*, 8. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.18768.1>
- Van Dongen, R. M., Zielman, R., Noga, M., Dekkers, O. M., Hankemeier, T., Van Den Maagdenberg, A. M. J. M., Terwindt, G. M., & Ferrari, M. D. (2017). Migraine biomarkers in cerebrospinal fluid: A systematic review and meta-analysis. *Cephalalgia*, 37(1), 49–63. https://doi.org/10.1177/0333102415625614/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0333102415625614-FIG5.JPEG
- Van Rossum, D., Hanisch, U. K., & Quirion, R. (1997). Neuroanatomical Localization, Pharmacological Characterization and Functions of CGRP, Related Peptides and Their Receptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(5), 649–678. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00023-1](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00023-1)
- Vaughan, C. W., Ingram, S. L., & Christie, M. J. (1997). Actions of the ORL₁ Receptor Ligand Nociceptin on Membrane Properties of Rat Periaqueductal Gray Neurons *In Vitro*. *The Journal of Neuroscience*, 17(3), 996–1003. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-03-00996.1997>
- Vila-Pueyo, M., Page, K., Murdock, P. R., Loraine, H. J., Woodrooffe, A. J., Johnson, K. W., Goadsby, P. J., & Holland, P. R. (2022). The selective 5-HT_{1F} receptor agonist lasmiditan inhibits trigeminal nociceptive processing: Implications for migraine and cluster headache. *British Journal of Pharmacology*, 179(3), 358–370. <https://doi.org/10.1111/bph.15699>
- Villalón, C. M., & Olesen, J. (2009). The role of CGRP in the pathophysiology of migraine and efficacy of CGRP receptor antagonists as acute antimigraine drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 124(3), 309–323. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2009.09.003>
- Vuralli, D., Wattiez, A.-S., Russo, A. F., & Bolay, H. (2019). Behavioral and cognitive animal models in headache research. *The Journal of Headache and Pain*, 20(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s10194-019-0963-6>
- Wager, T. D., Scott, D. J., & Zubieta, J.-K. (2007). Placebo effects on human mu-opioid activity during pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(26), 11056–11061. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702413104>
- Waksman, G., Hamel, E., Fournié-Zaluski, M. C., & Roques, B. P. (1986). Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase “enkephalinase” and of mu and delta opioid receptors in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(5), 1523–1527. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.5.1523>
- Walker, C. S., Conner, A. C., Poyner, D. R., & Hay, D. L. (2010). Regulation of signal transduction by calcitonin gene-related peptide receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(10), 476–483. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2010.06.006/ASSET/5BEB361C-084C-4592-B6FD-9DF4D7E8C566/MAIN.ASSETS/GR3.JPG>
- Wang, D., Raehal, K. M., Bilsky, E. J., & Sadée, W. (2001). Inverse agonists and neutral antagonists at μ opioid receptor (MOR): possible role of basal receptor signaling in narcotic dependence. *Journal of Neurochemistry*, 77(6), 1590–1600. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00362.x>
- Wang, F., Li, H., Mu, Q., Shan, L., Kang, Y., Yang, S., Chang, H.-C., Su, K.-P., & Liu, Y. (2022). Association of Acute Postoperative Pain and Cigarette Smoking With Cerebrospinal Fluid Levels of Beta-Endorphin and Substance P. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.755799>
- Wang, X.-M., Yan, J.-Q., Zhang, K.-M., & Mokha, S. S. (1996). Role of opioid receptors (μ , δ 1, δ 2) in modulating responses of nociceptive neurons in the superficial and deeper dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis) in the rat. *Brain Research*, 739(1–2), 235–243. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)00828-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)00828-1)

- Wellman, G. C., Quayle, J. M., & Standen, N. B. (1998). ATP-sensitive K⁺ channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle. *The Journal of Physiology*, 507(Pt 1), 117. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7793.1998.117BU.X>
- Williamson, D. J., Shephard, S. L., Cook, D. A., Hargreaves, R. J., Hill, R. G., & Cumberbatch, M. J. (2001). Role of opioid receptors in neurogenic dural vasodilation and sensitization of trigeminal neurones in anaesthetized rats. *British Journal of Pharmacology*, 133(6), 807–814. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704136>
- Williamson, D. J., Shephard, S. L., Hill, R. G., & Hargreaves, R. J. (1997). The novel anti-migraine agent rizatriptan inhibits neurogenic dural vasodilation and extravasation. *European Journal of Pharmacology*, 328(1), 61–64. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)83028-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)83028-2)
- Wisner, A., Dufour, E., Messaoudi, M., Nejdi, A., Marcel, A., Ungeheuer, M. N., & Rougeot, C. (2006). Human Opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), 17979–17984. https://doi.org/10.1073/PNAS.0605865103/SUPPL_FILE/05865FIG5.PDF
- Witkin, J. M., Statnick, M. A., Rorick-Kehn, L. M., Pinter, J. E., Ansonoff, M., Chen, Y., Tucker, R. C., & Ciccocioppo, R. (2014). The biology of Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ) related to obesity, stress, anxiety, mood, and drug dependence. *Pharmacology & Therapeutics*, 141(3), 283–299. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.10.011>
- Woldeamanuel, Y. W., Rapoport, A. M., & Cowan, R. P. (2015). The place of corticosteroids in migraine attack management: A 65-year systematic review with pooled analysis and critical appraisal. *Cephalalgia*, 35(11), 996–1024. https://doi.org/10.1177/0333102414566200/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0333102414566200-FIG7.JPEG
- Wu, S., Ren, X., Zhu, C., Wang, W., Zhang, K., Li, Z., Liu, X., & Wang, Y. (2022). A c-Fos activation map in nitroglycerin/levcromakalim-induced models of migraine. *The Journal of Headache and Pain*, 23(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s10194-022-01496-8>
- Xianli, L., Wu, Z., & Li, Y. (2014). Innervation of the cerebral dura mater. *Neuroradiology Journal*, 27(3), 293–298. <https://doi.org/10.15274/NRJ-2014-10052>
- Xiao, S., Lu, G., Liu, J., Su, W., Li, C., Liu, Y., Meng, F., Zhao, J., Gao, N., Chang, Y., Guo, X., Yu, S., & Liu, R. (2024). Brain-wide mapping of c-Fos expression in nitroglycerin-induced models of migraine. *Journal of Headache and Pain*, 25(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S10194-024-01837-9/TABLES/1>
- Xie, J. Y., De Felice, M., Kopruszinski, C. M., Eyde, N., LaVigne, J., Remeniuk, B., Hernandez, P., Yue, X., Goshima, N., Ossipov, M., King, T., Streicher, J. M., Navratilova, E., Dodick, D., Rosen, H., Roberts, E., & Porreca, F. (2017). Kappa opioid receptor antagonists: A possible new class of therapeutics for migraine prevention. *Cephalalgia*, 37(8), 780–794. <https://doi.org/10.1177/0333102417702120>
- Xu, H., Shi, X., Li, X., Zou, J., Zhou, C., Liu, W., Shao, H., Chen, H., & Shi, L. (2020). Neurotransmitter and neuropeptide regulation of mast cell function: a systematic review. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 356. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02029-3>
- Xu, M., Petraschka, M., McLaughlin, J. P., Westenbroek, R. E., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., Czyzyk, T. A., Pinter, J. E., Terman, G. W., & Chavkin, C. (2004). Neuropathic Pain Activates the Endogenous κ Opioid System in Mouse Spinal Cord and Induces Opioid Receptor Tolerance. *The Journal of Neuroscience*, 24(19), 4576–4584. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5552-03.2004>
- Xu, X. J., Hao, J. X., & Wiesenfeld-Hallin, Z. (1996). Nociceptin or antinociceptin: potent spinal antinociceptive effect of orphanin FQ/nociceptin in the rat. *Neuroreport*, 7(13), 2092–2094.
- Yamamoto, T., Nozaki-Taguchi, N., & Kimura, S. (1997). Analgesic effect of intrathecally

- administered nociceptin, an opioid receptor-like1 receptor agonist, in the rat formalin test. *Neuroscience*, 81(1), 249–254. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00166-8)
- Yamamoto, Y., Kanazawa, H., Shimamura, M., Ueki, M., & Hazato, T. (1998). Inhibitory action of spinorphin, an endogenous regulator of enkephalin-degrading enzymes, on carrageenan-induced polymorphonuclear neutrophil accumulation in mouse air-pouches. *Life Sciences*, 62(19), 1767–1773. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00138-6)
- Yamamoto, Y., Kanazawa, T., Shimamura, M., Ueki, M., & Hazato, T. (1997). Inhibitory effects of spinorphin, a novel endogenous regulator, on chemotaxis, O-2 generation, and exocytosis by N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP)-stimulated neutrophils. *Biochemical Pharmacology*, 54(6), 695–701. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00221-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00221-9)
- Yamamoto, Y., Ono, H., Ueda, A., Shimamura, M., Nishimura, K., & Hazato, T. (2002). Spinorphin as an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes: roles in pain and inflammation. *Current Protein & Peptide Science*, 3(6), 587–599. <https://doi.org/10.2174/1389203023380404>
- Yamamoto, Y., Sato, H., Fukasaku, S., Hiramatsu, K., Tai, S., Shimamura, M., & Hazato, T. (2005). Levels of spinorphin in cerebrospinal fluid derived from patients with pain increase with decreasing dipeptidyl peptidase III. *PAIN RESEARCH*, 20(1), 27–34. <https://doi.org/10.11154/PAIN.20.27>
- Yan, J., Wei, X., Bischoff, C., Edelmayer, R. M., & Dussor, G. (2013). pH-Evoked Dural Afferent Signaling Is Mediated by ASIC3 and Is Sensitized by Mast Cell Mediators. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 53(8), 1250–1261. <https://doi.org/10.1111/HEAD.12152>
- Yan, L., Dong, X., Xue, L., Xu, H., Zhou, Z., & Wan, Q. (2018). Neurogenic dural inflammation induced by inflammatory soup combined with CGRP: a modified animal model of migraine. *Int J Clin Exp Med*, 11(9), 9126–9134. www.ijcem.com/
- Yegutkin, G. G., Guerrero-Toro, C., Kilinc, E., Koroleva, K., Ishchenko, Y., Abushik, P., Giniatullina, R., Fayuk, D., & Giniatullin, R. (2016). Nucleotide homeostasis and purinergic nociceptive signaling in rat meninges in migraine-like conditions. *Purinergic Signalling*, 12(3), 561–574. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9521-8>
- Younis, S., Christensen, C. E., Toft, N. M., Søborg, T., Amin, F. M., Hougaard, A., & Ashina, M. (2019). Investigation of distinct molecular pathways in migraine induction using calcitonin gene-related peptide and sildenafil. *Cephalalgia*, 39(14), 1776–1788. https://doi.org/10.1177/0333102419882474/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0333102419882474-FIG6.JPEG
- Zadina, J. E., Hackler, L., Ge, L.-J., & Kastin, A. J. (1997). A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature*, 386(6624), 499–502. <https://doi.org/10.1038/386499a0>
- Zai, F.-L., Wu, R.-L., Zheng, M.-F., & Guo, L.-Y. (2018). [Warming Needle Moxibustion Relieves Symptoms of Lumbar Disc Herniation Patients and Upregulates Plasma β -endorphin]. *Zhen Ci Yan Jiu = Acupuncture Research*, 43(8), 512–515. <https://doi.org/10.13702/j.1000-0607.170736>
- Zaratin, P. F., Petrone, G., Sbacchi, M., Garnier, M., Fossati, C., Petrillo, P., ... & Scheideler, M. A. (2004). Modification of nociception and morphine tolerance by the selective opiate receptor-like orphan receptor antagonist (–)-cis-1-methyl-7-[[4-(2, 6-dichlorophenyl) piperidin-1-yl] methyl]-6, 7, 8, 9-tetrahydro-5 H-benzocyclohepten-5-ol (SB-612111). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 308(2), 454–461.
- Zhang, L., Zhou, Y., Yang, L., Wang, Y., & Xiao, Z. (2023). PACAP6-38 improves nitroglycerin-induced central sensitization by modulating synaptic plasticity at the trigeminal nucleus caudalis in a male rat model of chronic migraine. *Journal of Headache and Pain*, 24(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S10194-023-01603-3/FIGURES/6>

- Zhang, S., Tang, H., Zhou, J., & Gu, Y. (2014). Electroacupuncture attenuates neuropathic pain after brachial plexus injury. *Neural Regeneration Research*, 9(14), 1365. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.137589>
- Zhang, X., Burstein, R., & Levy, D. (2012). Local action of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 on intracranial meningeal nociceptors. *Cephalalgia*, 32(1), 66–72. https://doi.org/10.1177/0333102411430848/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0333102411430848-FIG3.JPEG
- Zhang, X. C., & Levy, D. (2008). Modulation of meningeal nociceptors mechanosensitivity by peripheral proteinase-activated receptor-2: The role of mast cells. *Cephalalgia*, 28(3), 276–284. [https://doi.org/10.1111/J.1468-2982.2007.01523.X-FIG3.JPEG](https://doi.org/10.1111/J.1468-2982.2007.01523.X/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1111_J.1468-2982.2007.01523.X-FIG3.JPEG)
- Zhang, X. C., Levy, D., Nosedá, R., Kainz, V., Jakubowski, M., & Burstein, R. (2010). Activation of Meningeal Nociceptors by Cortical Spreading Depression: Implications for Migraine with Aura. *Journal of Neuroscience*, 30(26), 8807–8814. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0511-10.2010>
- Zhang, X. C., Strassman, A. M., Burstein, R., & Levy, D. (2007). Sensitization and Activation of Intracranial Meningeal Nociceptors by Mast Cell Mediators. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(2), 806–812. <https://doi.org/10.1124/JPET.107.123745>
- Zhang, X., Levy, D., Kainz, V., Nosedá, R., Jakubowski, M., & Burstein, R. (2011). Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression. *Annals of Neurology*, 69(5), 855–865. <https://doi.org/10.1002/ANA.22329>
- Zhao, J., & Levy, D. (2016). Cortical Spreading Depression Promotes Persistent Mechanical Sensitization of Intracranial Meningeal Afferents: Implications for the Intracranial Mechanosensitivity of Migraine. *ENeuro*, 3(6). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0287-16.2016>
- Zhu, X., Wang, H., & Fan, Z. (2017). Change in CGRP and C-Fos Expression in Migraine Rat Model. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2010.06.137>, 143(S2). <https://doi.org/10.1016/J.OTOHNS.2010.06.137>
- Zöllner, C., & Stein, C. (2006). Opioids. In: Stein, C. (eds) Analgesia. Handbook of Experimental Pharmacology. *HEP*, 177, 31–63. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-33823-9_2