



**İLAC AŞIRI KULLANIM BAŞAĞRISININ İNFLAMASYON VE
SULFOTRANSFERAZLAR ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Elif Gülççek ABBASOĞLU TOPA

**DOKTORA TEZİ
NÖROBİLİM ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri, 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.

Elif Gülçiçek ABBASOĞLU TOPA

13/12//2024

İLAÇ AŞIRI KULLANIM BAŞAĞRISININ İNFLAMASYON VE SULFOTRANSFERAZLAR ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Elif Gülçiçek ABBASOĞLU TOPA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2024

ÖZET

İlaç Aşırı Kullanım Baş ağrısı (İAKB) non-steroid anti inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) gibi ağrı kesici ilaçların uzun süreli kullanımı ile özellikle migren hastalarında gelişen sekonder kronik bir baş ağrısıdır. Yeni araştırmalarımız nöroinflamasyonun ve bağırsak geçirgenliğinin önemli rolünü İAKBde göstermiştir. Bu çalışmada İAKB 'nin patogeneğinde trigeminal ganglionda (TG) nöroinflamasyonun ve ilaç detoksifikasyonunda görevli sulfotransferaz (SULT1A1) enzimidaki değişikliklerin deneysel İAKB modelinde incelenmesi amaçlandı. Klinik durumla uyumlu olarak dişi sıçanlar tercih edildi ve NSAİİ (Piroksikam) oral yolla uygulanarak İAKB modeli oluşturuldu. Sprague Dawley cinsi sıçanlara (16 kontrol + 16 İAKB) 5 hafta süreyle günlük oral NSAİİ (Piroksikam 10 mg/ kg) veya taşıyıcı (su 1 ml/kg) verildi. Ağrı ile ilişkili davranışlar değerlendirildi. Tüm davranış analizleri tedaviden önce ve sonra tekrarlandı. Sıçan trigeminal ganglionunda kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) ve SULT1A1 seviyeleri ile hücresel yerleşimleri ve ayrıca inflamasyon ve mitokondrial stres belirteçleri olarak hipoksi ile indüklenen faktör 1 alpha (HIF-1 α) ile alarm ve proinflamatuvar protein high mobility group box 1 (HMGB1) immunohistokimya ve Western Blot ile incelendi. Davranış deneyleri İAKB grubunda ağrı ile ilişkili tımarlama süreleri ve kafa silkme sayılarının ve periorbital mekanik allodininin kontrole kıyasla arttığını gösterdi. Trigeminal ganglionun oftalmik dalının immünohistokimya incelemesi sonucunda; SULT1A1'in, TG nöron sitoplazmalarında yerleştiği, uydu glial (SGC) hücrelerde bulunmadığı görüldü. İAKB grubunda SULT1A1'in kontrole kıyasla azaldığı saptandı. CGRP pozitif hücrelerin trigeminal ganglion nöronları olduğu saptandı. CGRP immünoreaktif nöron sayısı İAKB grubunda kontrole kıyasla istatistiksel anlamlı arttı. HMGB1 immünoreaktivitesi ise nöronlar ve SGC hücrelerinde pozitif bulundu. HMGB1; TG nöronları ve uydu glial hücrelerde (SGC) sitoplazma ve çekirdekte yerleşirken İAKB'de sitoplazmik translokasyon arttı. Western blot çalışması ise İAKB grubunda kontrole kıyasla HMGB1 protein miktarının arttığına işaret etti. HIF-1 α immünoreaktivitesi hem nöronlar hem de SGC hücrelerinde pozitif bulundu. HIF-1 α kontrol grubunda baskın olarak sitoplazmik yerleşim gösterirken, İAKB grubunda uzun süreli ve düzenli piroksikam maruziyeti çekirdeğe translokasyonun artmasına neden oldu. HIF-1 α protein ekspresyon seviyeleri İAKB'de kontrol grubuna göre yüksek bulundu. İAKB TG nöron ve uydu glialarda belirgin nöroinflamasyona ve nosiseptif nöronlarda ağrı ile ilişkili nöropeptid CGRP artışına ve SULT1A1 azalmasına yol açmaktadır. İAKB' de trigeminal duyarlılaşma ve nosiseptif yanıtın idamesine nöroinflamasyon ile ilaç ve nörotransmitter metabolizmasındaki bozulma katkıda bulunabilir.

Bilim Kodu : 10105.06
Anahtar Kelimeler : İlaç Aşırı Kullanım Baş Ağrısı, Ağrı davranışı, İnflamasyon, Trigeminal Ganglion, SGC, HMGB1, HIF-1alpha, CGRP, SULT1A1
Sayfa Adedi : 66
Danışman : Prof. Dr. Hayrunnisa BOLAY BELEN

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MEDICATION OVERUSE HEADACHE ON INFLAMMATION AND SULFOTRANSFERASES

(Ph. D. Thesis)

Elif Gülçiçek ABBASOĞLU TOPA

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

December 2024

ABSTRACT

Medication Overuse Headache (MOH) is a secondary chronic headache that develops with long-term use of painkillers such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), especially in migraine patients. Our new research has demonstrated the important role of neuroinflammation and intestinal permeability in MOH. This study aimed to examine neuroinflammation in the trigeminal ganglion in the pathogenesis of MOH and changes in the sulfotransferase (SULT1A1) enzyme involved in drug detoxification in an experimental MOH model. In accordance with the clinical situation, female rats were preferred and an MOH model was created by oral administration of NSAID (Piroxicam). Sprague Dawley rats (16 control + 16 MOH) were given daily oral NSAID (Piroxicam 10 mg/kg) or vehicle (water 1 ml/kg) for 5 weeks. Pain-related behaviors were evaluated. All behavioral analyzes were repeated before and after treatment. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and SULT1A1 levels and their cellular localizations in rat trigeminal ganglion and also hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) and alarm and proinflammatory protein high mobility group box 1 (HMGB1) as markers of inflammation and mitochondrial stress were examined by immunohistochemistry and Western blot. Behavioral experiments showed that pain-related grooming times and head shake numbers and periorbital mechanical allodynia were increased in the MOH group compared to control. Immunohistochemistry examination of the ophthalmic branch of the trigeminal ganglion revealed that SULT1A1 was localized in the cytoplasm of TG neurons and was not found in satellite glia (SGC) cells. SULT1A1 was decreased in the MOH group compared to control. CGRP positive cells were found to be trigeminal ganglion neurons. The number of CGRP immunoreactive neurons increased statistically significantly in the IAKB group compared to the control group. HMGB1 immunoreactivity was found positive in neurons and SGC cells. HMGB1 localized in the cytoplasm and nucleus in TG neurons and satellite glial cells (SGC), while cytoplasmic translocation increased in IAKB. Western blot study indicated that HMGB1 protein amount increased in the IAKB group compared to the control group. HIF-1 α immunoreactivity was found positive in both neurons and SGC cells. While HIF-1 α was predominantly cytoplasmic in the control group, long-term and regular piroxicam exposure in the IAKB group caused increased translocation to the nucleus. HIF-1 α protein expression levels were higher in IAKB than in the control group. MOH causes significant neuroinflammation in TG neurons and satellite glia and increases in pain-related neuropeptide CGRP and decreases in SULT1A1 in nociceptive neurons. Neuroinflammation and impaired drug and neurotransmitter metabolism may contribute to trigeminal sensitization and maintenance of nociceptive response in MOH.

Science Code : 10105.06

Key Words : Medication Overuse Headache, SULT1A1, Pain behaviour, Inflammation, Trigeminal Ganglion, SGC, HMGB1, HIF-1 α , CGRP, SULT1A1

Page Number : 66

Supervisor : Prof. Dr. Hayrunnisa BOLAY BELEN

TEŞEKKÜR

Bilim yolunda bana ışık tutan, araştırmamın her evresinde bilgi, tecrübe ve desteğini esirgemeyen, bana inanmaktan vazgeçmeyen, kendisinden hayata dair çok şey öğrendiğim kıymetli hocam Prof. Dr. Hayrunnisa BOLAY BELEN' e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitim sürecimde desteğini esirgemeyen ve çalışmalarına yol gösteren Prof. Dr. Meltem BAHÇELİOĞLU, Prof. Dr. Elvan ANADOL, Prof. Dr. Oğuz KUL, Doç. Dr. Doğa VURALLI, Dr. Öğr. Üyesi Zeynep YIĞMAN, Dr. Öğr. Üyesi Duygu Deniz USTA SALİMİ, Dr. Öğr. Üyesi Kerem ATALAR, Dr. Ayşen ÇALIKUŞU ve Nursu ÇAKIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, güçlerini hep arkamda hissettiğim, bugünlere gelmemi sağlayan, doktora yapmamı benden bile çok isteyen annem Nermin ABBASOĞLU ve babam Lokman ABBASOĞLU' na, varlıkları hayattaki en büyük şansım olan canım kardeşlerime, her zorluğu birlikte aştığım hayat arkadaşım eşim Yener TOPA'ya, doktora sürecimde makarnayla beslenmek zorunda kalan kıymetli evlatlarım Ayşe TOPA ve Emir TOPA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi annem Nermin Abbasoğlu ve babam Lokman Abbasoğlu'na ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	ix
RESİMLERİN LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. İlaç Aşırı Kullanım Baş Ağrısı (İAKB).....	5
2.2. Trigeminovasküler Sistem.....	6
2.2.1. Trigeminal ganglion (TG)	6
2.3. Trigeminal ganglion hücreleri ve Kalsitonin Geniyle İlişkili Peptid (CGRP) İlişkisi	7
2.4. Deneysel İlaç Aşırı Kullanım Baş Ağrısı Davranış Modelleri	8
2.5. Baş ağrısında Cinsiyet Farkı, Menstrüel Siklus Değişimleri.....	9
2.6. Sulfotransferazlar (SULT1A1)	10
2.7. Hipoksi ile İndüklenen Faktör Alpha (HIF-1 α).....	11
2.8. High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Proteinleri.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Deney Grupları	15
3.2. Östrus Döngüsünün Evrenmesi	15
3.3. Davranış Deneyleri	17
3.3.1. Spontan davranış deneyleri.....	17
3.3.2. Periorbital mekanik allodininin değerlendirilmesi	17

	Sayfa
3.4. Deneylerin Sonlandırılması ve Doku Örneklerinin Alınması	18
3.4.1. Western blot incelemeleri için dokuların toplanması.....	18
3.4.2. Histolojik incelemeler için dokuların toplanması.....	18
3.4.3. Histolojik incelemeler için doku takibi	18
3.5. İmmünohistokimya Çalışmaları	19
3.6. Protein Düzeylerinin Ölçümü	20
3.6.1. Trigeminal ganglion doku örneklerinin homojenizasyonu.....	20
3.6.2. Western blot ile protein tayini	20
3.7. İmmunhistokimya ve İmmünfloresan Görüntü Analizi.....	21
3.8. İstatistiksel Analiz	22
4. BULGULAR	23
4.1. İAKB'nin Davranış Üzerine Etkisi.....	23
4.2. İmmünohistokimya ve Western Blot Bulguları.....	24
4.2.1. Trigeminal ganglionun hücresel yapısı	24
4.2.2. Trigeminal ganglion hücrelerinde CGRP yerleşimi, İAKB ile değişimi ve Western blot bulguları	27
4.2.3. Trigeminal ganglion hücrelerinde SULT1A1 yerleşimi, İAKB ile değişimi ve Western blot bulguları.....	30
4.2.4. Trigeminal ganglion hücrelerinde HMGB1 yerleşimi, İAKB ile değişimi ve Western blot bulguları.....	33
4.2.5. Trigeminal ganglion hücrelerinde HIF1- α yerleşimi, İAKB ile değişimi ve Western blot bulguları	36
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	51
EKLER.....	61
EK-1. Etik Kurul İzni.....	62
ÖZGEÇMİŞ	64

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. İAKB ve kontrol grubu dişi sıçanlarının ağrı ile ilişkili davranış ve periorbital mekanik allodini bulguları;.....	23
Şekil 4.2. İAKB'nin trigeminal ganglionda CGRP immünopozitif hücre sayıları	29
Şekil 4.3. Trigeminal ganglion doku protein lizatlarında CGRP ifadeleri.....	30
Şekil 4.4. Trigeminal ganglion dokularında SULT1A1 ifadeleri.....	32
Şekil 4.5. Nükleer HMGB1 floresan yoğunluğunun kantifikasyonu	34
Şekil 4.6. Trigeminal ganglion dokularında HMGB1 ifade düzeyleri	36
Şekil 4.7. Nükleer HIF-1 α floresan yoğunluğunun kantifikasyonu	38
Şekil 4.8. Trigeminal ganglion dokularında HIF-1 α ifade düzeyleri	40

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Sıçan östrus döngüsü evrelemesini gösteren mikrograflar	16
Resim 4.1. Trigeminal ganglion kesitinde trigeminal sinir dallarının mikrografı.....	25
Resim 4.2. Sıçan trigeminal ganglion kesitinde trigeminal hücre çekirdekleri	26
Resim 4.3. Trigeminal ganglion nöron ve uydu glial hücrelerinin temsili mikrografı ..	27
Resim 4.4. Trigeminal ganglion kesitlerinde CGRP immünoreaktivitesini gösteren temsili mikrograflar.....	28
Resim 4.5. Trigeminal ganglion hücrelerinde CGRP yerleşimi.....	29
Resim 4.6. Trigeminal ganglion kesitlerinde SULT1A1 immünoreaktivitesini gösteren temsili mikrograflar	31
Resim 4.7. Trigeminal ganglion hücrelerinde SULT1A1 yerleşimi.....	31
Resim 4.8. Trigeminal ganglionda SULT1A1 ve TH çift immünofloresan boyaması...	32
Resim 4.9. Trigeminal ganglion nöronlarında HMGB1 yerleşimi.....	34
Resim 4.10. Trigeminal ganglion uydu glial hücrelerde HMGB1 yerleşimi	35
Resim 4.11. Trigeminal ganglion kesitlerinde HIF1- α immünoreaktivitesini gösteren temsili mikrograflar.....	37
Resim 4.12. Trigeminal ganglion nöronlarında HIF1- α yerleşimi.....	38
Resim 4.13. Trigeminal ganglion uydu glia hücrelerinde HIF1- α yerleşimi	39
Resim 4.14. Trigeminal ganglion SGC ve nöron hücrelerinde HIF1- α 'nın İAKB ile çekirdeklere yer değişimi	40
Resim 4.15. Trigeminal ganglionda HIF1- α ve CGRP çift immünofloresan boyaması	41

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
°C	Santigrat derece
μm	Mikrometre
g	Gram
mg/kg	Miligram/Kilogram
mg/ml	Miligram/Mililitre

Kısaltmalar	Açıklamalar
CGRP	Kalsitonin Genine Bağlı Peptit
DAMP	Damage-associated molecular pattern (Hasarla ilişkili moleküler model)
DNA	Deoksiribonükleik asit
HIF1-α	Hipoksi ile İndüklenen Faktör 1 alpha
HMGB1	High mobility group box 1
İAKB	İlaç Aşırı Kullanım Başağrısı
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PFA	Paraformaldehit
SGC	Uydu Glia Hücreleri
SULT 1A1	Sulfotransferaz
TBS	Tris Tamponlu Salin
TG	Trigeminal Ganglion

1. GİRİŞ

Migren ışık, ses ve kokuya aşırı duyarlılık, bulantı ve kusmanın da eşlik ettiği, zonklayıcı ve genellikle tek taraflı tekrarlayan baş ağrısı atakları ile günlük yaşam kalitesinin bozulmasına ve iş gücü kaybına neden olan nörolojik bir hastalıktır [1]. Migren gibi primer baş ağrısı bozukluğu olan bireylerde analjezikler, steroid olmayan anti inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) ve akut baş ağrısı ilaçlarının sık ve düzenli kullanımı ile migren kronikleşmekte ve ilaç aşırı kullanım baş ağrısı (İAKB) olarak adlandırılan seconder baş ağrısı gelişmektedir. Toplumun % 1-2' sini etkileyen İAKB'nin patogenezi henüz tam olarak bilinmemektedir [2], [3], [4-6]. Kullanılan ilaçların İAKB gelişmesine katkıda bulunabilecek nöroadaptif değişikliklere yol açabileceği ileri sürülmektedir [5].

Kronik ilaç kullanımına bağlı olarak trigeminal sistemin merkezi düzenlemesinin bozulması, ağrı duyarlılığını artırabilir ve İAKB' ye katkıda bulunabilir. Epizodik baş ağrısından kronik baş ağrısına dönüşümün trigeminovasküler sistemin (TVS) aktivasyonu ile trigeminal sistemin duyarlılığını içerebileceği ve triptanlar, opiatlar ve non-steroid antiinflamatuvar gibi ilaçların bu duyarlılığı kolaylaştırabileceği düşünülmektedir [5, 7-9].

Trigeminovasküler sistemin aktivasyonu primer duyu nöronlarından kalsitonin geniyle ilişkili peptid (CGRP) gibi nöropeptidlerin salınmasına yol açar. Trigeminal gangliondan salınan CGRP, periferik duyarlılığı sürdürmek için bitişik nöronlar ve uydu glial hücreleri ile etkileşime girer ve ikinci derece nöronların merkezi duyarlılığını artırabilir [10]. CGRP, nörojenik inflamasyona neden olarak vazodilatasyon, artmış damar geçirgenliği, glial hücre aktivasyonu ve inflamatuvar aracılardan artmasına neden olan mast hücre degranülasyonunu tetikleyerek ağrı duyarlılığını artırır [11].

Sülfotransferazlar (SULT) 3'-fosfoadenozin 5'-fosfosülfattan (PAPS) bir sülfonat grubunun hormon, nörotransmitter, ilaç ve ksenobiyotik bileşiklere aktararak sülfatlanmasını katalizleyen Faz II ilaç metabolizmasında görevli enzim ailesidir [12]. Sitosolik SULT'lar, spesifik substratlarına göre fenol sülfotransferazlar (SULT1) ve hidroksisteroid sülfotransferazlar (SULT2) olmak üzere iki alt aileye ayrılır [13]. SULT1 birçok ilaç da dahil olmak üzere küçük fenolik bileşiklerin, östrojenlerin, katekolaminlerin ve ksenobiyotiklerin konjugasyonunda yer alan en az sekiz izoformdan oluşur. SULT1A izoformları klasik ilaç metabolizmasında görevli alt ailedir [14]. SULT1A ailesinin en iyi tanımlanmış izoformları

SULT1A1 ve SULT1A3'tür. Beyinde SULT1A1' in ilaç detoksifikasyonunda SULT1A3' ün ise katekolamin metabolizmasında, rol oynadığı varsayılmaktadır [15]. Ek olarak SULT1A1'in beyindeki nörotransmitterlerin ve merkezi etkili ilaçların lokal metabolizmasından sorumlu olabileceği belirtilmiştir [16].

SULT izoformları yaygın bir doku dağılımına sahiptir ve karaciğer, akciğer, beyin, deri, trombositler, meme, böbrek ve gastrointestinal doku dahil olmak üzere birçok dokuda ifade edilir [17]. SULT1A izoformları insanda trombositlerde [18], karaciğerde [19], gastrointestinal sistemde [20], beyinde [21] çalışılmıştır. Farelerde karaciğer, mide, ince ve kalın bağırsaklar ile beyin dokularındaki SULT izoformlarının mRNA ifadeleri gösterilmiştir [22]. Sıçanlarda SULT ifadelerinin farklı beyin bölgelerinde özellikle kortekste bulunduğu gösterilmiştir [23]. Periferik sinir sisteminde trigeminal ganglionda SULT ekspresyonu ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

Yüksek hareketli grup kutusu-1 (HMGB1; High Mobility Group Box 1); kromatin yapısının, DNA replikasyonunun, onarımının ve transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynayan nöronlar ve mikrogliya çekirdekleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre çekirdeklerinde ifade edilen yaygın bir histon olmayan nükleer DNA bağlayıcı proteindir [24],[25]. HMGB1 çekirdekteki en hareketli proteindir ve 1-2 saniye içinde sitozole ulaşabilir. HMGB1'in hücredeki konumu, hücre tipine, dokuya ve stres sinyallerine bağlı olarak değişmektedir [26-28]. HMGB1 inflamasyon, bağışıklık ve hücre ölümünde önemli bir hücre dışı proteindir. HMGB1 ya nekrotik hücrelerden pasif olarak serbest bırakılır ya da sitoplazmaya translokasyondan sonra nekrotik olmayan fakat stresli hücrelerden aktif olarak salgılanır [24]. Hücre dışı HMGB1, doğuştan gelen bağışıklık sistemini uyarmak için bir hasarla ilişkili moleküler model (DAMP) görevi görür ve patojenle ilişkili moleküler model proteini (PAMP) birlikte homeostazis bozukluklarına karşı "Alarmin" molekülü oluştururlar [29, 30], [31]. Alarminler, hücre ya da doku stresi veya hasarını bildirmek üzere hemen salıverilen, önceden oluşturulmuş endojen moleküllerdir. HMGB1'i aktif olarak salgılamak üzere uyarılabilen hücreler arasında nöronlar, astrositler, nöroblastoma hücreleri ve diğer tümör hücreleri bulunur [32].

HMGB1, Gelişmiş glikasyon son ürünleri reseptörü (RAGE) ve Toll benzeri reseptör (TLR) gibi birden fazla reseptörle etkileşime girerek inflamatuvar yanıtları yönlendirir. Merkezi

Sinir Sistemindeki hücre dışı HMGB1, RAGE ve TLR' ler yoluyla gliaları aktive ederek inflamatuvar moleküller ile ortak hareket ederek nöroinflamasyonu destekler [29].

Memeli hücreleri hayatta kalmak için kritik derecede oksijene ihtiyaç duyarlar. Hücresel homeostazis bozulduğunda, oksijen seviyesinde azalma (hipoksi) ve oksidatif stres oluşur. Hipoksi ile indüklenen faktör (HIF-1) hücredeki oksijen seviyesine yanıt olarak hücresel sağkalımla ilgili eritropoietin, glukoz taşıyıcıları, glikolitik enzimler ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi genlerin uyarılmasını sağlayarak anahtar düzenleyici rol oynar [33], [34]. Sitoplazmada bulunan oksijene duyarlı alfa (α) ve çekirdekte bulunan oksijene dirençli beta (β) olmak üzere 2 alt birimden oluşan HIF1 heterodimer bir transkripsiyon faktörüdür [34], [35], [36]. Oksijenin yeterli olduğu normoksi durumunda sitoplazmik HIF1 α hidroksillenerek proteozomal yıkıma uğrar [37]. Hipoksi geliştiğinde HIF-1 α hidroksillenemez, yıkımı engellenir böylece hücre içi seviyesi artar ve HIF-1 β alt birimi ile heterodimer kompleks (HIF1) oluşturarak bir dizi genin ifadesini aktive eder. HIF-1 kompleksi, anjiyogenez, glikoz ve enerji metabolizması, hücre çoğalması ve hayatta kalması, eritropoez ve demir homeostazında rol oynayan genlerin hipoksiye duyarlı artırıcı elementlerine (HRE'ler) bağlanarak bu genlerin ekspresyonlarını uyarır [38], [39], [40], [41], [42], [43].

Hipoksiye ek olarak, normoksik koşullarda çeşitli proinflamatuvar sitokinler tarafından farklı sinyal yolları kullanılarak HIF-1'in düzenlendiğine dair kanıtlar vardır. Birçok çalışma Nitrik oksit (NO), Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), İnterlökin-1 β (IL-1 β) gibi inflamatuvar proteinlerin düzenlenmesinin HIF1 ile ilişkili olduğunu göstermiştir [36], [44], [45], [46]. HIF1 aktivitesi, inflamasyonun başlatılması ve muhtemelen sonlandırılması sırasında önemli bir rol oynar.

HIF1 bütün doku ve organlarda bulunur. İnsan, sıçan ve farelerde; normoksik koşullarda beyin, kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, pankreas, plasenta, iskelet kası ve dalakta HIF-1 α ve HIF-1 β mRNA' sının bulunduğu, 30-60 dakika hipoksiye maruz bırakılan farelerde beyin, akciğer ve böbrekte HIF-1(α + β) mRNA' sının bulunduğu gösterilmiştir [47].

HIF-1'in sadece hipoksi sırasında meydana gelmediği, inflamatuvar koşullar altında da sürekli NO oluşumu ile HIF-1 aktivasyonunu uyardığı gösterilmiştir [48]. HIF-1 α 'nın sitokin tarafından aktive edilmesinin hipoksi ile aynı mekanizma yoluyla olmadığı

normoksik koşullarda hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu ve hidroksil radikali birikimini yolu ile HIF-1 alfa'nın translokasyonuna aracılık ettiği bulunmuştur [49].

HIF-1 α 'nın migrendeki rolü, farelerde Nitrogliserin (NTG) ile oluşturulan kronik migren modelinde HIF1'i aktive eden prolyl hidroksilaz inhibitörü Roxadustat uygulamasının migren benzeri davranışları iyileştirdiği ve esas olarak HIF-1 α /NF- κ B inflamatuvar yolunun aracılık ettiği merkezi ağrı duyarlılığının inhibe edildiği ve yine NF- κ B yoluyla serum ve trigeminal nükleus kaudalis (TNC) içindeki inflamatuvar sitokin seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir [50].

İAKB'li kronik migren hastalarında hastalarında, LPS, HMGB1, HIF-1 α , IL-6 ve CGRP serum düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Bağırsak geçirgenliğinin artması ile doğuştan gelen bağışıklık ve proinflamatuvar, nosiseptif yanıtın artmasının İAKB'nin trigeminal duyarlılığında ve patofizyolojisinde rol oynayabileceği öngörölmüştür [51]. COVID-19 baş ağrısında yüksek serum HMGB1 seviyesinin inflamasyonla ilişkisi gösterilmiştir [52]. Farklı NSAİİ tedavi uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda yüksek serum LBP ve occludin seviyeleri ve artan beyin HMGB1 ve IL-17 seviyeleri, sırasıyla sızdıran bağırsak ve beyinde ilişkili inflamasyonun kanıtı olarak rapor edilmiştir [53], [54].

Bu alışmada İAKB'nin patogenezinde trigeminal ganglionda gelişen nöroinflamasyon ve ilaç detoksifikasyonunda görevli sulfotransferaz (SULT1A1) enzimindeki hücresel değişikliklerin non-steroid anti inflamatuvar ilaç (NSAİİ) uygulaması ile oluşturulan deneysel İAKB modelinde incelenmesi amaçlandı

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İlaç Aşırı Kullanım Baş Ağrısı (İAKB)

Migren bulantı, kusma, ışık, ses ve koku gibi çevresel uyaranlara aşırı hassasiyetin eşlik ettiği, zonklayıcı ve genellikle tek taraflı tekrarlayan baş ağrısı atakları ile karakterize günlük yaşam kalitesinin bozulmasına ve iş gücü kaybına neden olan nörolojik bir hastalıktır. Genetik yatkınlığı olan kişilerde migren, çevresel faktörler tarafından tetiklenir. Kadınlarda migren erkeklere oranla 3 kat daha fazla görülür [1]. Stres, uyku düzeninin bozulması, kadınlarda hormonal değişimler, hava değişiklikleri ve açlık migreni tetikleyen faktörlerdendir. Migren hastalarının tetikleyici faktörlerin de etkisiyle baş ağrısı ataklarının sıklıkla artması ile artan akut ilaç kullanımı epizodik migrenin (EP) kronik migrene (KM) dönüşümünü tetikler [55], [56]. Kronik migren, baş ağrısı tedavisi için sıklıkla kullanılan analjezikler, akut migren ilaçları ve steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçların düzenli ve sık kullanımı sonucu gelişen, toplumun %1-2' sini etkileyen ilaç aşırı kullanım baş ağrısı (İAKB) olarak adlandırılan ikincil bir baş ağrısı ile karmaşık hale gelir [2], [3], [51]. Uluslararası Baş Ağrısı Topluluğunun Baş Ağrısı Sınıflandırma Kurulu 3. Baskısında İAKB; “Akut veya semptomatik baş ağrısı ilacının 3 aydan uzun süre düzenli aşırı kullanımı (ayda ≥ 10 gün boyunca triptanlar, ergot alkaloidleri, kombine analjezikler veya opioidler; ayda ≥ 15 gün boyunca basit analjezikler veya nonsteroidal antiinflamatuar ilaçlar (NSAİİ'lar); veya ayda 10 günden fazla birden fazla maddenin eşzamanlı kullanımı) sonucu gelişen, ayda 15 veya daha fazla gün ortaya çıkan baş ağrısı” olarak tanımlanmaktadır [57].

İAKB gelişiminde altta yatan mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemekte fakat merkezi duyarlılaşmanın önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Analjezik kullanımı ile akut ağrı tedavisi merkezi duyarlılaşmaya yol açabilir, bu da migren ataklarının eşikini daha da düşürebilir ve kronikleşmeyi teşvik edebilir. Yapılan çalışmalarda özellikle steroid olmayan anti inflammatuar ilaçları (NSAİİ) aşırı kullanan İAKB hastalarında ağrı düzenlenmesinde bir farklılaşma olduğu, somatosensoriyel korteksin daha duyarlı hale geldiği, anterior singulat korteks ile orbitofrontal kortekste fonksiyonel metabolik bozulma geliştiği ve trigeminovasküler sistemde duyarlılaşma meydana geldiği gösterilmiştir [58],[59], [60], [61], [62],[63].

2.2. Trigeminovasküler Sistem

Trigeminovasküler sistem, beşinci kranial sinir (CN V) olan trigeminal sinir nöronları ve innerve ettikleri kranial kan damarlarından oluşur. CN V hem motor hem duyuşal lifleri içerir. Trigeminal nöronlar psödonipolar yapıda olup hücre gövdeleri trigeminal ganglionda (TG) bulunur [64].

Migrenin patofizyolojisinde trigeminovasküler sistemin (TVS) aktivasyonu ve duyarlılaşmasıdır en çok kabul gören mekanizmadır. Bu aktivasyon, kalsitonin geniyle ilişkili peptid (CGRP), P maddesi (SP), hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptit (PACAP) ve nörokinin A (NKA) gibi nörotransmitterlerin primer duyu nöronlarından salınmasına yol açar. Bu nörotransmitterler nörojenik inflamasyona neden olarak vazodilatasyon, artmış damar geçirgenliği, glial hücre aktivasyonu ve inflamatuvar medyatörlerin üretiminin artmasına neden olan mast hücre degranülasyonunu tetikler. Aynı zamanda kaudal trigeminal çekirdekte (TNC) ikinci sıra nöronlar aktive olur ve bunların aksonları talamusa yükselerek nosiseptif bilgiyi somatosensoriyel kortekse iletir [11]. İlaç aşırı kullanımında trigeminal sistem nöronlarının uyarılabilirliğinin arttığı gösterilmiştir. Kronik ilaç kullanımına bağlı olarak trigeminal sistemin merkezi düzenlenmesinin bozulması, ağrı duyarlılığını artırabilir ve İAKB' ye katkıda bulunabilir. Epizodik baş ağrısından kronik baş ağrısına dönüşümün trigeminal sistemin duyarlılığını içerebileceği ve triptanlar ve opiatlar gibi ilaçların bu duyarlılığı kolaylaştırabileceği düşünülmektedir [7].

2.2.1. Trigeminal ganglion (TG)

Trigeminal ganglion (TG), medial kranial fossada dura mater kıvrımı olan Meckel boşluğunda yer alır. TG' dan oftalmik (V1), maksiller (V2) ve mandibular (V3) olmak üzere üç büyük periferik sinir dalı ayrılır; her biri başın, yüzün ve orofasiyal boşluğun farklı bölgelerinin duyuşal innervasyonunu sağlar [65]. Trigeminal ganglion üst servikal dorsal sinir köklerinden kaynaklanan duyuşal nöronlardan oluşur. Bu nöronlar dura mater, pial ve serebral damarları innerve eder. Kranial kan damarlarının düzenlenmesinin yanı sıra kranial ağrı iletiminde de rol oynar [66]. Trigeminal gangliyonlarda hücre gövdelerine sahip olan somatosensoriyel nöronlar çeşitli termal, mekanik ve kimyasal uyaranlara yanıt verirler. TG temel olarak trigeminal sinirin psödo-unipolar primer afferent nöron gövdeleri ve glial hücrelerden (Schwann hücre ve uydu glia hücreleri) oluşur. Nöronlar ve glia hücrelerine ek

olarak, periferik ve merkezi aksonlar, kollajen lifleri oluşturan fibroblastlar, küçük kan damarları ve yerleşik mikrogliya benzeri makrofajlar gibi çeşitli bağışıklık hücreleri TG yapısında bulunur [67]. İnsan trigeminal ganglionlarında 20.000-35.000 nöron ve yaklaşık 100 kat daha fazla nöron dışı hücre sayılmıştır [68].

Trigeminal ganglion nöronları yuvarlak ve merkezi konumlanmış çekirdekçik ve kromatin parçacıkları belirgin olarak görülebilen çekirdekleri sayesinde kesin olarak tanımlanabilirler. Nöronlar çapına göre küçük ($<22 \mu\text{m}$), orta ($22-29 \mu\text{m}$) ve büyük ($>29 \mu\text{m}$) boyutlu nöronlar olarak sınıflandırılır [69]. Sıçanlarda nöronların çapları yaklaşık 10 ila 60 μm arasında değişmektedir ve bunların %90'ından fazlası, çapı 15 ila 35 μm olan küçük ve orta büyüklükteki nöronlardır [70].

Trigeminal ganglion nöron gövdeleri, uydu glial hücreleri (SGC) tarafından bir kılıf şeklinde sarılarak morfolojik ve fonksiyonel birimler oluştururlar. SGC'lerin sayısı ve hacmi, çevreledikleri nöron gövdesinin hacmiyle ve yüzey alanıyla orantılıdır. SGC'ler bir veya bazen birkaç nöronu birlikte sarabilir [71]. SGC'ler, gelişmiş organeller içeren yassılaştırmış tek çekirdekli hücrelerdir. Çok sayıda reseptör, yapışma molekülü ve iyon kanalı içermektedirler [72]. SGC özellikleri merkezi sinir sistemindeki astrositlerle benzerdir, mikroçevreyi kontrol ederek nöronların fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar [73]. Nöron ve SGC'ler arasındaki hücrelerarası boşluk 20 nm çapındadır. SGC'ler birbirleri ile ve nöronlarla boşluk bağlantıları aracılığıyla iletişim kurarlar [72].

2.3. Trigeminal ganglion hücreleri ve Kalsitonin Geniyle İlişkili Peptid (CGRP) İlişkisi

Trigeminal nöronlar, kalsitonin geniyle ilişkili peptid (CGRP), hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptid (PACAP) ve P maddesi gibi çeşitli nöropeptitleri eksprese ederler. ATP, nitrik oksit (NO), sitokinler ve nörotrofik faktörler gibi sinyal molekülleri TG nöronlarından salınır, komşu nöronlar veya SGC ile sinyal alışverişi gerçekleşir. Bu sinyalleşme nöropeptitler, reseptörler ve nörotrofik faktörler gibi araçları düzenleyen gen ekspresyonu da dahil olmak üzere hücre içi mekanizmalarla düzenlenir [74]. CGRP, migrende anahtar bir role sahiptir. İnsan trigeminal ganglionun nöronlarının %49'unun CGRP, %37'sinin CGRP reseptörü CLR ve %36'sının RAMP1'i eksprese ettiği gösterilmiştir. İnsan ve sıçan trigeminal nöronlarının CGRP ve CGRP reseptörleri CLR ve RAMP1'i ifade ettikleri fakat

birlikte lokalize olmadıkları, glial hücrelerde CGRP reseptör bileşenlerinin bulunduğu ancak CGRP' nin bulunmadığı bildirilmiştir [75].

TG aktivasyonu ile boşluk bağlantıları yoluyla nöron-glia iletişimi, nöronal CGRP' nin sitokinleri ve kemokinleri serbest bırakmak için bitişik SGC'leri aktive ettiği gösterilmiştir [76]. Trigeminal gangliondaki nöronal hücre gövdelerinin içinde veya yakınında artan sitokin üretimi ve salınımı, nöronal sinyal artırıcı olarak hareket ederek duyarlılaşmaya yol açabilir. TNF- α , IL-1 β ve IL-6 dahil olmak üzere birçok önemli sitokin seviyesindeki değişiklik migrenin patofizyolojisinde inflamasyon ile ilişkilendirilmiştir [77], [78], [79].

2.4. Deneysel İlaç Aşırı Kullanım Baş Ağrısı Davranış Modelleri

Hayvan deney modelleri, migren ve İAKB' de trigeminal sistemin işleyişine ilişkin bilgi sağlamada kritik bir rol oynamaktadır [80]. İAKB hastaları tarafından yaygın olarak kullanılan opioidler, triptanlar ve basit analjezikler gibi ilaçlarla uzun süreli tedavi edilen hayvanlarda P maddesi, CGRP, nitrik oksit (NO) ve serotonin gibi ağrı ile ilişkili moleküllerde değişiklikler olduğunu gösterilmiştir [81], [82], [83]. Kortikal yayılan depolarizasyon (KYD) ile uyarılmış sıçan beyinlerinde analjezik parasetamol ile akut tedavinin parietal korteks ve Kaudal Trigeminal Çekirdek'te c-Fos ekspresyonunu azalttığı fakat uzun süreli (30 gün) parasetamol uygulamasının c-Fos ekspresyonunda ve KYD frekansında artışa yol açtığı, trigeminal nosisepsiyonun ve kortikal uyarılabilirliğin artmasının İAKB'nın altında yatan bir mekanizma olabileceği gösterilmiştir [84]. Sıçanlarda 6 gün sumatriptan uygulaması ile oluşturulan diğer ilaç aşırı kullanım modelinde KYD eşiklerinin düştüğü rapor edilmiştir [85]. Dişi sıçanlarda 5 hafta süresince NSAİİ piroksikam ile İAKB modeli oluşturularak; periorbital mekanik geri çekilme eşiklerinde düşüş, ağrı benzeri davranışlarda artış gözlenmiştir. Ayrıca İAKB' nin bağırsak bariyerinin bozulması yoluyla sistemik inflamasyonu etkileyerek serumda LBP, CGRP, IL-6, IL-17, occludin, VE-cadherin ile beyinde IL-17 ve HMGB1 gibi nosiseptif ve proinflamatuvar moleküllerin düzeylerindeki artışın İAKB gelişiminde rol oynayabileceği gösterilmiştir [53]. Başka bir NSAİİ mefenamik asit ile oluşturulan İAKB modelinde migreni tetikleyen gıda maddelerinde bulunan SULT1A1 enzim inhibitörü hesperidinin NSAİİ mefenamik asit ile uygulanması ilaç detoksifikasyonunda görevli SULT1A1 enzimini birlikte inhibe etme yolu ile CSD duyarlılığının ve ağrı benzeri davranışların arttığı bildirilmiştir [86].

2.5. Başağrısında Cinsiyet Farkı, Menstrüel Siklus Değişimleri

Primer baş ağrıları; gerilim tipi baş ağrısı, migren ve küme baş ağrısı hem erkeklerde hem de kadınlarda görülür, ancak cinsiyete özgü farklılıklar gösterir. Yetişkin kadınlarda migren, erkeklere göre üç ila dört kat daha sık görülür. Kadınlarda 3:1 prevalansı ile dünya çapında bir milyardan fazla kişiyi etkilemektedir [87-89]. Migren patofizyolojisinde değişmiş kortikal nöronal uyarılabilirliği, trigeminovasküler sistemin aktivasyonu ve kortikal yayılan depolarizasyonu (KYD), kalsitonin geniyle ilişkili peptidin (CGRP) rolü, ağrı üretiminde rol oynayan beyin yapıları da her iki cinsiyette aynıdır. Epidemiyolojik veriler, ergenlikten başlayarak yaşam boyunca kadınlarda hastalığın daha yüksek bir insidansa sahip olduğunu göstermektedir [87, 89] .

Bu cinsiyet farkını açıklamak için bir dizi olası mekanizma önerilmiştir; hormonal etkiler, ağrıya verilen farklı tepkiler, beynin belirli bölgelerindeki yapısal ve işlevsel farklılıklar ve genetik faktörler, kadında migren görülme olasılığını artırırken, erkek ve kadın beyinleri arasındaki bazı farklılıkları da yansıtmaktadır. Trigeminoasküler sistemdeki ve merkezi sinir sisteminin ağrı kontrol bölgelerindeki östrojen reseptörlerinin dağılımı, bir kadının adet dönemi, gebelik ve menopoz gibi üreme yaşamının farklı aşamalarındaki değişen östrojen seviyelerine bağlı olarak uyarıcı veya inhibe edici aktiviteyi etkiler. Bunlar, norepinefrin, dopamin ve GABA gibi nörotransmitterler üzerindeki etki yoluyla baş ağrısı ağrı eşiği ve CSD üzerinde çalışır. Ayrıca opioid ve serotoninerjik sistemler üzerinde güçlü etkileri vardır. Östrojen yoksunluğu durumlarında beta-endorfin konsantrasyonlarını azaltmak ve serotonerjik tonu azaltmak, migren atağının başlangıcını kolaylaştırabilecek daha fazla nöroendokrin duyarlılık kazandırır [90]. Migrende cinsiyet hormonlarının rolü derinlemesine incelenmiştir. Ergenlik öncesi çocuklarda herhangi bir cinsiyet farkı olmaksızın %3-10 oranında migren görülme sıklığı vardır [91, 92]. Ergenliğin başlaması ile migren kadınlarda erkeklere göre 3-4 kat daha yaygın hale gelir. Bu da migrenin menstrüel siklus, gebelik, menopoz gibi hormon dalgalanmalarından etkilendiğini düşündürmektedir [91, 93-95]. Plazma östrojen düzeylerindeki düşüş, aurasız migren ataklarını tetikleyebilirken, daha yüksek östrojen düzeyleri koruyucu görünmektedir. Bu etkilerin temeli bilinmemektedir [88]. Kadınlarda hormonal dalgalanma bir tetikleyici olarak o kadar belirlenmiştir ki, adet migreninin teşhisi için Uluslararası Baş Ağrısı Tanı Kriterleri içerisinde özel kriterler vardır. Adet migreni, âdet kanamasının başlangıcından önceki 2 gün içinde ve en az üç adet döngüsünden ikisinde kanamanın 3 gününe kadar ortaya çıkan baş

ağrısı olarak tanımlanır [96] . Bu baş ağrısı genellikle adet öncesi östrojen seviyesindeki ani düşüşe bağlanır.

2.6. Sulfotransferazlar (SULT1A1)

Sülfonasyon çok sayıda ilaç, ksenobiyotik ve endojen bileşiğin metabolizmasında önemli bir reaksiyondur. Sülfotransferazlar (SULT) olarak adlandırılan bir enzim ailesi bu reaksiyonu katalize eder [97].

Sülfotransferazlar (SULT) sülfat vericisi 3'-fosfoadenozin 5'-fosfosülfattan (PAPS) bir sülfonat grubunun hormon, nörotransmitter, ilaç ve ksenobiyotik bileşiklere aktararak sülfatlanmasını katalizleyen Faz II ilaç metabolizmasında görevli enzim ailesidir [12]. Sitozolik SULT'lar, spesifik substratlarına göre fenol sulfotransferazlar (SULT1) ve hidroksisteroid sulfotransferazlar (SULT2) olmak üzere iki alt aileye ayrılır [13]. SULT1 birçok terapötik ilaç da dahil olmak üzere küçük fenolik bileşiklerin, östrojenlerin, katekolaminlerin ve ksenobiyotiklerin konjugasyonunda yer alan en az sekiz izoformdan oluşur. SULT1A izoformları klasik ilaç metabolizmasında görevli alt ailedir [14]. SULT1A ailesinin en iyi tanımlanmış izoformları SULT1A1 ve SULT1A3'tür. Beyinde SULT1A1' in ilaç detoksifikasyonunda SULT1A3' ün ise katekolamin metabolizmasında, rol oynadığı varsayılmaktadır. SULT1A1 ve SULT1A3 insan beyninden saflaştırılmış ve dopamin ve epinefrin de dahil olmak üzere beyinde bulunan birçok endojen bileşiği ve birçok terapötik ilacı sülfonatladığı gösterilmiştir [15].

SULT izoformları yaygın bir doku dağılımına sahiptir ve karaciğer, akciğer, beyin, deri, trombositler, meme, böbrek ve gastrointestinal doku dahil olmak üzere birçok dokuda ifade edilmektedir [17]. SULT1A izoformları insanda trombositlerde [18], karaciğerde [19], gastrointestinal sistemde [20], beyinde [21] çalışılmıştır. Farelerde karaciğer, mide, ince ve kalın bağırsaklar ile beyin dokularındaki SULT izoformlarının mRNA ifadeleri gösterilmiştir [22]. Sıçanlarda SULT ifadelerinin farklı beyin bölgelerinde özellikle kortekste bulunduğu gösterilmiştir [23].

2.7. Hipoksi ile İndüklenen Faktör Alpha (HIF-1 α)

Memeli hücreleri hayatta kalmak için kritik derecede oksijene ihtiyaç duyarlar. Hücresel homeostazis bozulduğunda, oksijen seviyesinde azalma (hipoksi) ve oksidatif stres oluşur. Hücrelerde oksidatif stresin zararlı etkilerinden korunmak ve düşük oksijen seviyesine adaptasyon için çeşitli mekanizmalar bulunur. Hipoksi ile indüklenen faktör (HIF-1) hücredeki oksijen seviyesine yanıt olarak hücresel sağkalımla ilgili eritropoietin, glukoz taşıyıcıları, glikolitik enzimler ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi genlerin uyarılmasını sağlayarak anahtar düzenleyici rol oynar [33], [34].

HIF1, fonksiyonel alfa (α) ve yapısal beta (β) olmak üzere 2 alt birimden oluşan heterodimer bir transkripsiyon faktörüdür. Her alt birim, heterodimerizasyon ve DNA bağlanmasından sorumlu bir N-terminal temel helix-loop-helix alanı içerir. C-terminal işlem alanları hem HIF-1 α hem de HIF-1 β 'da bulunabilir. Her alt birim aynı zamanda AHR (aril hidrokarbon) proteinleri de dahil olmak üzere bir dizi transkripsiyon faktöründe bulunan bir PAS (Per, ARNT, Sim) motifi içerir [34]. Hücre sitoplazmasında bulunan fonksiyonel α alt birimi (Aryl Hidrokarbon Reseptörü) oksijene duyarlı iken aryl hidrokarbon reseptör nükleer translokator (ARNT) olarak da bilinen beta alt birimi yapısal olarak nukleusta ifade edilir ve oksijene dirençlidir [35], [36]. HIF-1 α 120-kDa ve HIF-1 β 91/94- kDa moleküler ağırlığa sahiptir [98]. Oksijen varlığında alfa alt birimi Prolil Hidroksilaz Alanı proteinleri (PHD) olarak adlandırılan ve oksijen sensörü olarak görev yapan proteinler tarafından devamlı hidroksillenir. Oksijenin yeterli olduğu normoksi durumunda sitoplazmik HIF1 α 'daki prolin kalıntıları PHD'ler tarafından hidroksillenerek E3 ubiquitin ligaz enzim kompleksinin substrat tanıma alt birimi olan von-Hippel-Lindau proteini tarafından tanınır ve proteozomal yıkıma uğrar [37]. Hipoksi geliştiğinde PHD proteinlerinin aktivitesinin azalır, HIF-1 α hidroksillenemez, bozulması engellenir böylece hücre içi seviyesi artar ve HIF-1 β alt birimi ile heterodimer kompleks oluşturarak bir dizi genin ifadesini aktive eder. Proteolitik yıkıma karşı hücrede stabilizasyonu artan α alt biriminin seviyesi tarafından yönetilen HIF-1 kompleksi, anjiyogenez, glukoz ve enerji metabolizması, hücre çoğalması ve hayatta kalması, eritropoez ve demir homeostazında rol oynayan genlerin hipoksiye duyarlı artırıcı elementlerine (HRE'ler) bağlanarak bu genlerin ekspresyonlarını uyarır [38], [39], [40], [41], [42], [43].

HIF1 bütün doku ve organlarda bulunur. İnsan, sıçan ve farelerde; normoksik koşullarda beyin, kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, pankreas, plasenta, iskelet kası ve dalakta HIF-1 α ve HIF-1 β mRNA' sının bulunduğu, 30-60 dakika hipoksiye maruz bırakılan farelerde beyin, akciğer ve böbrekte HIF-1(α + β) mRNA' sının bulunduğu gösterilmiştir [47].

Hipoksiye ek olarak, normoksik koşullarda çeşitli proinflamatuvar sitokinler tarafından farklı sinyal yolları kullanılarak HIF-1'in düzenlendiğine dair kanıtlar vardır. Birçok çalışmada Nitrik oksit (NO), Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), İnterlökin-1 β (IL-1 β) gibi inflamatuvar proteinlerin düzenlenmesinin HIF1 ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. HIF1 aktivitesi, inflamasyonun başlatılması ve muhtemelen sonlandırılması sırasında önemli bir rol oynar. [36],[44], [45], [46].

HIF-1 α 'nın sitokin tarafından aktive edilmesinin hipoksi ile aynı mekanizma yoluyla olmadığı reaktif oksijen türlerine (ROS) duyarlı bir yolun varlığı ile düzenlendiğini araştırmak için HIF-1 α 'nın TNF- α 'ya bağlı düzenlenmesi araştırılmış ve TNF- α 'nın, normoksik koşullarda hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit anyonu (O₂⁻) ve hidroksil radikali (.OH) birikimini yolu ile HIF-1 α 'nın translokasyonuna aracılık ettiği bulunmuştur [49]. Başka bir çalışmada HIF-1'in sadece hipoksi sırasında meydana gelmediği, inflamatuvar koşullar altında da sürekli NO oluşumu ile HIF-1 aktivasyonunu uyardığı gösterilmiştir [48].

Kronik migrende, merkezi ağrı ve inflamatuvar yolların hassaslaşması önemli rol oynar. HIF1- α 'nın migrendeki rolü, farelerde Nitrogliserin (NTG) ile oluşturulan kronik migren modelinde HIF1'i aktive eden prolyl hidroksilaz inhibitörü Roxadustat uygulamasının migren benzeri davranışları iyileştirdiği ve esas olarak HIF-1 α /NF- κ B inflamatuvar yolunun aracılık ettiği merkezi ağrı duyarlılığının inhibe edildiği ve yine NF- κ B yoluyla serum ve trigeminal nükleus kaudalis (TNC) içindeki inflamatuvar sitokin seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Roxadustat'ın mikrogliya aktivasyonunu inhibe ettiğini gösteren in vivo sonuçlarla tutarlı olarak, roxadustat (2, 10 ve 20 μ M), HIF1'i inhibe ederek bir fare mikrogliya hücre çizgisi olan LPS ile uyarılan BV-2 hücrelerinde doza bağlı olarak ROS oluşumunu ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir [50].

2.8. High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Proteinleri

Yüksek hareketli grup kutusu-1 (HMGB1; High Mobility Group Box 1); kromatin yapısının, DNA replikasyonunun, onarımının ve transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynayan yaygın bir nükleer DNA bağlayıcı proteindir [25]. Nöronlar ve mikrogliya çekirdekleri dahil olmak üzere çeşitli hücre çekirdeklerinde eksprese edilen histon olmayan bir proteindir [24]. Tüm hücrelerde, HMGB1 çekirdek ve sitoplazma arasında hareket edebilir ve normal HMGB1 kromatine bağlanmak için çekirdeklerde birikir. HMGB1 çekirdekteki en hareketli proteindir ve 1-2 saniye içinde sitozole ulaşır. HMGB1'in hücredeki konumu, hücre tipine, dokuya ve stres sinyallerine bağlı olarak değişir ve konumu fonksiyonlarının anahtarıdır. HMGB1 esas olarak çekirdekte bulunur ve kromatine bağlanır, ancak hücrenin dış uyaranlarla aktivasyonundan sonra çekirdekten sitoplazmaya yer değiştirir ve daha sonra hücre dışı boşluğa salınır [26-28].

HMGB1'in protein dizisi fare ve sıçan arasında %100, kemirgen ve insan arasında %99 homoloji göstermektedir [99]. Nükleer HMGB1, birçok DNA aktivitesiyle ilişkili olayda (örneğin, DNA replikasyonu, onarımı, rekombinasyonu, transkripsiyonu ve genomik stabilite) yer alır. Nükleer işlevine ek olarak, HMGB1 inflamasyon, bağışıklık, hücre büyümesi, hücre çoğalması ve hücre ölümünde önemli bir hücre dışı rol oynar. HMGB1, ölü veya ölmekte olan hücreler tarafından hücre dışı boşluğa büyük miktarda salınır. Hücre dışı HMGB1, inflamatuvar, düz kas hücreleri, mezanjioblastlar ve kök hücreleri işe alarak doğuştan gelen bağışıklık sistemini uyarmak için bir DAMP işlevi görür. Ek olarak, hücre dışı HMGB1, T hücrelerinin, dendritik hücrelerin ve endotel hücrelerinin aktivasyonuna veya baskılanmasına güçlü bir yanıt tetiklemek için bir bağışıklık adjuvanı işlevi görür. Aktive edilmiş bağışıklık hücreleri (örneğin makrofajlar, monositler ve dendritik hücreler) ve endotel hücreleri de HMGB1 salgılar; bu da birden fazla reseptörün etkileşimi sonrasında ek sitokin ve kemokinlerin salınmasına neden olan pozitif bir geri bildirim döngüsü oluşturur. Böylece HMGB1, stres altında uzun süreli bir inflamatuvar durumu sürdürür. İlginç bir şekilde, hücre dışı HMGB1 antibakteriyel, hücre büyümesi ve mitotik aktiviteye sahiptir. Bu hücre dışı HMGB1 aktiviteleri yalnızca reseptörler tarafından değil, aynı zamanda Redoks durumu ve yapısı tarafından da aracılık edilir [31]. HMGB1, doğuştan gelen bağışıklığı aktive eden “Alarmin” bir moleküldür. Alarminler, hücre ya da doku stresi veya hasarına işaret etmek için hemen salınabilen, önceden oluşturulmuş endojen moleküllerdir. Hasarla ilişkili moleküler model proteini (DAMP) olan HMGB1 ve patojenle ilişkili

moleküler model proteini (PAMP) birlikte homeostazis bozukluklarına karşı alarmin molekülü oluştururlar [29, 30]. HMGB1 ya nekrotik hücrelerden pasif olarak serbest bırakılır ya da sitoplazmaya translokasyondan sonra canlı fakat stresli hücrelerden aktif olarak salgılanır [24]. HMGB1'in aktif salgılanması, monositler, makrofajlar, doğal öldürücü hücreler, dendritik hücreler, endotel hücreleri, trombositler ve diğer immünolojik olarak yetenekli hücreler mikrop ilişkili moleküler desenlere (MAMP'ler), patojen ilişkili moleküler desenlere (PAMP'ler) ve TNF, IL-1 ve IFN- γ dahil olmak üzere endojen olarak türetilen inflammatuar medyatörlere maruz kaldığında gerçekleşir. İleri beslemeli düzenlemeye katılan diğer proinflammatuar medyatörler gibi, HMGB1 de kendi salınımını in vivo ve in vitro başlatır. HMGB1'i aktif olarak salgılamak üzere uyarılabilen diğer hücreler arasında nöronlar, astrositler, eritrolösemi hücreleri, nöroblastoma hücreleri ve diğer tümör hücreleri bulunur. Monositler ve makrofajlar dahil çoğu hücre, bazal koşullar altında sürekli olarak HMGB1 proteini ve mRNA ifade eder [32].

HMGB1, Gelişmiş glikasyon son ürünleri reseptörü (RAGE) ve Toll benzeri reseptör (TLR) gibi birden fazla reseptörle etkileşime girerek inflammatuar yanıtları yönlendirir. Merkezi Sinir Sistemindeki hücre dışı HMGB1, RAGE ve TLR' ler yoluyla gliaları aktive ederek inflammatuar moleküller ile ortak hareket ederek nöroinflamasyonu destekler [29].

Enfeksiyöz ve steril inflammatuar hastalıkları olan hastalarda yüksek düzeyde ekstraselüler HMGB1 birikir. Ekstraselüler disülfür HMGB1, Toll benzeri reseptör (TLR)4 aracılığıyla bağlanarak ve sinyal göndererek makrofajları TNF ve diğer inflammatuar medyatörleri salgılamaya uyarır [100].

İAKB'li KM hastalarında, LPS, HMGB1, HIF-1 α , IL-6 ve CGRP serum düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Bağırsak geçirgenliğinin artması ile doğuştan gelen bağışıklık ve proinflammatuar, nosiseptif yanıtın artmasının İAKB'nin trigeminal duyarlılığında ve patofizyolojisinde rol oynayabileceği aynı zamanda HMGB1' in migren için bir belirteç olabileceğini öngörülmüştür [51]. COVID-19 baş ağrısında yüksek serum HMGB1 seviyesinin inflamasyonla ilişkisi gösterilmiştir [52].

Farklı NSAİİ tedavi uygulanan dişi ve erkek sıçanlarda yüksek serum LBP ve oklüdin seviyeleri ve artan beyin HMGB1 ve IL-17 seviyeleri, sırasıyla sızdıran bağırsak ve beyinde ilişkili inflamasyonun kanıtı olarak rapor edilmiştir [53], [54].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma kapsamında kullanılacak hayvanlar GÜDAM (Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi) dan temin edildi. Deneylerde 200-250 gr ağırlığında Sprague-Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, rastgele seçilerek dörtlü gruplar halinde sert zeminli, tabanında 3-6 cm kalınlığında talaş bulunan özel hazırlanmış kafeslerde, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngü kullanılarak, 18-21 °C oda sıcaklığında, gün ışığını geçirmeyen özel bir bölmede tutuldu. Yem ve suya sınırsız erişimleri sağlandı. Deneysel çalışmalar Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöropsikiyatri Eğitim, Uygulama ve Araştırma Merkezi Nörobilim Laboratuvarı gerçekleştirildi. Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı (GÜ-ET-23.007).

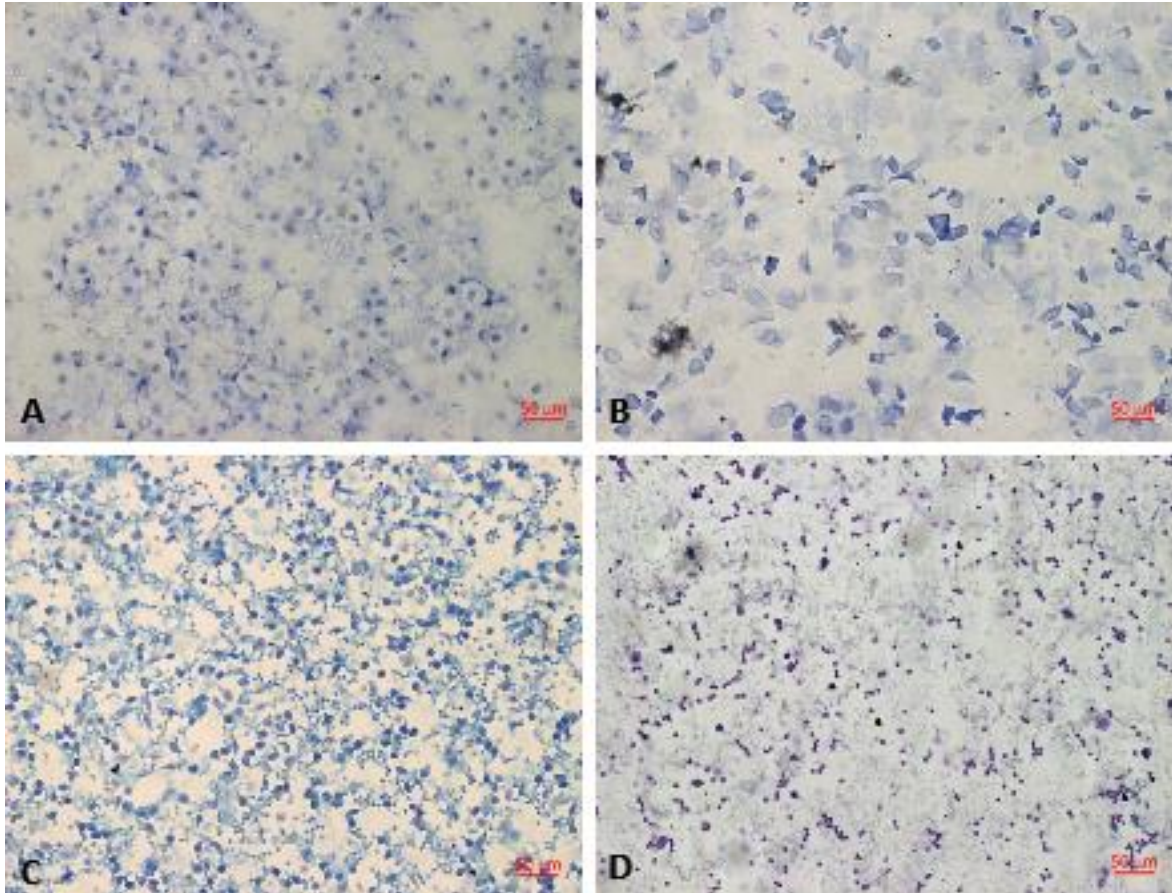
3.1. Deney Grupları

Deney kontrol (n=16) ve İAKB (n=16) olmak üzere 2 grup olarak planlandı. Klinikle uyumluluk açısından dişi sıçanlar kullanıldı. İAKB modeli, NSAİİ Piroksikam (10 mg/kg) günlük olarak suda taze çözdürülerek 5 hafta boyunca oral sonda ile (1 ml/kg) her gün aynı saate (10.00) sıçanlara verilerek oluşturuldu [101]. Kontrol grubuna ise aynı miktarda su (1 ml/kg) taşıyıcı olarak verildi. Piroksikam dozları haftalık vücut ağırlıkları ölçülerek ayarlandı.

3.2. Östrus Döngüsünün Evrenmesi

Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlar temin edildikten sonra 1 hafta boyunca deney ortamına ve araştırmacıya alışmaları sağlandı. Takip eden 2 hafta boyunca hergün aynı saatte vajinal lavaj yoluyla östrus döngülerinin tayini yapılarak kayıt altına alındı. Östrus döngüsü aşamaları her gün aynı saatte vajinal lavaj yoluyla örnekler toplanarak değerlendirildi. Vajinal kanaldan hücre toplamak için damlalıklı pipete 0,2 ml salin çekildi. Pipetin ucu, vajinal deliğe 5-6 mm derinliğe kadar nazikçe batırıldı ve ardından salin vajinaya akıtıldı 2-3 kez al-ver yapılarak sıvı bulanıklaşınca kadar yıkandı. Toplanan numuneler, lam üzerine ince bir tabaka şeklinde yayılarak hava ile kuruması sağlandıktan sonra 2 dakika boyunca %96 etil alkol ile seyreltilmiş %0,1 Toluidin Mavisi ile boyandı [102]. Fazla boyayı yok etmek için su ile yıkama yapıldıktan sonra slaytlar DPX montaj solüsyonu kullanılarak monte edildi ve ışık mikroskobu ile görüntülendi.

Dişi ratlarda östrus döngüsü proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere dört aşamadan oluşur [101]. Proöstrus (Resim 3.1.A) esas olarak çekirdekli epitel hücrelerinin yoğun kümeler halinde bir araya gelmelerine göre belirlendi. Çekirdekli epitel hücreleri koyu renkli bir çekirdeğe sahip ve yuvarlak şekillidir. Proöstrus genellikle 14 ila 24 saat sürer. Östrus (Resim 3.1.B), çekirdeksiz, kornifiye epitel hücrelerinin yoğunluğu ile tayin edildi. Çekirdeksiz epitel hücreleri büyük ve düzensiz şekillidir. Toluidin Mavisi ile soluk boyanır. Östrus evresi yaklaşık 48 saat sürer. Metöstrus (Resim 3.1.C) çekirdekli ve çekirdeksiz epitel hücreleri ile nötrofillerin varlığına göre tayin edildi. Nötrofiller çok küçük, yuvarlak hücrelerdir ve çok loblu çekirdekleri ile ayırt edilirler. Metöstrus genellikle 12 ila 24 saat sürer. Diöstrus (Resim 3.1.D) nötrofillerin baskınlığına göre sınıflandırıldı; az sayıda veya hiç epitel hücresi mevcut değildir. Diöstrus döngünün en uzun aşamasıdır ve genellikle 48 ila 72 saat sürer.



Resim 3.1. Sıçan östrus döngüsü evrelemesini gösteren mikrograflar

Vajinal yayma preparatlarında Proöstrus (A), çekirdekli epitel hücreleri ile karakterizedir. Östrus (B), kornifiye epitel hücreleri yoğun olarak görülür. Metöstrus (C) yüksek hücre

yoğunluğu ve epitel hücreleri ile nötrofillerin bir kombinasyonu ile karakterize edilir. Diöstrus (D), küçük boyutlu ve çok loblu çekirdekleri ile karakterize nötrofillerin yoğunluğu ile ayırt edilir. (Toluidin Blue boyaması, x200, ölçek çubuğu: 50µm)

3.3. Davranış Deneyleri

Dişi sıçanlara (hem kontrol hem İAKB grubu) tedavi öncesi ağrı ile ilişkili spontan davranış deneyleri ve von-Frey filamanları ile periorbital mekanik allodini eşiklerinin ölçümü yapılarak uygun olmayan hayvanlar yeni sağlıklı hayvanlarla değiştirildi. Tüm sıçanlar, temel ölçümlerden en az 3 gün önce test ortamına alıştırdı. Davranış testleri günün aynı saat diliminde ve aynı kişi tarafından yapıldı. Davranış deneylerine başlamadan 30 dk önce sıçanlar deneylerin yapılacağı odaya getirilerek ortama alışmaları sağlandı. Sağlıklı dişi sıçan östrus döngüsünde proöstrus ve östrus evrelerinde ağrı eşikleri metöstrus ve diöstrus aşamalarına göre daha düşüktür [103]. Bu nedenle davranış testleri ağrı eşiklerinin düşük olmadığı metöstrus ve erken diöstrus evreleri sırasında yapıldı [53]. Her iki grupta da çalışmanın başlangıcında ve beşinci haftanın sonunda davranış deneyleri tekrarlandı. Başlangıçtaki bazal değerler ile çalışmanın sonunda elde edilen değerler karşılaştırıldı.

3.3.1. Spontan davranış deneyleri

Baş ve yüz bakımı (grooming), donma ve kafa silkme gibi ağrı ile ilişkili spontan davranışlar, şeffaf bir kafeste 10 dakika boyunca sıçanlar kendi ortamlarında rahatça hareket ederken kaydedildi. Kontrol ve İAKB grubu hayvanlarda kafa silkme, tımarlama ve donma süreleri izlenerek hem gruplar arası hem de tedavi öncesi ve sonrası farklar değerlendirildi.

3.3.2. Periorbital mekanik allodininin değerlendirilmesi

Mekanik allodini von Frey filamanları (Aesthesio® Precision Tactile Sensory Evaluators) kullanılarak değerlendirildi. Uygulama ağırlıkları 0,008 g ile 15 g arasında değişen kalibre edilmiş bir seri monofilament gözlerin orta rostral kısmına 2,0 g'den başlayarak filamentler yarı dairesel bükülene kadar 6-8 saniye süreyle uygulandı. Uygulamada "yukarı-aşağı" metodu kullanıldı [104]. Fialmanların uygulanma süreleri arasında en az 2 dakika beklendi. Kafayı geri çekme, kafa sallama ve tımarlama pozitif yanıt olarak kabul edildi. %50 geri çekme eşikleri https://bioapps.shinyapps.io/von_frey_app/ adresindeki ücretsiz çevrimiçi hesap makinesi kullanılarak hesaplandı.

3.4. Deneylerin Sonlandırılması ve Doku Örneklerinin Alınması

Beşinci haftanın sonunda çalışmanın başlangıcında belirlenen östrus döngüsüne göre erken diöstrus ve metöstrus gününde olan sıçanlara son piroksikam dozu verildi, davranış deneyleri yapıldıktan sonra vajinal lavaj ile döngünün evresi kesinleştirildi. Sıçanlar tartılarak ağırlıklarına göre intramusküler (im) Ketamin (45 mg/kg) ve Ksilazin (5 mg/kg) enjeksiyonu ile derin anesteziye alındı.

3.4.1. Western blot incelemeleri için dokuların toplanması

Derin anestezi altındaki sıçanlardan kardiyak kan alınarak sakrifikasyonları gerçekleştirildi. Kafatası açılarak beyin çıkarıldıktan sonra trigeminal ganglion dokuları soğuk cerrahi aletlerle toplandı. Bu işlemler buz kaseti üzerinde gerçekleştirildi. Tartılan dokular etiketlenerek sıvı azot içinde donduruldu. Dokular -80 °C 'de analiz gününe kadar saklandı.

3.4.2. Histolojik incelemeler için dokuların toplanması

Derin anestezi altındaki sıçanlar intrakardiyak perfüzyon ile önce 150 ml heparinli salin ile ardından soğuk %4 lük paraformaldehit (%4 PFA, pH 7,4) solüsyonu ile kurban edildi. Önce kafatası açılıp beyin dışarı alındıktan sonra trigeminal ganglion dokuları dikkatlice çıkarılarak %4 lük PFA solüsyonu içerisinde 48 saat post -fiksasyon uygulandı.

3.4.3. Histolojik incelemeler için doku takibi

Doku takibi protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Akarsuda 2 saat yıkama
2. %50, 65, 75, 85, 96, 100 etil alkol serisinde 1'er saat dehidratasyon
3. Ksilen ile 2x30 dakika şeffaflandırma
4. Etüvde (59 °C) erimiş sıvı parafinde 3x1 saat infiltrasyon
5. Dokuları parafine gömme, blok haline getirme ve etiketleme.

3.5. İmmünohistokimya Çalışmaları

Trigeminal ganglion dokularının gömüldüğü parafin bloklardan rotary mikrotom (Leica RM2245, Almanya) ile 4µm kalınlığında seri kesitler pozitif şarjlı lamalar üzerine alındı. İmmünohistokimya protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Gece boyunca 59 °C etüvde ve ardından 3x15 dakika ksilolde deparafinizasyon
2. %100, 96, 75, 50 alkol serisinde 10'ar dakika rehidratasyon
3. Sitrat tampon (pH 6.0) ile mikrodalga fırında (850 W) 15 dakika antijen geri kazanımı
4. % 0,3'lük H₂O₂ ile endojen peroksidaz blokajı (10 dakika inkübasyon)
5. Spesifik olmayan proteinlerin blokajı (TA-125-UB, Thermo Scientific, ABD) (30 dakika)
6. Anti- SULT1A1, anti- HMGB1, anti- HIF-1α poliklonal (1:1000 dilüsyon, Elabscience, ABD) ve CGRP monoklonal (1:1000 dilüsyon, Santa Cruz Biotechnology, ABD) primer antikörleri ile inkübasyon (+4 °C'de nemli ortamda gece boyunca)
7. Biyotinli sekonder antikor (TP-125-BN, Thermo Scientific, ABD) inkübasyonu (20 dakika)
8. Streptavidin peroksidaz enzim (TS-125-HR, Thermo Scientific, ABD) inkübasyonu (20 dakika)
9. Di-aminobenzidin (DAB) kromojen-substrat kompleksi (TA-125-HDX, Thermo Scientific, ABD) inkübasyonu (3-5 dakika)
10. Sırası ile %75, 96, 100 etil alkol serisinde dehidratasyon
11. Ksilende 15 dakika bekletme ve ksilen bazlı montaj ortamı ile kapatma

Primer antikor inkübasyonundan önceki basamak hariç bütün basamaklar arasında PBS ile yıkama yapıldı.

İmmünofloresan çift boyama için immünohistokimya (IHC) protokolünde gerçekleştirilen basamaklar aynı şekilde uygulandı. Farklı olarak primer antikörlere spesifik bağlanan AF-488 (yeşil) ve Cy-3 (kırmızı) floresan bileşikler ile işaretli anti-tavşan ve anti-fare sekonder antikörlar ile 1,5 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldıktan sonra nükleer boyama için DAPI (mavi) kullanıldı.

Secunder antikorların spesifik bağlanmasını test etmek için inkübasyonun ilk aşamasında primer antikorların atlandığı kontroller kullanıldı (Negatif Kontrol). DAB ile işaretlenen negative kontrol örneklerinde hiç boyanma gözlenmedi. İmmünfloresan negatif kontrol örneklerinde ise DAPI hariç hiç floresan ışıma gözlenmedi.

3.6. Protein Düzeylerinin Ölçümü

3.6.1. Trigeminal ganglion doku örneklerinin homojenizasyonu

Sakrifikasyon sonrası tartılarak toplanan ve -80 ° C' de saklanan trigeminal ganglionlar kuru buz dolu kap içine alındı. Her 1 gr doku için 2ml T-PER doku proteini ekstraksiyon reaktifi (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve her 1 ml reaktif için 10 µl Proteaz İnhibitör kokteyl (Thermo Fisher Scientific, ABD) karışımı dokuların ağırlıklarına göre hesaplanarak soğutuldu. Hazırlanan karışım ve dokular içerisinde cam boncuklar bulunan 2 ml'lik soğuk tüpler (Bertin Technologies, Fransa) içine alındı ve 4° C ye soğutulmuş doku homojenizatörü (Bertin Technologies, Fransa) ile homojenize edildi. Tüpler 4° C'de 10.000g de 5 dk santrifüj edildikten sonra supernatant kısımları toplandı. Protein izolatlarının protein miktarları (µg/µl) florometrik ışıma yöntemi (Qubit 4 Fluorometer, Thermofisher Scientific, ABD) kullanılarak ölçüldü.

3.6.2. Western blot ile protein tayini

Trigeminal ganglion protein örnekleri her kuyucuğa 20µg protein yüklenecek şekilde lityum dodesil sülfat (LDS sample buffer) ve 10X konsantrasyonda 500 mM dithiothreitol (DTT) içeren tampon solüsyonları ile hazırlanarak ticari olarak satın alınan %4-12 bis-tris jel (Thermofisher Scientific, ABD) kuyucuklarına yüklendi. Elektroforez yöntemiyle 22 dakika 200 V'de proteinlerin jelde yürümeleri sağlandı. Jeldeki proteinler nitroselüloz membranlara aktarıldı (The Power Blotter XL (Thermofisher Scientific, ABD). Dahili yükleme kontrolü olarak kullanılan β-actin, GAPDH gibi bazı housekeeping proteinlerinin ifadelerinin belirli deneysel koşullara yanıt olarak değiştiği artık bilinmektedir. Bu nedenle kantitatif analiz için son yıllarda toplam hücresel protein boyama yöntemi ile toplam protein normalizasyonu (TPN) sıklıkla tercih edilmektedir [105, 106]. Bu nedenle membranlara transfer edilen toplam protein miktarını ölçmek ve normalizasyonu toplam protein yoğunluğuna göre yapmak amacıyla membranlar No-stain protein etiketleme reaktifi (Thermofisher Scientific,

ABD) ile 10 dakika boyunca inkübe edildi. Deiyonize su ile yıkama yapıldıktan sonra %5 BSA (Bovine Serum Albumin) ile 1,5 saat protein blokajı ve ardından SULT1A1 (1:500 dilüsyon, Elabscience, ABD), HMGB1 (1:500 dilüsyon, Elabscience, ABD), HIF-1 α (1:500 dilüsyon, Elabscience, ABD) tavşan poliklonal ve CGRP (1:500 dilüsyon, Santa Cruz Biotechnology, ABD) fare monoklonal primer antikorları ile +4°C’ de gece boyunca inkübe edildi. TBS-T ile yıkama sonrasında HRP (Horse Radish Peroksidaz) enzimi ile konjuge anti-tavşan ve anti-fare sekonder antikorları (1:2000 dilüsyon, Thermofisher Scientific, ABD) ile oda ısısında 1,5 saat inkübasyon yapıldı. TBS-T ile yıkama sonrası kemiluminesan yöntemle immünoreaktif protein bant yoğunlukları ve toplam protein yoğunlukları ölçülerek toplam protein normalizasyonu yapıldı (iBright FL1500, Invitrogen, ABD).

3.7. İmmunhistokimya ve İmmünfloresan Görüntü Analizi

Hazırlanan preparatlar bilgisayar destekli ışık ve epi-floresan mikroskobu (Axio Scope 5, Zeiss, Almanya) ile değerlendirildi. Mikroskoba bağlı kamera (Axiocam503, Zeiss, Almanya) ile görüntüleri alındıktan sonra bilgisayar yazılım programı (Zeiss ZEN 3.9 blue edition) kullanılarak analizleri yapıldı. Trigeminal sinirin oftalmik dalı baş ağrısı ile ilişkili olduğundan yalnızca V1 dalındaki nöron ve SGC’ler analiz edildi.

İmmünpozitif hücreler ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>) ücretsiz yazılımı kullanılarak elle sayıldı. Her hayvandan üç kesit ve her kesitten 20x objektif ile çekilen fotoğraflarda 100 hücre sayıldı. Trigeminal ganglion nöronlarında çekirdeğe veya sitoplazmaya translokasyonların analizi; CTCF (Corrected Total Cell Fluorescence) yoğunluk analizi **CTCF = Entegre Yoğunluk – (Seçili hücrenin alanı X Arka plan ortalama floresans)** formülüne göre gerçekleştirildi; İlk olarak, nöronların çekirdekleri DAPI görüntüleri üzerinde (kör analiz gerçekleştirmek amacıyla HIF- α kanalı kapalı iken rastgele seçilen nöron çekirdekleri) serbest çizim aracı kullanılarak tanımlandı. Daha sonra DAPI kanalı kapatılarak işaretlenen çekirdek alanının ortalama floresan yoğunluğu değeri işaretlenen alan değeri ile çarpıldı ve entegre yoğunluk hesaplandı. Üç farklı arka plan alanından alınan floresan yoğunluğunun aritmetik ortalaması yine aynı çekirdek alanı ile çarpıldı ve entegre yoğunluk değerinden çıkartıldı. Daha sonra aynı formülle hücrenin tamamının (çekirdek+sitoplazma) yoğunluğu hesaplanarak, çekirdek yoğunluğuna oranlandı.

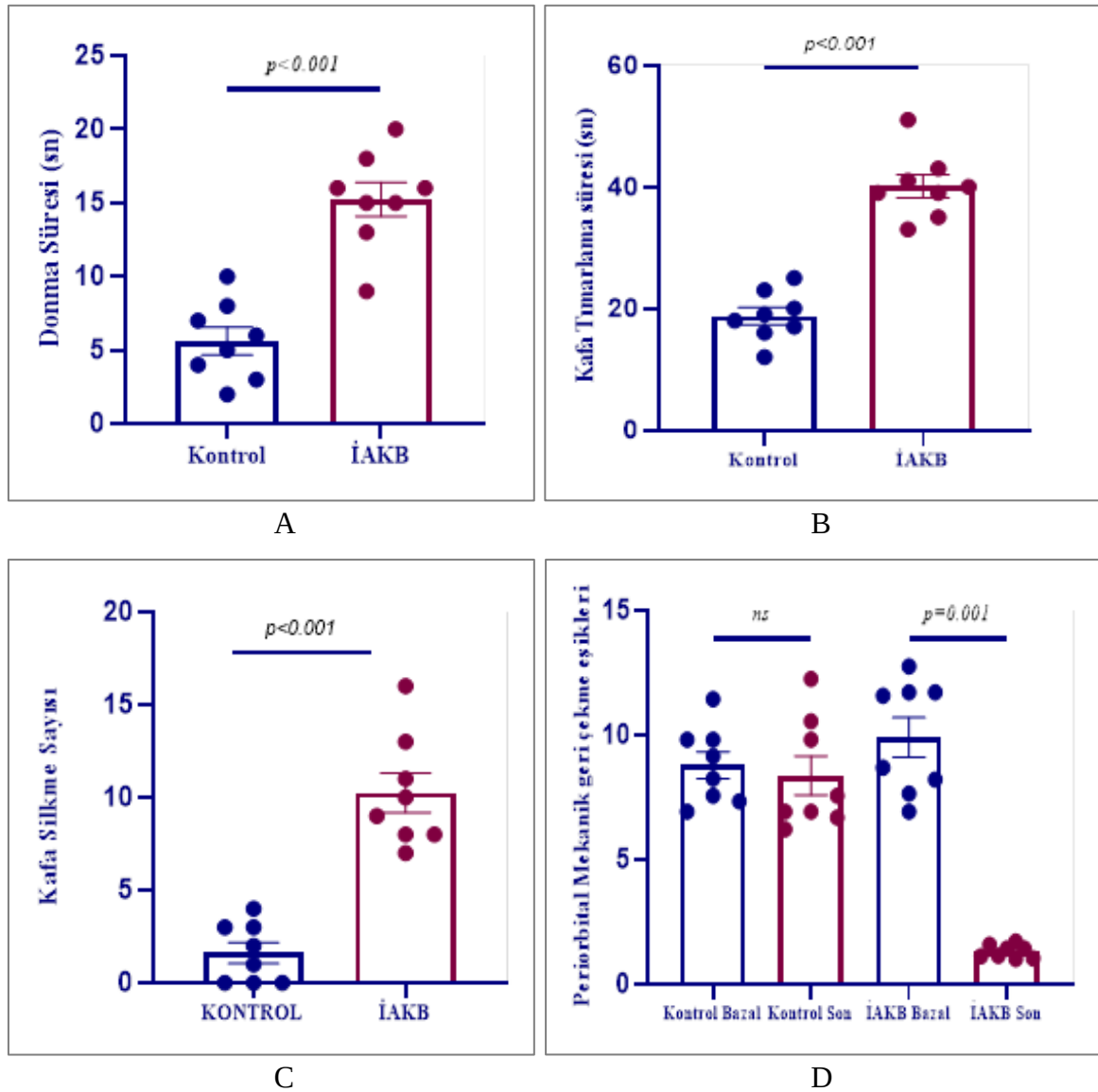
3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., CA, ABD) ile yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunuldu. Verilerin normalliği Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Değişkenler, t-test ile değerlendirildi. P değeri $<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İAKB'nin Davranış Üzerine Etkisi

Piroksikam veya taşıyıcıya 5 haftalık maruziyetten sonra, kafa tımarlama (baş-yüz temizleme) davranışının toplam süresi ($p < 0,001$), donma davranışının toplam süresi ($p < 0,001$) ve kafa silkme sayısı ($p < 0,001$) kronik piroksikam grubunda kontrole kıyasla önemli ölçüde daha yüksekti. Periorbital mekanik geri çekilme eşikleri de İAKB grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha düşüktü ($p = 0,001$) (Şekil 4.1).



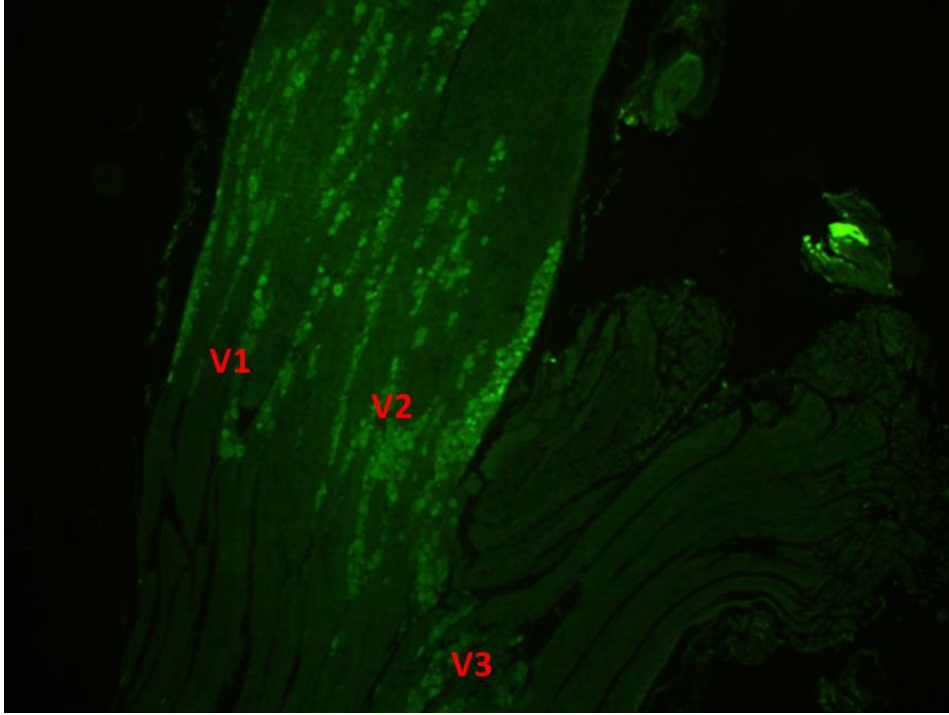
Şekil 4.1. İAKB ve kontrol grubu dişi sıçanlarının ağrı ile ilişkili davranış ve periorbital mekanik allodini bulguları;

Kontrol grubuyla kıyaslandığında İAKB grubunda; toplam donma süresi (A), toplam kafa tımarlama süresi (B) ve kafa silkme sayısı (C) anlamlı yüksektir. İAKB grubunda kontrol grubuna kıyasla periorbital mekanik geri çekme eşikleri anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (D) (sırayla $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$ ve $p=0.001$). Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. Verilerin normalliği Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. İstatistiksel analiz t-test ile yapıldı.

4.2. İmmünohistokimya ve Western Blot Bulguları

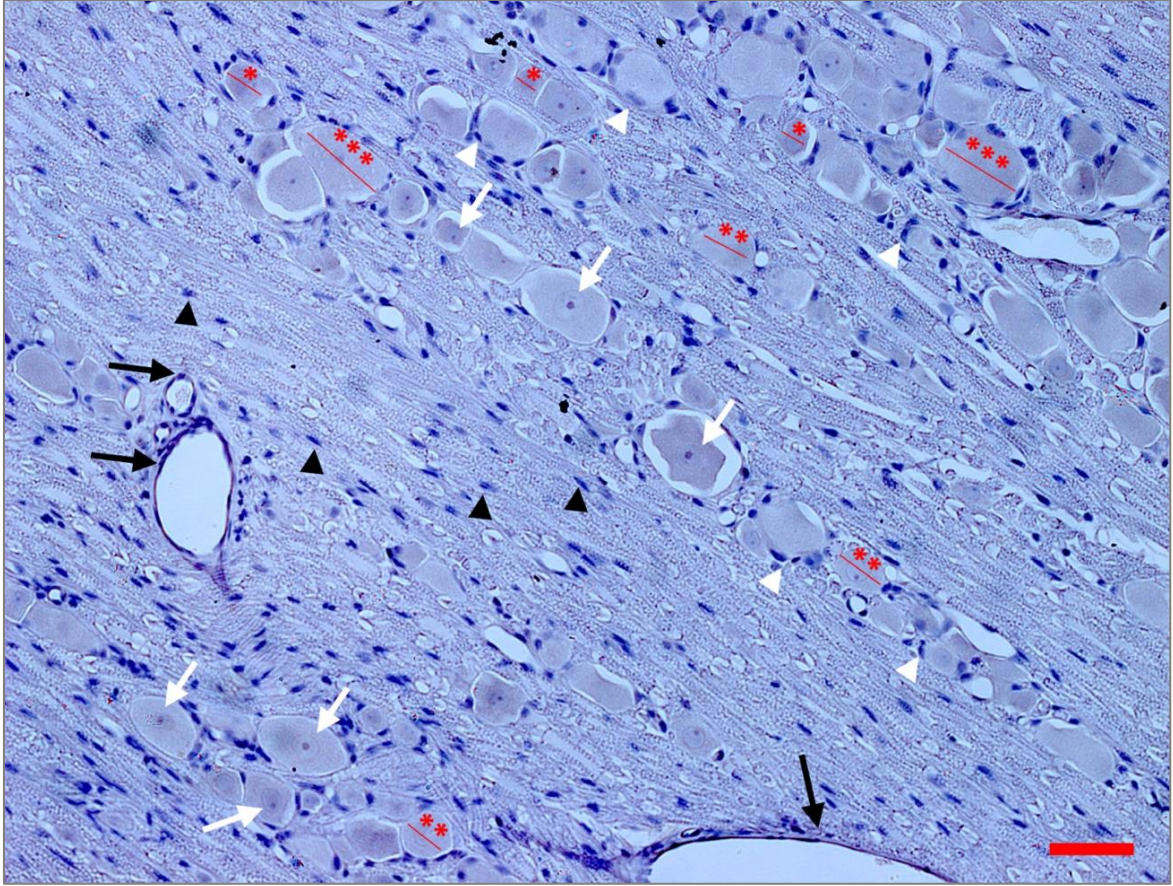
4.2.1. Trigeminal ganglionun hücresel yapısı

Parafine gömülmüş trigeminal ganglion dokularından alınan 4 μ m kalınlığındaki horizontal kesitlerde çekirdeklerin yerleşimi Hematoksilen boyaması ile incelendi. Trigeminal ganglion Oftalmik (V1), Maksiller (V2) ve Mandibular (V3) bölümdeki kümelenmiş primer afferent nöron gövdeleri ve bu 3 sinir dalına göre düzenlenmiş periferik ve merkezi akson uzantılarından oluşmaktadır. Oftalmik ve maksiller dallar birbirine yakın mandibular sinir dalı ise diğerlerinden ayrılmış görünümündedir (Resim 4.1). Primer afferent nöron gövdeleri yuvarlak ve merkezi konumlanmış çekirdekleri, çekirdeğin merkezinde yer alan çekirdekçikleri ve nöron gövdelerinin etrafını saran uydu glial hücreleri (SGC) ile belirgin olarak gözlenmektedir. Nöronlar, çaplarına göre küçük (10- 20 μ m), orta (20- 40 μ m) ve büyük (> 40 μ m) olarak sınıflandırılmıştır. Periferik ve merkezi akson uzantıları Schwann hücreleri tarafından sarılmaktadır (Resim 4.2). Trigeminal ganglion nöronları ve uydu glial hücrelerini belirlemek ve yerleşimlerini incelemek amacıyla nöron belirteci olarak β III-tubulin ve SGC belirteci olarak Glutamin Sentetaz (GS) ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Nöron gövdelerinin sınırları ve nöron sitoplazmaları β III-tubulin ile belirgin olarak gözlenmektedir (Resim 4.3.A, C). GS pozitif SGC hücreleri boyanmayan nöron gövdelerini bir kılıf şeklinde sarmaktadır (Resim 4.1.B, D).



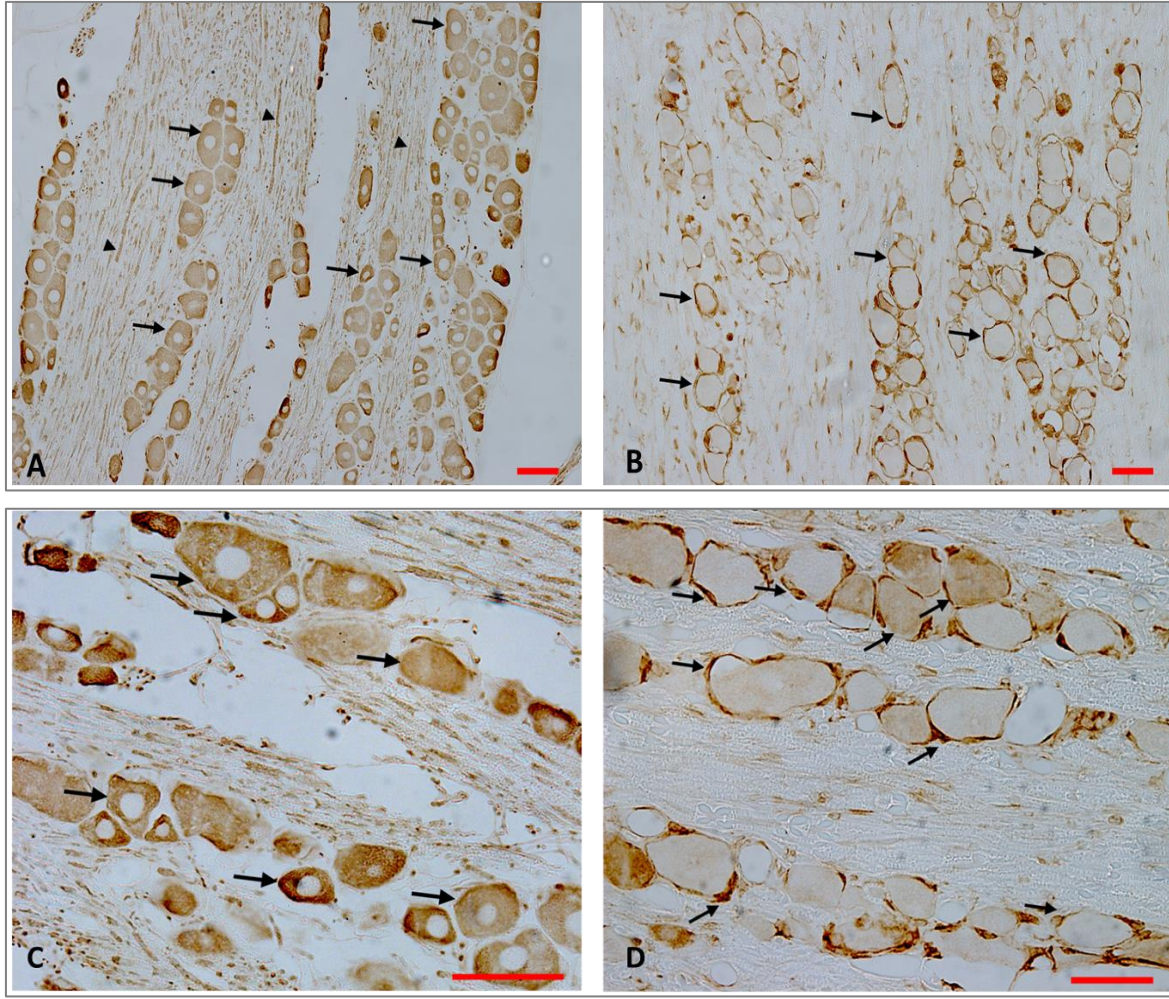
Resim 4.1. Trigeminal ganglion kesitinde trigeminal sinir dallarının mikrofrafı

Trigeminal ganglion horizontal kesiti nöronal belirteç NeuN ile immüno Floresan (yeşil) işaretlenmiştir. Oftalmik (V1), maksiller (V2) ve mandibular (V3) sinir nöronlarına ait hücre gövdelerinin (yeşil Floresan) yerleşimi gösterilmektedir (büyütme x10)



Resim 4.2. Sıçan trigeminal ganglion kesitinde trigeminal hücre çekirdekleri

Trigeminal ganglion nöron gövdeleri yuvarlak ve merkezi konumlanmış çekirdekleri ve çekirdeğin merkezine konumlanmış çekirdekçikleri (beyaz oklar) ve nöron gövdelerini saran SGC hücrelerinin çekirdekleri (beyaz ok başları) belirgin olarak gözlenmektedir. Nöronlar, çaplarına göre küçük (10- 20 μm), orta (20- 40 μm) ve büyük (>40 μm) olarak sınıflandırılmaktadır (sırasıyla; *: küçük, **: orta, ***: büyük nöronlar). Periferik ve merkezi akson uzantıları Schwann hücreleri tarafından sarılmaktadır (siyah ok başları) Trigeminal ganglion küçük kan damarları ve endotel hücre çekirdekleri siyah oklar ile gösterilmektedir. (Hematoxyline boyama, Ölçek çubuğu: 50 μm)



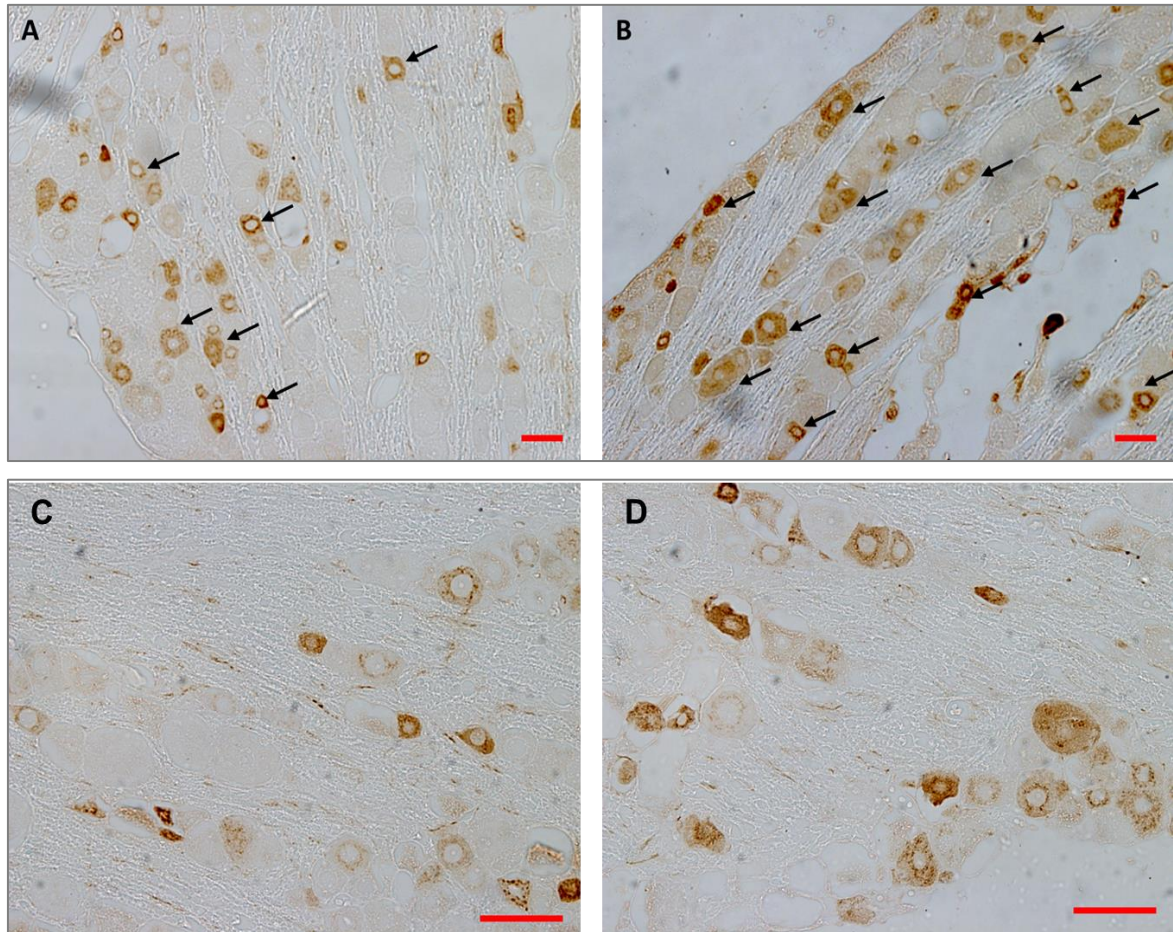
Resim 4.3. Trigeminal ganglion nöron ve uydu glial hücrelerinin temsili mikrografı

Sıçan trigeminal ganglion kesitleri nöronal sitoplazma belirteci β III-tubulin ve uydu glial hücre belirteci glutamin sentetaz (GS) için immünohistokimyasal yöntemle boyandı. Primer afferent nöron sitoplazmaları ve akson uzantıları β III-tubulin için immünoreaktiftir (A, C). Boyanmayan nöronlar GS pozitif uydu glial hücreler ile çevrilidir (B, D). Uydu glial hücreler nöronların etrafında ince bir kılıf oluşturur. (A, B; x20 ve C, D; x40 objektif büyütme ile çekilmiştir) (Ölçek çubukları: 50 μ m).

4.2.2. Trigeminal ganglion hücrelerinde CGRP yerleşimi, İAKB ile değişimi ve Western blot bulguları

Ağrı ile ilişkili nöropeptit CGRP'nin immünohistokimyasal incelemeleri sonucunda trigeminal ganglion nöronlarının çekirdek zarı etrafından başlayarak sitoplazma içine dağıldığı, küçük ila orta boyuttaki nöronlarda ve C lifleri olduğu düşünülen bazı ince aksonlarda pozitif olduğu gözlemlendi (Resim 4.4, Resim 4.5). CGRP immünoreaktivitesi

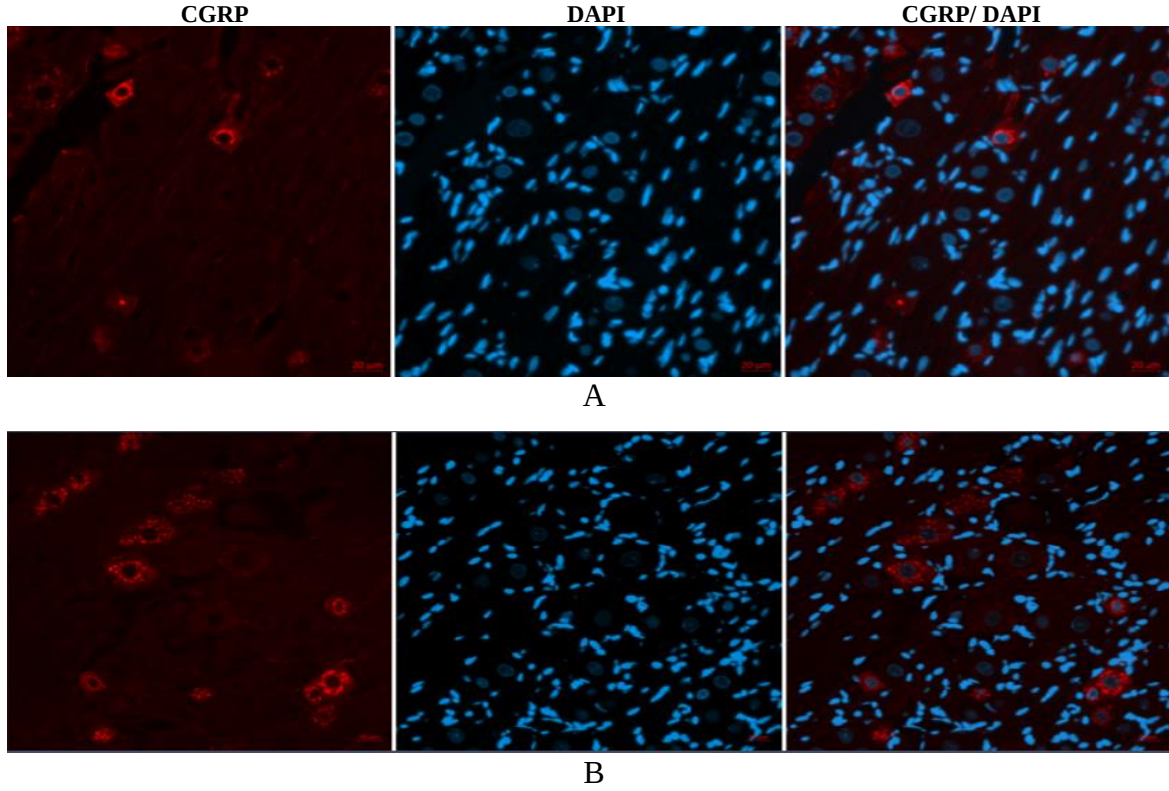
granüler bir görünümde ve nöron sitoplazması ile sınırlıydı. Kontrol grubunda sıklıkla küçük boyutlu nöronlar CGRP pozitif iken piroksikam maruziyeti sonrası daha fazla sayıda orta boyutlu nöronda immünopozitiflik saptandı. İAKB trigeminal ganglionunda (Resim 4.4.B, D ve Resim 4.5.B) CGRP pozitif nöron sayısının kontrol grubuna (Resim 4.4. A, C ve Resim 4.5.A) kıyasla artmış olduğu belirgindi. CGRP immünopozitif pozitif hücre yüzdeleri her iki grupta kıyaslandığında İAKB grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (Şekil 4.2). İmmünohistokimya bulgularına paralel olarak trigeminal ganglion doku protein örneklerinde western blot sonuçları İAKB grubunda kontrole kıyasla CGRP ifade düzeylerinin attığı görüldü (Şekil 4.3).



Resim 4.4. Trigeminal ganglion kesitlerinde CGRP immünoreaktivitesini gösteren temsili mikrograflar

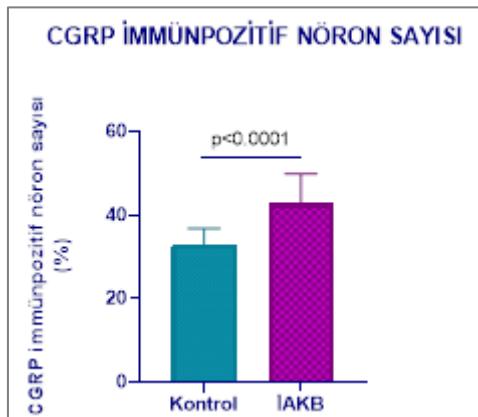
Kontrol ve İAKB grubunda küçük ve orta boyutlu trigeminal nöron sitoplazmaları CGRP için immünopozitifdir. Peri-nükleer başlayıp nöronal sitoplazmada dağılan granüler desenler her iki grupta da belirgindir. İAKB trigeminal ganglionunda (B, D) CGRP pozitif nöron sayısı kontrol grubuna (A, C) kıyasla artmış görünümdeydir. Siyah oklar CGRP pozitif

nöronları işaret etmektedir. (A, B; x20 ve C, D; x40 büyütme objektif ile çekilmiştir). Ölçek çubukları: 50µm.



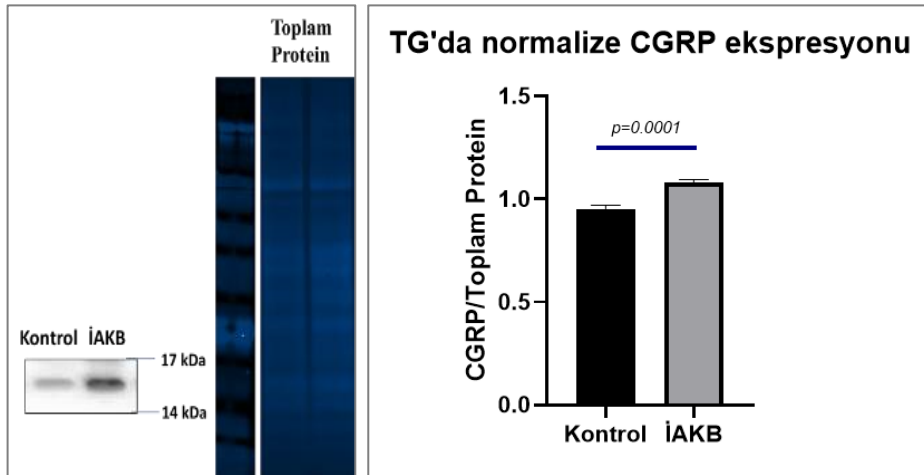
Resim 4.5. Trigeminal ganglion hücrelerinde CGRP yerleşimi

CGRP pozitif hücreler kırmızı floresan (Cy3) ile işaretlenmiştir. Çekirdekler mavi (DAPI) ile karşıt boyanmıştır. Üst sıra kontrol ve alt sıra İAKB grubuna ait temsili fotoğraflardır. İAKB trigeminal nöronlarında (B) CGRP pozitif hücre dağılım yoğunluğu kontrol grubuna (A) kıyasla artmış görünümündedir. Ölçek çubuğu: 20 µm.



Şekil 4.2. İAKB'nin trigeminal ganglionda CGRP immünopozitif hücre sayıları

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İAKB trigeminal ganglionlarında CGPR immüno pozitif nöron sayısı yüksek bulunmuştur. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmektedir. Verilerin normalliği Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. İstatistiksel analiz t-test ile yapıldı ($p < 0.001$).

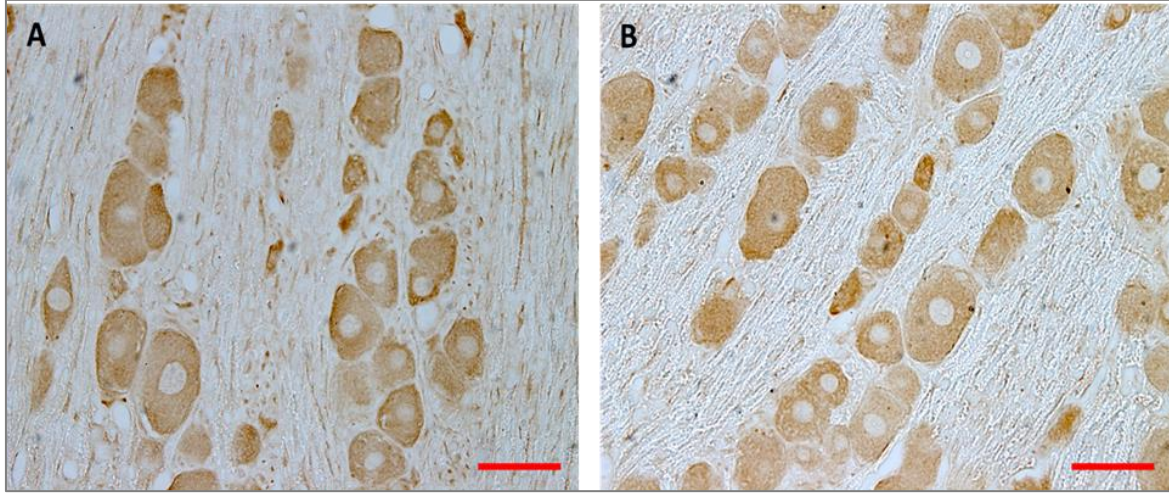


Şekil 4.3. Trigeminal ganglion doku protein lizatlarında CGRP ifadeleri

Western blot ile TG lizatlarında tespit edilen CGRP protein ekspresyon düzeyleri İAKB grubunda düzeyi kontrol grubuna kıyasla artmıştır. Üç bağımsız deneyden alınan temsili görüntü gösterilmektedir (a). CGRP ekspresyonunun kantitatif analizi (b), CGRP bant yoğunluklarının toplam protein yoğunluklarına normalizasyonu ile yapılmıştır (a). Veriler $\pm$ SEM olarak gösterilmektedir. Verilerin normalliği Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve istatistiksel analiz t-test ile yapılmıştır ($p = 0.001$).

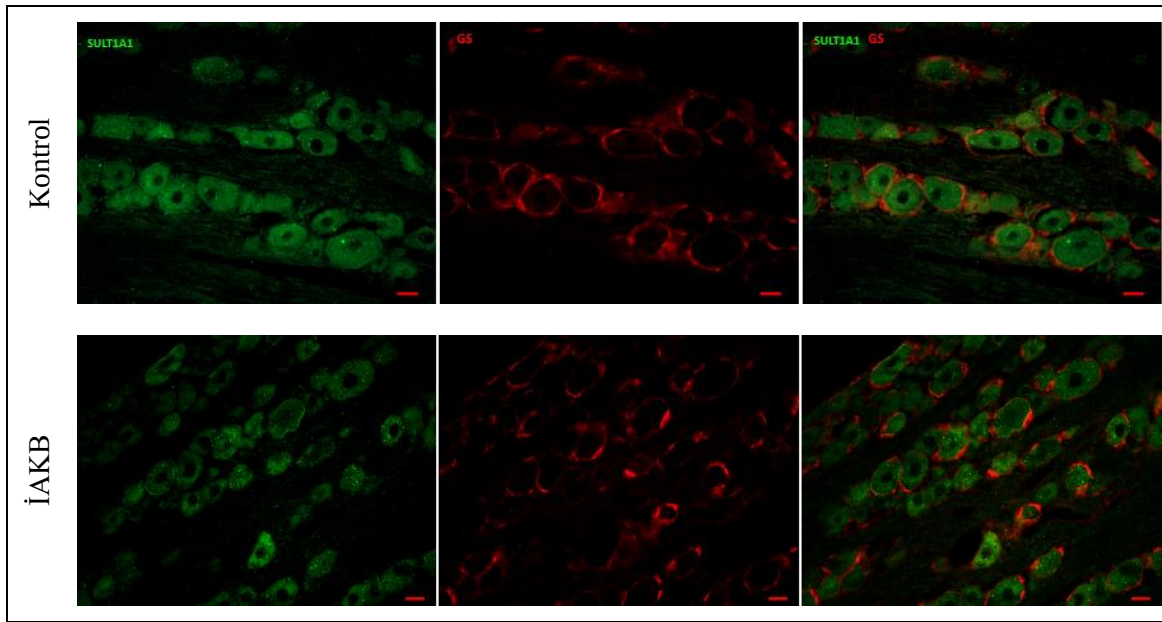
4.2.3. Trigeminal ganglion hücrelerinde SULT1A1 yerleşimi, İAKB ile değişimi ve Western blot bulguları

SULT1A1'in immünohistokimyasal incelemeleri sonucunda trigeminal ganglion nöron sitoplazmalarında yaygın ve homojen dağıldığı ek olarak akson uzantılarında immüno reaktifti. Uydu glial hücrelerde SULT1A1 immüno reaktivite göstermedi (Resim 4.6, Resim 4.7). SULT1A1 TG nöronlarında tirozin hidroksilaz (TH) ile eş yerleşim gösterdi (Resim 4.8). Trigeminal ganglion doku protein lizatlarında yapılan western blot sonuçları İAKB grubunda kontrole kıyasla SULT1A1 ifade düzeylerinin azaldığını gösterdi. (Şekil 4.4).



Resim 4.6. Trigeminal ganglion kesitlerinde SULT1A1 immünoaktivitesini gösteren temsili mikroyraflar

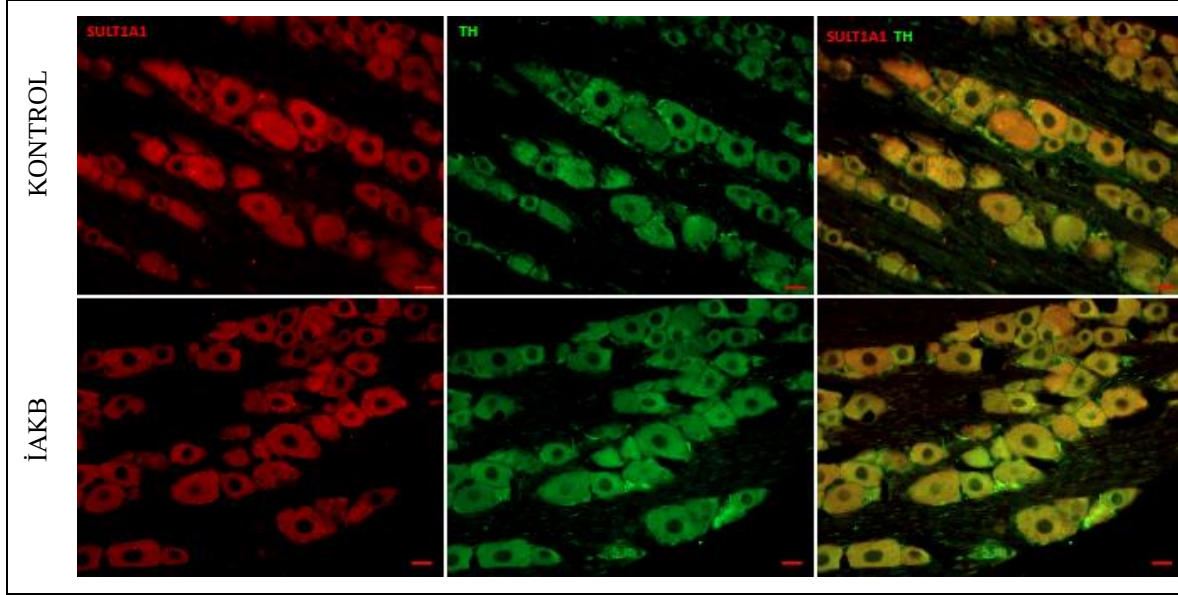
Kontrol (A) ve İAKB (B) grubu trigeminal ganglion nöronlarında sitoplazma ve afferent uzantılarda SULT1A1 immünoaktivitesi görülmektedir. Görüntüler on altı sıçanı temsil etmektedir (sekiz kontrol ve sekiz İAKB). Ölçek çubukları: 50µm.



Resim 4.7. Trigeminal ganglion hücrelerinde SULT1A1 yerleşimi

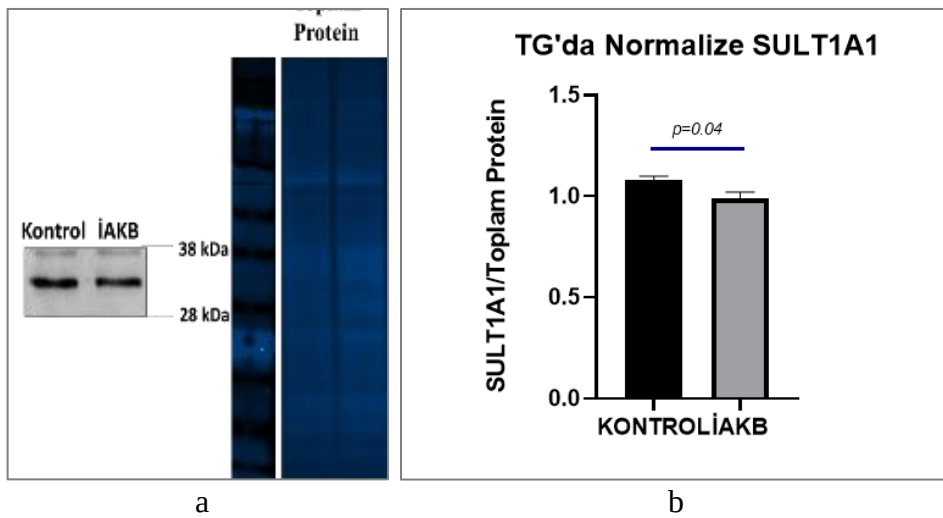
Sıçan trigeminal ganglion kesitleri SULT1A1 (yeşil) ve GS (kırmızı) için çift immünofloresan boyandı. Üst sıra kontrol grubunu alt sıra İAKB grubunu temsil etmektedir. SULT1A1 her iki grupta da nöronlarda immünoaktiftir. Uydu glial hücreler SULT1A1 için negatiftir. İAKB trigeminal ganglion nöronlarında SULT1A1 pozitif hücre dağılımı kontrol grubuna göre daha yoğun görünmektedir.

yoğunluğu kontrol grubuna (A) kıyasla hafif azalmış görünümündedir. Ölçek çubukları: 20 μm . (GS: Glutamin sentetaz)



Resim 4.8. Trigeminal ganglionda SULT1A1 ve TH çift immüno Floresan boyaması

Sıçan trigeminal ganglion kesitleri SULT1A1 (kırmızı) ve TH'a (yeşil) karşı primer antikorlarla çift immüno Floresan boyandı. Üst sıra kontrol grubunu alt sıra İAKB grubunu temsil etmektedir. SULT1A1 ve TH her iki grupta da TG nöronlarında immüno reaktif. Ölçek çubukları: 20 μm . (TH: Tirozin Hidroksilaz)

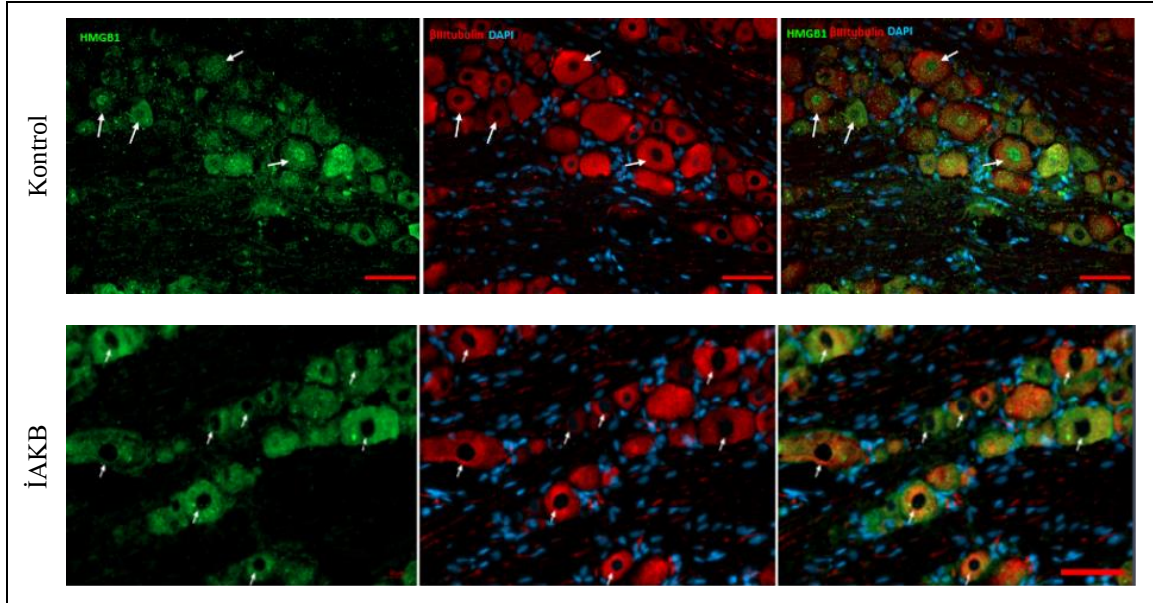


Şekil 4.4. Trigeminal ganglion dokularında SULT1A1 ifadeleri

Western blot ile TG lizatlarında tespit edilen SULT1A1 protein ekspresyon düzeyleri. İAKB grubunda SULT1A1 protein ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla azalmıştır. Üç bağımsız deneyden alınan temsili görüntü gösterilmektedir (a). SULT1A1 ekspresyonunun kantitatif analizi (b), SULT1A1 bant yoğunluklarının toplam protein yoğunluklarına normalizasyonu ile yapılmıştır (a). Veriler $\pm$ SEM olarak gösterilmektedir. Verilerin normalliği Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve istatistiksel analiz t-test ile yapılmıştır ($p=0.04$).

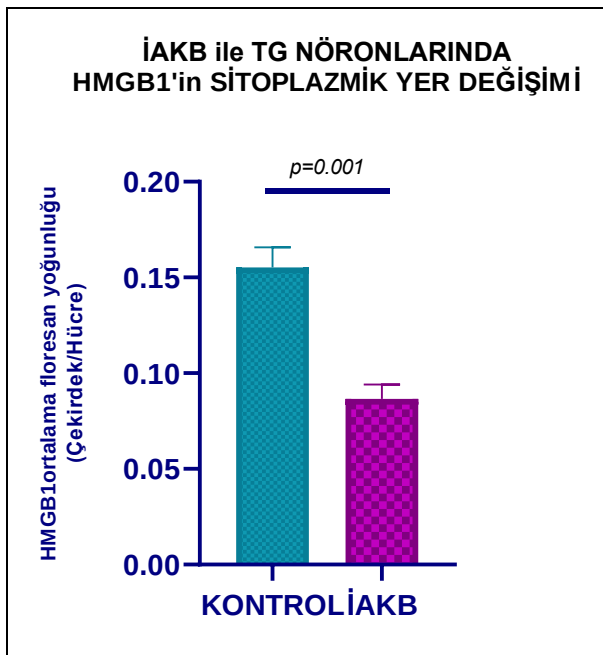
4.2.4. Trigeminal ganglion hücrelerinde HMGB1 yerleşimi, İAKB ile değişimi ve Western blot bulguları

HMGB1'in TG hücrelerindeki yerleşimini tespit etmek için hücre tipine spesifik çift immüno Floresan boyamalar gerçekleştirildi. İmmünohistokimya incelemeleri sonucunda HMGB1'in kontrol grubu trigeminal ganglion nöron ve uydu glial hücrelerinde çekirdeklerde yoğun olmakla birlikte sitoplazmada da yerleştiği görüldü (Resim 4.9, Resim 4.10). Kontrol grubu ile kıyaslandığında piroksikam maruziyeti sonrası gelişen İAKB ile HMGB1 hemen bütün nöronlarda yoğun sitoplazmik immüno reaktivite gösterdi. HMGB1'in kontrol ve İAKB gruplarında hücrealtı yerleşimlerinin farklılık göstermesi nedeniyle çekirdek ve sitoplazma Floresan yoğunlukları ölçüldü. HMGB1'in sitoplazmik taşınmasını kantifiye etmek amacıyla nöron çekirdeklerinin ortalama Floresan yoğunlukları toplam hücrenin ortalama Floresan yoğunluklarına oranı hesaplandı. İAKB grubunda kontrole kıyasla HMGB1' in sitoplazmik translokasyonunda anlamlı artış görüldü (Resim 4.5) İmmünohistokimya bulguları ile paralel olarak trigeminal ganglion doku protein örneklerinde western blot sonuçları İAKB grubunda kontrole kıyasla HMGB1 ifade düzeylerinin istatistiksel anlamlı ($p=0,01$) arttığını gösterdi (Şekil 4.6).



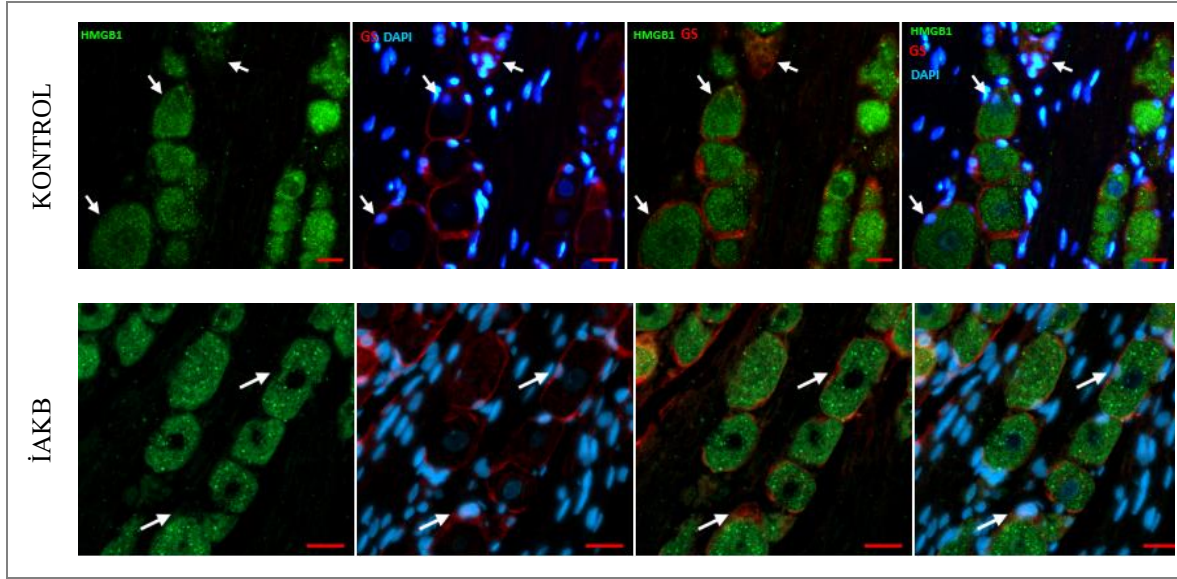
Resim 4.9. Trigeminal ganglion nöronlarında HMGB1 yerleşimi

Kontrol (üst sıra) ve İAKB (alt sıra) trigeminal ganglionları HMGB1 (yeşil) ve nöron belirteci β III tubulin'e (kırmızı) karşı primer antikorlar ile boyandı. Hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile işaretlendi. Oklar nöron çekirdeklerini işaret etmektedir. Kontrol TG nöron çekirdeklerinde yoğun görülen HMGB1 immünoaktivitesinin İAKB grubu nöron çekirdeklerinde azaldığı ve yoğun sitoplazmik reaktivite verildiği görülmektedir. Ölçek çubukları: 20 μ m.



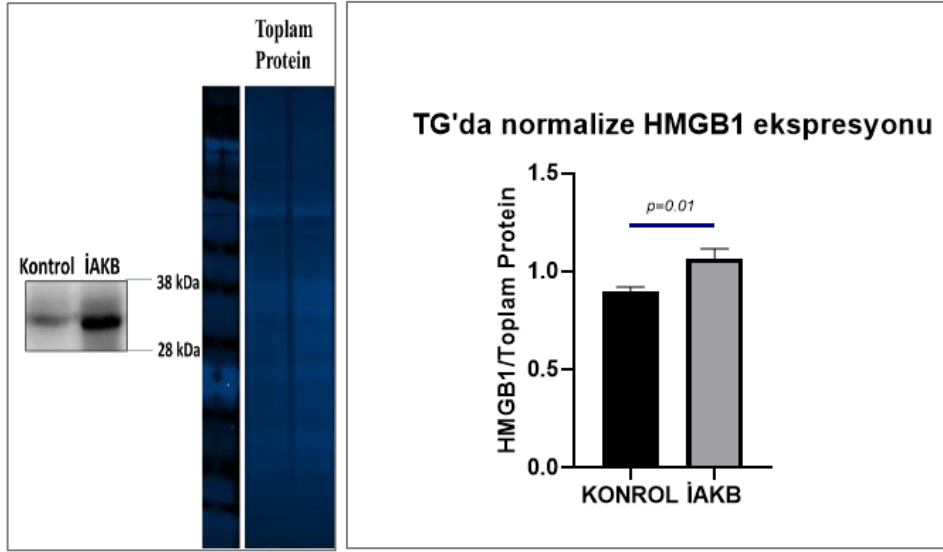
Şekil 4.5. Nükleer HMGB1 floresan yoğunluğunun kantifikasyonu

TG nöronlarında, HMGB1'in sitoplazmaya yer değişiminin ortalama floresan yoğunluklarının analizi İAKB grubunda kontrole kıyasla HMGB1 sitoplazmik translokasyonunun arttığını göstermektedir. Nükleer HMGB1 floresan yoğunluğu hücrenin (çekirdek ve sitoplazma) floresan yoğunluğuna göre normalize edilmiştir; ($p=0,001$). Veriler $\pm$ SEM olarak gösterilmektedir. Verilerin normalliği Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve istatistiksel analiz t-test ile yapılmıştır.



Resim 4.10. Trigeminal ganglion uydu glial hücrelerde HMGB1 yerleşimi

Kontrol ve İAKB trigeminal ganglion kesitleri HMGB1 (yeşil) ve SGC belirteci GS'ye (kırmızı) karşı primer antikorlar ile boyandı. Hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile işaretlendi. HMGB1, kontrol grubu (üst) uydu glial hücre çekirdek ve sitoplazmalarında zayıf immünoreaktivite göstermektedir. İAKB grubunda (alt) HMGB1 SGC sitoplazmalarında immünopozitif, çekirdeklerde ise negatiftir. Oklar SGC çekirdeklerini işaret etmektedir. Ölçek çubukları: 20 μ m. (GS: Glutamin Sentetaz, SGC: Uydu glial hücre)



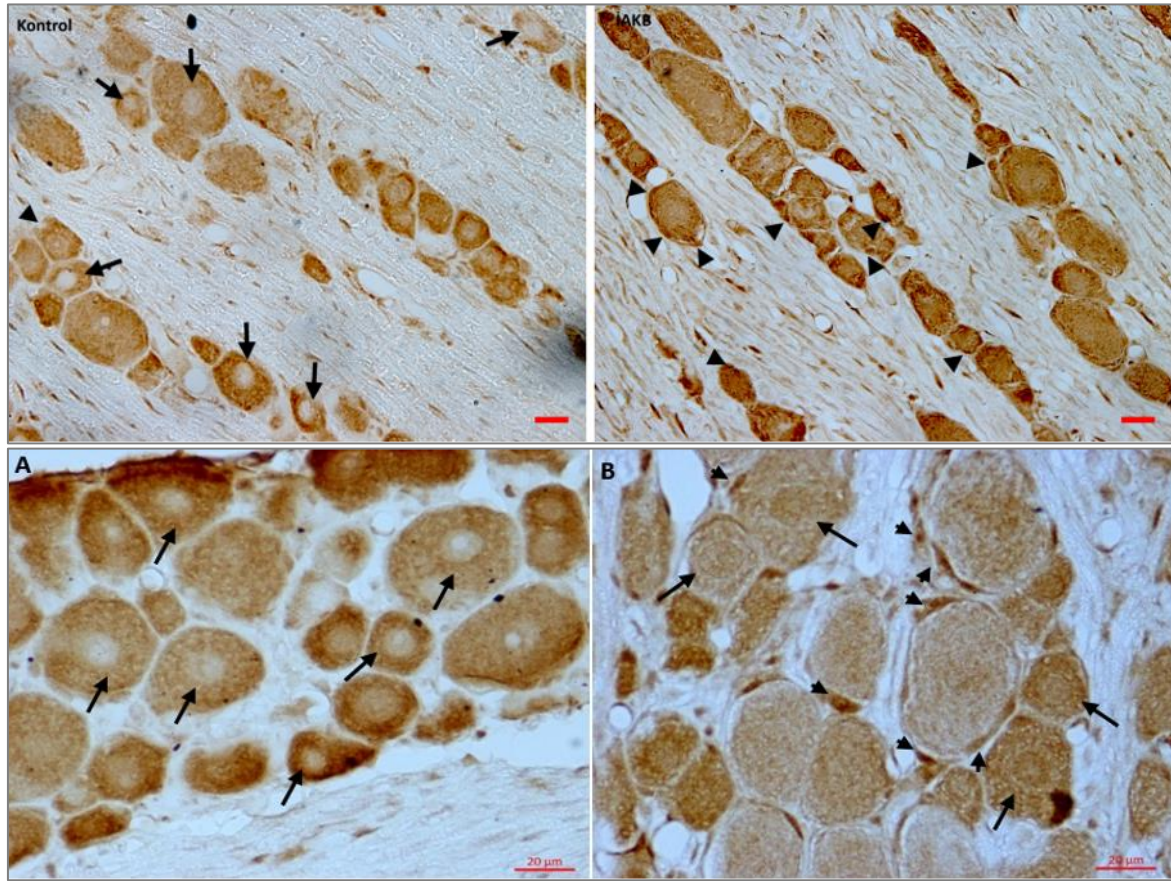
Şekil 4.6. Trigeminal ganglion dokularında HMGB1 ifade düzeyleri

İAKB ve Kontrol grubunun HMGB1 ekspresyonunun Western blot analizi. Üç bağımsız deneyden alınan temsili görüntü gösterilmektedir (a). HMGB1 ekspresyonunun kantitatif analizi (b), HMGB1 bant yoğunluklarının toplam protein yoğunluklarına normalizasyonu ile yapılmıştır. İAKB grubunda HMGB1 protein ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla artmıştır ($p=0,01$). Veriler $\pm$ SEM olarak gösterilmektedir. Verilerin normalliği Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve istatistiksel analiz t-test ile yapılmıştır.

4.2.5. Trigeminal ganglion hücrelerinde HIF1- α yerleşimi, İAKB ile değişimi ve Western blot bulguları

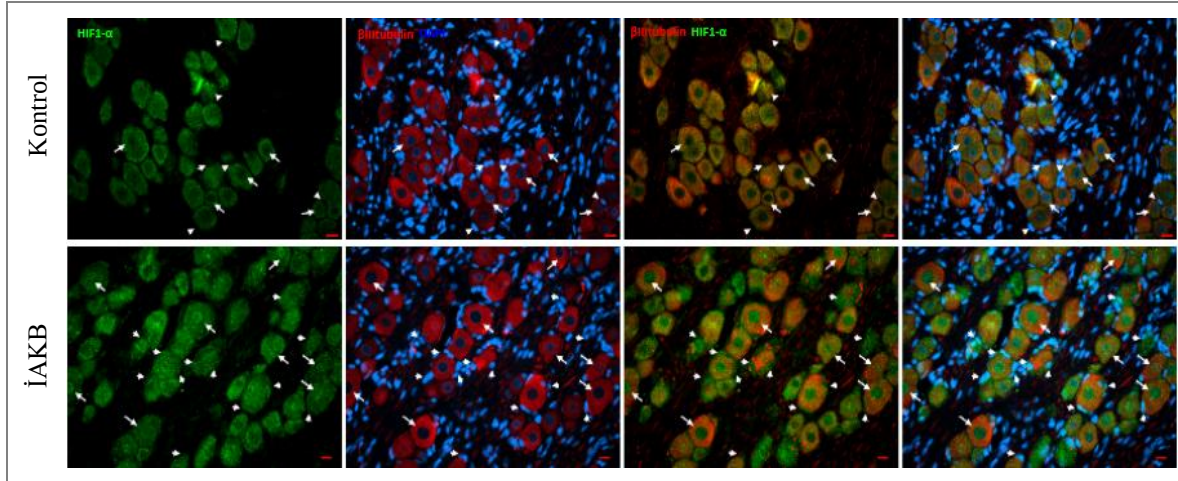
HIF1- α 'nın immünohistokimyasal incelemeleri sonucunda kontrol grubu trigeminal ganglion nöron ve uydu glial hücrelerinde sitoplazmada immünoreaktif olduğu (Resim 4.11.A). Piroksikam maruziyeti sonrası gelişen İAKB ile hem nöronlarda hem de SGC'lerde çekirdeğe translokasyonun arttığı görüldü (Resim 4.11.B). Trigeminal ganglionda HIF-1 α ifade eden hücre tiplerini ve hücre altı yerleşimini belirlemek amacıyla, hücreye özgü belirteçlerle HIF-1 α 'nın çift immünofloresan boyama işlemi gerçekleştirildi. HIF-1 α nöronal belirteç β III-tubulin (Resim 4.12) ve uydu glial hücre belirteci Glutamin Sentetaz (GS) (Resim 4.13) ile birlikte boyandı HIF-1 α , kontrol grubu TG nöronlarında ve nöronları çevreleyen SGC'lerde sitoplazmada zayıf immünoreaktivite gösterirken İAKB grubunda hem nöron hem de SGC'lerde çekirdek translokasyonu ve çekirdekte stabilizasyonu arttığı görüldü (Resim 4.14). HIF- α 'nın sitoplazmadan çekirdeğe taşınmasını kantifiye etmek amacıyla nöronlarda floresan yoğunluk analizi yapıldı. Nöron çekirdeklerin ortalama

floresan yoğunlukları toplam hücrenin ortalama floresan yoğunluklarına oranı İAKB grubunda kontrole kıyasla çekirdek translokasyonunda anlamlı artış gösterdi (Şekil 4.7). HIF1- α ve CGRP çift boyaması; nükleer HIF1- α immünoaktivitesi gösteren TG nöronları CGRP pozitif nöronlarla kolokelize olduğu görüldü (Resim 4.15). Trigeminal ganglion doku protein örneklerinde western blot sonuçlarımız İAKB grubunda kontrole kıyasla HIF1- α ifade düzeylerinin istatistiksel anlamlı ($p=0,01$) arttığını gösterdi (Şekil 4.8).



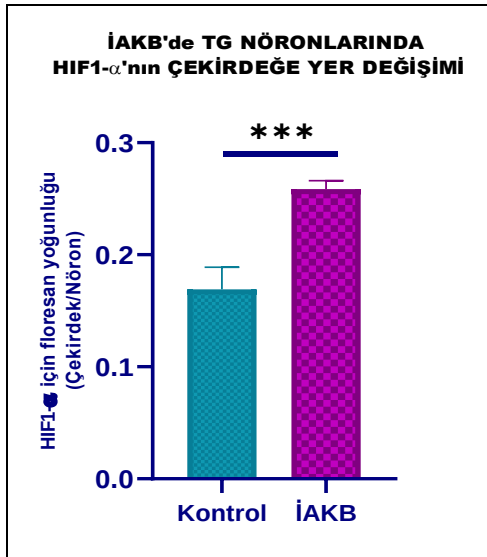
Resim 4.11. Trigeminal ganglion kesitlerinde HIF1- α immünoaktivitesini gösteren temsili mikroyraflar

HIF1- α kontrol grubunda (üst sol ve A) TG nöronlarında sitoplazmik dağılım gösterirken, İAKB grubunda (üst sağ ve B) hem nöronlarda (oklar) hem SGC'lerde (ok başları) çekirdek immünoaktivitesini göstermektedir. Görüntüler grup başına sekiz sıçandan alınan temsili TG mikroskop görüntüleridir. Ölçek çubukları: 20 μ m.



Resim 4.12. Trigeminal ganglion nöronlarında HIF1- α yerleşimi

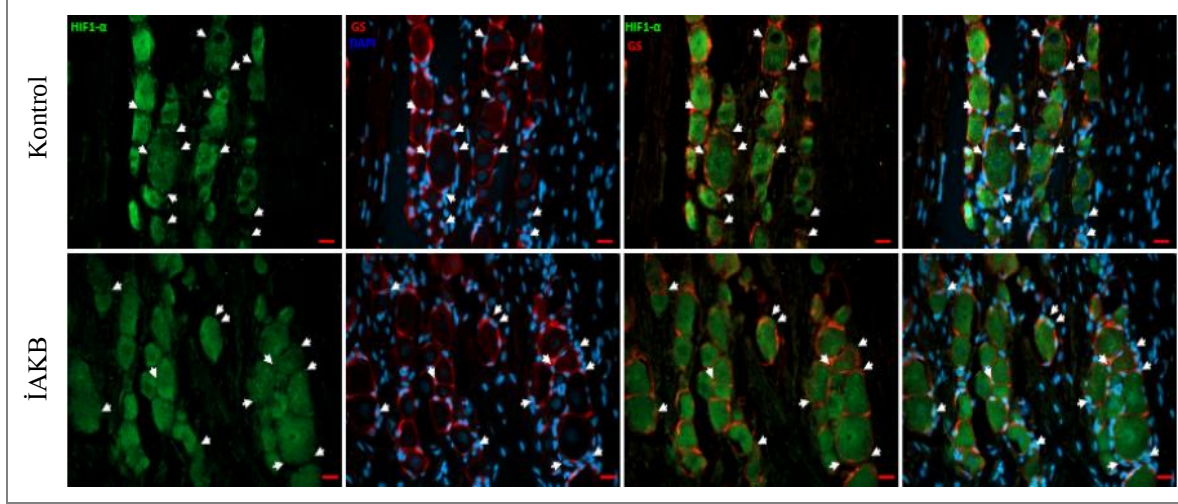
Kontrol (üst sıra) ve İAKB (alt sıra) trigeminal ganglionları HIF1- α (yeşil), nöronal belirteç β III tubulin'e (kırmızı) karşı primer antikorlar ile boyandı. Hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile işaretlendi. HIF-1 α , kontrol grubu TG nöronlarında sitoplazmada zayıf immünoreaktivite göstermektedir. İAKB grubunda HIF1- α nöron çekirdeklerinde yoğun pozitiflik göstermektedir. Oklar nöronları ok başları ise SGC çekirdeklerini işaret etmektedir Ölçek çubukları: 20 μ m.



Şekil 4.7. Nükleer HIF-1 α floresan yoğunluğunun kantifikasyonu

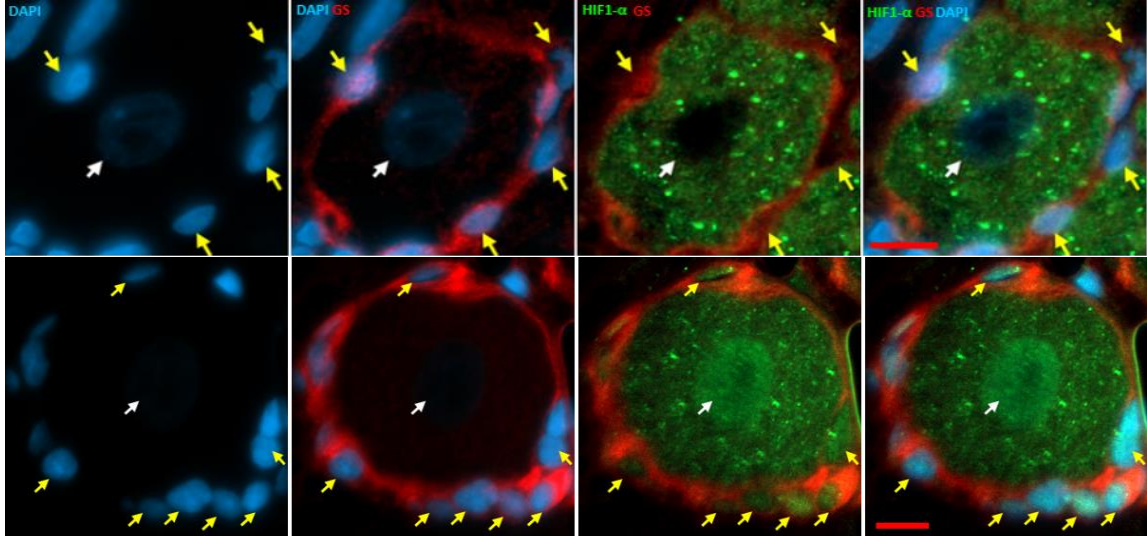
HIF1- α 'nın TG nöronlarında İAKB ile çekirdeğe yer değişiminin ortalama floresan yoğunluklarının analizi İAKB grubunda kontrole kıyasla Hif1 α 'nın sitoplazmadan çekirdeğe doğru artmış translokasyonunu göstermektedir. Nükleer HIF- α floresan yoğunluğu hücrenin

(çekirdek ve sitoplazma) floresan yoğunluğuna göre normalize edilmiştir; $p < 0,001$; Veriler $\pm$ SEM olarak gösterilmektedir. Verilerin normalliği Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve istatistiksel analiz t-test ile yapılmıştır.



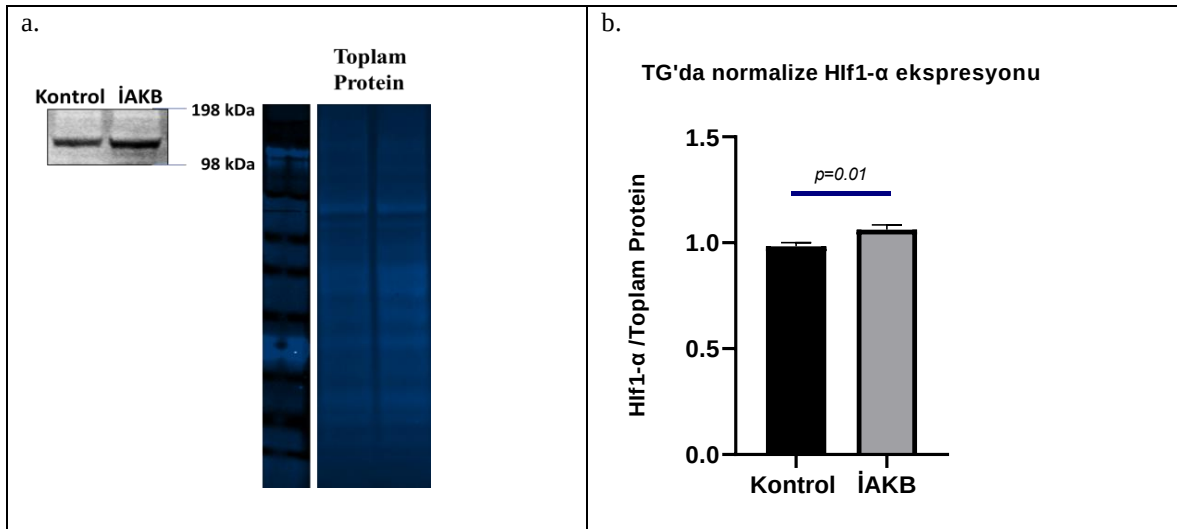
Resim 4.13. Trigeminal ganglion uydu glia hücrelerinde HIF1- α yerleşimi

Kontrol ve İAKB trigeminal ganglion kesitleri HIF1- α (yeşil) ve SGC belirteci GS'ye (kırmızı) karşı primer antikolar ile boyandı. Hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile işaretlendi. HIF-1 α , kontrol grubu (üst) TG uydu glial hücre çekirdeklerinde negatif, sitoplazmada ise zayıf immünoreaktivite göstermektedir. İAKB grubunda (alt) HIF1- α SGC çekirdeklerinde immünopozitifdir. Ok başları SGC çekirdeklerini işaret etmektedir Ölçek çubukları: 20 μ m. (GS: Glutamin Sentetaz, SGC: Uydu glial hücre)



Resim 4.14. Trigeminal ganglion SGC ve nöron hücrelerinde HIF1- α 'nın İAKB ile çekirdeklere yer değişimi

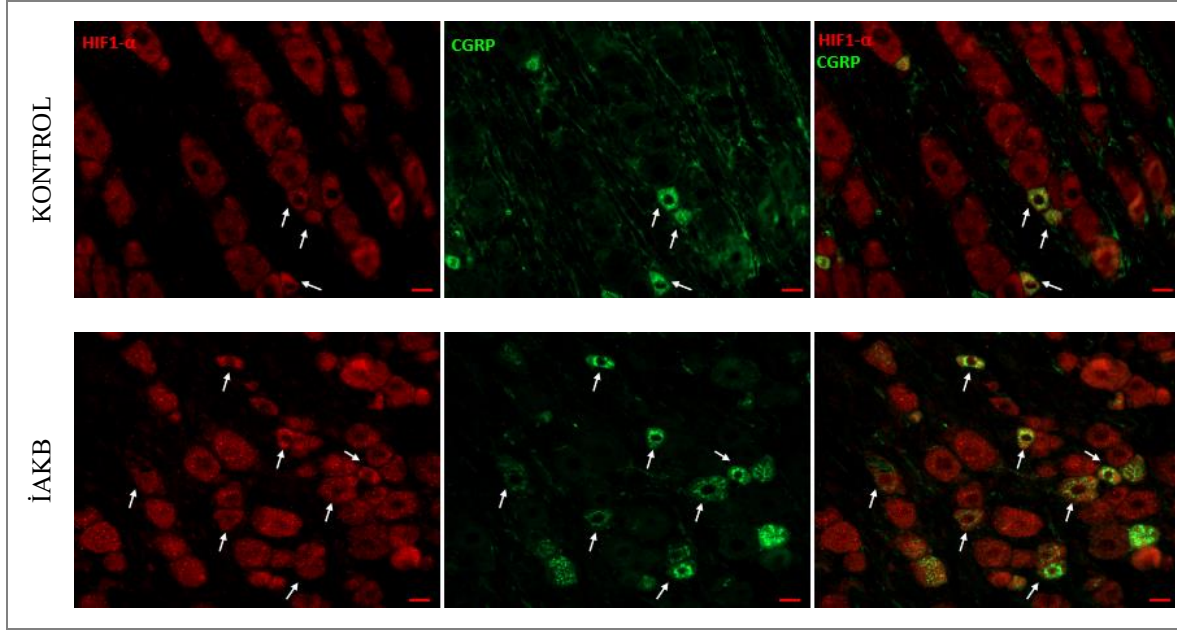
HIF1- α (yeşil) ve SGC belirteci GS (kırmızı) için immüno Floresan çift boyama örneklerinde; Kontrol grubunda (üst) HIF1- α nöron ve SGC çekirdeklerinde immüno reaktiflik göstermezken İAKB grubunda (alt) hem nöron hem de SGC hücre çekirdekleri HIF1- α immüno reaktifdir. Çekirdekler DAPI (mavi) ile işaretlenmiştir. Beyaz oklar nöron çekirdeklerini, sarı oklar ise SGC çekirdeklerini göstermektedir. (Ölçek çubukları: 10 μ m)



Şekil 4.8. Trigeminal ganglion dokularında HIF-1 α ifade düzeyleri

İAKB ve Kontrol grubunun HIF1- α ekspresyonunun Western blot analizi. Üç bağımsız deneyden alınan temsili görüntü gösterilmektedir(a). HIF1- α ekspresyonunun kantitatif analizi (b); HIF1- α bant yoğunluklarının yüklenen toplam protein yoğunluklarına

normalizasyonu ile yapılmıştır. İAKB grubunda HIF1- α protein ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla artmıştır ($p=0,01$). Veriler $\pm$ SEM olarak gösterilmektedir. Verilerin normalliği Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve istatistiksel analiz t-test ile yapılmıştır.



Resim 4.15. Trigeminal ganglionda HIF1- α ve CGRP çift immünofloresan boyaması

Sıçan trigeminal ganglion kesitleri HIF1- α (kırmızı) ve CGRP'ye (yeşil) karşı primer antikorlarla çift immünofloresan boyandı. Oklar nükleer yerleşimli HIF1- α immünoaktif nöronların CGRP ile eş lokalizasyonunu göstermektedir. Üst sıra kontrol grubunu alt sıra İAKB grubunu temsil etmektedir. Ölçek çubukları: 20 μ m.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma ile ilk kez ilaç Aşırı Kullanım Baş ağrısı (İAKB) gelişiminde trigeminal ganglion nöron ve uydu glial hücrelerinin nöroinflamasyon ile ilişkisi gösterilmiştir. Non stereroid anti inflamatuvar olarak seçilen piroksikama beş haftalık maruziyet kafa tımarlama, kafa silkme ve donma gibi ağrı ile ilişkili davranışların artmasına, periorbital mekanik ağrı eşiklerinin azalmasına yol açmıştır. Kullanılan İAKB modelinde klinik ile uyumluluğu arttırmak için ilk kez dişi sıçanlar tercih edildi ve NSAİİ olan Piroksikam ağız yoluyla uygulandı. Ayrıca ağrı eşik değişimini etkileyen menstruel döngüyü kontrol etmek için deney hayvanları döngünün metöstrus ve erken diöstrus günlerinde incelendi. İmmünohistokimyasal çalışmalarda özellikle baş ağrısı ile yakın ilişkili olan trigeminal ganglionun oftalmik dalı incelendi. İAKB patogeneğinde doğal immün yanıt ve alarm proteini HMGB1 ile mitokondrial stres ve inflamatuvar yanıt proteini HIF-1 α 'nın TG nöron ve uydu glial hücrelerde arttığı ve sitoplazma-çekirdek arası translokasyon değişikliklerine yol açtığı gösterildi. Migren patogeneğinde en önemli nöropeptid olan CGRP'nin İAKB'de TG nöronlarında arttığı immünohistokimya ve western blot analizleri ile gösterildi. Ek olarak bu çalışmada ilk kez İAKB gelişiminde trigeminal ganglionda ilaç detoksifikasyonunda görevli sulfotransferaz (SULT1A1) enzim düzeyinin azaldığı tespit edildi.

İAKB hayvan modellerinde mekanik ağrı eşiklerinin değiştiği gösterilmiştir. On bir günlük sumatriptan enjeksiyonu farelerde hem periorbital hem de pençelerde mekanik allodiniyi tetiklemiştir [107]. Bir 5-HT_{1F} ve 5-HT_{1B/1D} reseptör antagonisti olan lasmiditan veya sumatriptanın 2 hafta boyunca uygulanması hem periorbital hem de arka pençelerde önemli kutanöz allodiniye neden olmuştur [108]. NSAİİ ile İAKB modeli ilk defa grubumuz tarafından oluşturulmuştur. İlk çalışmamızda NSAİİ mefenamik asitin intraperitoneal enjeksiyonla dört hafta süreyle uygulanması sıçanlarda periorbital mekanik çekilme eşiklerinde azalma, tımarlanma, donma ve baş sallama sayısında artış ile sonuçlandığını gösterdik [86]. Bu çalışmada ilk kez NSAİİ piroksikamı oral yolla uygulayarak İAKB modeli oluşturduk. Piroksikamın tekrarlanan oral uygulaması periorbital mekanik duyarlılığı arttırdı. Kafa tımarlama, kafa silkme ve donma gibi ağrı benzeri davranışların artması ile sonuçlandı.

Bugüne kadar yapılmış İAKB modeli çalışmaları erkek kemirgenler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Klinikte İAKB kadınlarda 3-4 kat daha fazla görüldüğü için klinik

uyumluluğu arttırmak amacıyla bu çalışmada dişi sıçanlar tercih edilmiştir. Dişi sıçanlarda östrus döngüsü dört evreden oluşmaktadır. Döngünün evrelerine göre değişen östrojen seviyeleri ağrı eşiklerini değiştirmektedir. Proöstrus ve östrus evrelerinde ağrı eşiklerinin azaldığı gösterilmiştir [109]. Bazı migren modellerinde periorbital ağrı eşikleri değerlendirilirken dişi kemirgenlerin döngü evreleri analiz edilmeden çalışma tamamlanmıştır [110]. Bu çalışmada östrus döngüsündeki ağrı eşiklerindeki farklılıkların ağrı davranışına olan etkisini dışlamak için dişi sıçanlar sadece metöstrus ve erken diöstrus günlerinde değerlendirmeye alındı.

Baş ağrısında anahtar rolü olan trigeminal ganglion ve trigeminal sinirin oftalmik dalı bu çalışmanın odağıdır. Trigeminal ganglionların yapısında bipolar nöron somaları ve nöronların etrafını kılıf şeklinde saran merkezi sinir sistemindeki astrositlere benzer görevleri olan uydu glial hücreler yer almaktadır. Sıçanlarda nöronların çapları yaklaşık 10 ila 60 µm arasında değişmektedir ve bunların %90'ından fazlası, çapı 15 ila 35 µm olan küçük ve orta büyüklükteki nöronlardır [70]. Bu çalışmada sıçan TG nöronları çaplarına göre küçük (10-20 µm), orta (21-40µm) ve büyük (40 µm den büyük) nöronlar olmak üzere sınıflandırıldı. Trigeminal nöronlar büyük ve merkezi yerleşmiş çekirdekleri ile belirgin şekilde ayırt edilmektedir. Nöronların etrafı nöronun çapı ve büyüklüğü ile orantılı olarak artan sayıda SGC ile sarılmış durumdadır. İAKB patogeneğinde TG' daki değişiklikler daha önce araştırılmamıştır. Bu çalışmada TG'da nöronlar ve uydu glial hücrelerin İAKB sürecinde inflamatuvar moleküller ve noisepsiyon açısından SULT1A1, CGRP, HMGB1 ve HIF1α moleküllerindeki değişiklikler incelendi.

İlaç ve ksenobiyotiklerin metabolizmasında görevli vücutta yaygın bulunan enzim ailesinden SULT1A1'in TG da hücreyel yerleşimini ve İAKB ile değişimini ilk kez gösterdik. SULT1A1 sıçanlarda merkezi sinir sisteminde sulfotransferazların en önemli izoformudur [111]. Literatürde SULT1A1 ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Önceki çalışmamızda mefenamik asit ile oluşturulan İAKB modelinde beyin dokusunda SULT1A1 enzim aktivitesinin azaldığı ve KYD eşiklerinin düştüğü beyin uyarılabilirliğinin arttığını saptadık. Bu çalışmada ise SULT1A1'in TG'daki hücreyel dağılımı ve İAKB ile olan değişimine odaklandık. SULT1A1'in TG' da sadece nöronlarda yer aldığı ve SGC' lerde bulunmadığı tespit edildi. SULT1A1 immünoreaktivitesinin nöronal sitoplazmada homojen dağıldığı ve küçük, orta, büyük boyuttaki tüm TG nöronlarda mevcut olduğu görüldü. İAKB ile nöronal yerleşiminde değişiklik olmadığı gözlemlendi. SULT1A1 protein miktarının ise

İAKB ile azaldığı tespit edildi. Bu sonuçlar daha önceki mefenamik asit çalışmamız ile benzerlik göstermektedir. TG nöronlarında SULT1A1'in katekolamin sentezinde kritik rolü olan TH ile kolokalize olması SULT1A1 enzim değişikliklerinin nosiseptif ganglion hücrelerinde dopamin gibi nörotransmitterlerin metabolizmasını etkileyeceğine işaret etmektedir. TG'da İAKB sürecinde azalmış olan SULT1A1 nörotransmitter metabolizmasında bozulmaya yol açacak ve nosiseptif uyarının idamesinde rol alacaktır.

Nosiseptif bir nöropeptid olan CGRP'nin TG nöronlarında sentezlenmesi ve trigeminal sinir uçlarından salınması migren baş ağrısında anahtar bir rol oynamaktadır. İAKB hastaları tarafından yaygın olarak kullanılan opioidler, triptanlar ve basit analjezikler gibi ilaçlarla uzun süreli tedavi edilen hayvanlarda P maddesi, CGRP, nitrik oksit (NO) ve serotonin gibi ağrı ile ilişkili moleküllerde değişiklikler olduğunu gösterilmiştir [81], [82], [83]. Birçok klinik ve klinik öncesi çalışma CGRP'nin baş ağrısı sırasında arttığını bildirmiştir [5, 51, 54, 112]. Bu çalışmada trigeminal ganglion nöronlarında perinükleer bölgede baskın olmak üzere küçük ve orta boyutlu nöronların sitoplazmalarında CGRP ifade edildiği görüldü. İAKB ile CGRP pozitif nöron sayısının ve CGRP protein düzeyinin arttığı gösterildi. CGRP'nin trigeminal ganglion uydu glial hücrelerinde bulunmadığı ve İAKB ile bu durumun değişmediği tespit edildi. İAKB ile ortaya çıkan baş ağrısı davranışı ve periorbital ağrı eşiklerindeki azalmaya TG' da CGRP artışının eşlik etmesi trigeminal nosiseptif aktivasyonun varlığını İAKB de doğrulamaktadır. Trigeminal ganglion nöronlarında CGRP ile HIF1a nükleer translokasyonunun kolokalize olması nosiseptif ganglion nöronlarının mitokondrial stres ve inflamatuvar yanıtına işaret etmektedir. Bu anlamlı kolokalizasyonu hem ganglionda hem de İAKB de ilk kez gösterdik.

Hücre dışı yüksek hareketlilik grubu kutu-1 proteini (HMGB1), sinir hasarı ve kanser kaynaklı ağrının patogeneğinde önemli roller oynar. HMGB1, nöbet, iskemi ve kronik ağrı dahil olmak üzere çeşitli patofizyolojik koşullarda nöroinflamatuvar süreçlerin aracılık etmesinde anahtar bir faktör olarak gösterilmiştir COVID-19 baş ağrısında yüksek serum HMGB1 seviyesinin inflamasyonla ilişkisi gösterilmiştir [31, 79, 85, 113]. Ancak, ilaç aşırı kullanım baş ağrısında trigeminal HMGB1'in katılımı daha önce incelenmemiştir. Bununla birlikte, kronik piroksikam maruziyetinin trigeminal ganglionda HMGB1 ekspresyonuna ve salınımına yol açıp açmayacağı bilinmemektedir. Mevcut çalışmada, kronik piroksikam kullanımının trigeminal ganglion nöronlarında ve Uydu Glial hücrelerde HMGB1 ekspresyonunu artırdığını bulduk.

HMGB1, esas olarak çekirdekte bulunan DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve onarımında rol alan nükleer bir proteindir. Hasarla ilişkili herhangi bir tehdit veya stres durumunda sitoplazmaya ve ekstraselüler ortama salınarak güçlü bir proinflamatuvar molekül görevi görmektedir. HMGB1 in TG' da hücreyel yerleşimi daha önce incelenmemiştir. Bulgularımız HMGB1 in TG nöronlarında ve SGC' lerde mevcut olduğunu, nöronal yerleşimin hücre boyutlarına göre belirgin farklılık göstermediğini işaret etti. Kontrol grubu TG' larında hücre çekirdeklerinde baskın olan HMGB1'in İAKB gelişiminde sitoplazmik yerleşiminin belirgin hale geldiği gözlemlendi. HMGB1 protein düzeylerinin de İAKB' de anlamlı artış göstermiş olması hasar ile ilişkili bu alarm proteininin beş haftalık İAKB gelişiminde kronik olarak yüksek kaldığını ve inflamasyonun idamesinde katkısı olduğunu düşündürmektedir. Alarm durumunda sitoplazmaya geçerek HMGB1'in hasar-stres tehdidine karşı hücreyi koruyucu rolünün devreye girdiği de dikkate alınmalıdır [113]. Beş haftalık sürede gelişen İAKB patogeneğinde TG nöronlarında HMGB1 artışı ve sitoplazmik yer değişimi kronik bir stres ve tehdit algısı karşısında hücre hasarını azaltmaya ve hücreyi korumaya yönelik aktivasyona işaret edebilir. Öte yandan ekstraselüler HMGB1'in güçlü proinflamatuvar rolü de İAKB' de kronik baş ağrısının idamesinde rol oynayabilir.

İAKB'li kronik migren hastalarında LPS, HMGB1, HIF-1 α , IL-6 ve CGRP serum düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Bağırsak geçirgenliğinin artması ile doğuştan gelen bağışıklık ve proinflamatuvar, nosiseptif yanıtın artmasının İAKB'nin trigeminal duyarlılığında ve patofizyolojisinde rol oynayabileceği öngörülmüştür [19]. Önceki çalışmalarımızda farklı ilaçlarla İAKB modellerinde sistemik dolaşımdaki inflamatuvar molekül artışları ve beyin dokusunda inflamasyon gösterildi. Kronik migrenli İAKB hastalarında serumda LPS, LBP, VE-cadherin, occludin, HMGB1, HIF-1 α , IL-6 ve CGRP serum seviyelerinin yükselmesi bağırsak aşırı geçirgenliği ve inflamatuvar yanıtın hastalarda ilk kez kanıtlanmasını sağlamıştır. Bağırsak geçirgenliğinde artışın ve buna bağlı nosiseptif ve/veya inflamatuvar yanıtın, NSAİİ aşırı kullanım baş ağrısının nörobiyolojisinde potansiyel bir altta yatan faktör olabileceğini göstermiştir.

Farklı NSAİİ'ler ile oluşturduğumuz İAKB modellerinde dişi ve erkek sıçanlarda yüksek serum LBP ve occludin seviyeleri ile beyinde HMGB1 ve IL-17'nin artan seviyeleri, sızdıran bağırsak ile ilişkili beyinde inflamasyonun kanıtı olarak yayınladık [53], [54]. Mevcut çalışma inflamasyonun yalnızca geçirgen bağırsak ile ilişkili olarak sistemik dolaşımdan kaynaklanan değil aynı zamanda trigeminal ganglionun kendisinde de ekstraselüler ortama

salınan HMGB1'in İAKB patogenezinde baş ağrısının sürdürülmesinde rolü olduğunu göstermektedir.

Hipoksi ile indüklenen faktör (HIF-1) hücredeki oksijen seviyesine yanıt olarak hücresel sağkalımla ilgili önemli bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1'in aktivasyonu oksijene duyarlı "α" alt biriminin stabilizasyonuna bağlıdır. Normoksik koşullarda sitoplazmik HIF-1α alt birimi düzenli olarak yıkıma uğramaktadır. Oksijen seviyesindeki azalma ile HIF-1α proteolitik olarak yıkılamaz ve birikerek çekirdeğe yer değiştirip "β" alt birimiyle birleşerek HIF-1'in aktivasyonunu sağlar. HIF-1'in sadece hipoksi ile değil inflamatuvar koşullar altında sürekli NO oluşumu ile hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit anyonu (O₂⁻) ve hidroksil radikali (.OH) birikimi ile de aktivasyonunun sağlandığı gösterilmiştir [49], [48]. Çalışmamızda HIF-1α immünoaktivitesi hem nöronlar hem de SGC hücrelerinde pozitif bulundu. HIF-1α kontrol grubunda zayıf sitoplazmik yerleşim gösterirken, İAKB grubunda uzun süreli ve düzenli piroksikam maruziyeti çekirdeğe translokasyonun artmasına neden oldu. HIF-1α protein ekspresyon seviyeleri İAKB'de kontrol grubuna göre yüksek bulundu. HIF1 a değişimleri, mitokondriyal disfonksiyon aşırı ROS üretimi ve oksidatif stresle ilişkili olabilir. HIF-1α, hipoksik koşullara uyumu aynı zamanda mitokondriyal fonksiyonu ve metabolizmayı düzenler. HIF-1α mitokondri aracılı oksidatif stresin zararlı etkilerini telafi etmek için salınır.

HIF-1α'nın migrendeki rolü, farelerde Nitrogliserin (NTG) ile oluşturulan kronik migren modelinde HIF1'i aktive eden prolyl hidroksilaz inhibitörü Roxadustat uygulamasının migren benzeri davranışları iyileştirdiği ve esas olarak HIF-1α/NF-κB inflamatuvar yolunun aracılık ettiği merkezi ağrı duyarlılığının inhibe edildiği ve yine NF-κB yoluyla serum ve kaudal trigeminal çekirdek (TNC) içindeki inflamatuvar sitokin seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir [50].

Serumda HIF-1α artışının, migren baş ağrısı kronikleşmesinde mitokondriyal stres ve inflamasyonun ile ilişkili olabilir. Yakın zamanda migrenli ilaç kullanmayan çocuklarda yüksek HIF-1α, FGF-21, GDF-15, CGRP ve PACAP-38 eşlik ettiği gösterilmiştir Mitokondriyal metabolizmanın ve migrenle ilişkili CGRP ve PACAP-38 gibi nöropeptidlerin düzenleyicisi olan HIF-1α'nın migren atakları sırasında dolaşımda artmış seviyeleri bu nöropeptid düzeyleriyle pozitif korelasyon göstermiştir [112]. HIF-1α

düzeyleri İAKB'li kronik migren hastalarında yüksek bulunmuştur. HIF-1 α 'daki artış kronik migrende mitokondriyal sıkıntı ve inflamasyonla ilişkili olabilir [51].

Güncel çalışmalar ışığında İAKB de varlığı gösterilen sistemik dolaşımdaki inflamasyon ve bu çalışmada gösterilen trigeminal ganglion inflamasyonu arasındaki olası bağlantı mekanizmaları araştırılmaya değerdir. İAKBde trigeminal duyarlılaşma ve nosiseptif yanıtın devamlılığında nöroinflamasyon ile ilaç ve nörotransmitter metabolizmasındaki bozulma katkıda bulunabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu çalışmada ilk kez ilaç Aşırı Kullanım Baş ağrısı (İAKB) gelişiminde trigeminal ganglion nöron ve uydu glia hücreleri incelendi ve nöroinflamasyonla ilişkisi gösterildi.
2. Kullanılan İAKB modelinin klinik uyumluluğunu arttırmak için ilk kez dişi sıçanlar tercih edildi ve NSAİİ olan Piroksikam ağız yoluyla uygulandı. Ayrıca ağrı eşik değişimini etkileyen menstruel döngüyü kontrol etmek için deney hayvanları döngünün metöstrus ve erken diöstrus günlerinde incelendi.
3. Ağrı ile ilişkili davranış deneyleri İAKB grubunda tımarlama süreleri ve kafa silkme sayılarının arttığını gösterdi. Periorbital mekanik ağrı eşikleri İAKB grubunda kontrole kıyasla anlamlı azaldı.
4. İmmünohistokimyasal çalışmalarda özellikle baş ağrısı ile yakın ilişkili olan trigeminal ganglionun oftalmik dalı incelendi.
5. İAKB patogenezinde doğal immün yanıt ve alarm proteini HMGB1 ile mitokondriyal stres ve inflamatuvar yanıt proteini HIF-1 α 'nın trigeminal ganglion nöronları ve uydu glial hücrelerde arttığı ve çekirdek-sitoplazma arası translokasyon değişimleri gösterildi.
6. Bu çalışmada İAKB 'nin patogenezinde trigeminal ganglionda ilaç detoksifikasyonunda görevli sulfotransferaz (SULT1A1) enzimin miktarında azalma tespit edildi.
7. SULT1A1'in; TG nöron sitoplazmalarında yerleştiği, uydu glia (SGC) hücrelerinde bulunmadığı görüldü. İAKB grubunda SULT1A1'in kontrole kıyasla azaldığı saptandı.
8. CGRP pozitif hücrelerin trigeminal ganglion nöronları olduğu saptandı. CGRP immünoreaktif nöron sayısı İAKB grubunda kontrole kıyasla istatistiksel anlamlı arttı.
9. HMGB1 immünoreaktivitesi ise nöronlar ve SGC hücrelerinde pozitif bulundu. HMGB1; TG nöronları ve uydu glia hücrelerinde (SGC) sitoplazma ve çekirdekte yerleşirken İAKB'de sitoplazmik translokasyon arttı. Western blot çalışması ise İAKB grubunda kontrole kıyasla HMGB1 protein miktarının arttığına işaret etti.
10. HIF-1 α immünoreaktivitesi hem nöronlar hem de SGC hücrelerinde pozitif bulundu. HIF-1 α kontrol grubunda baskın olarak sitoplazmik yerleşim gösterirken, İAKB grubunda uzun süreli ve düzenli piroksikam maruziyeti çekirdeğe translokasyonun artmasına neden oldu. HIF-1 α protein ekspresyon seviyeleri İAKB'de kontrol grubuna göre yüksek bulundu.
11. İAKB; TG nöron ve uydu glial hücrelerde belirgin nöroinflamasyona ve nosiseptif nöronlarda ağrı ile ilişkili nöropeptid CGRP artışına aynı zamanda SULT1A1

azalmasına yol açmaktadır. İAKB' de trigeminal duyarlılaşma ve nosiseptif yanıtın devamlılığında nöroinflamasyon ile ilaç ve nörotransmitter metabolizmasındaki bozulma katkıda bulunabilir.

KAYNAKLAR

1. Bigal, M. E., and Lipton, R. B. (2009). The epidemiology, burden, and comorbidities of migraine. *Neurologic clinics*, 27(2), 321-334.
2. Diener, H. C., Dodick, D., Evers, S., Holle, D., Jensen, R. H., Lipton, R. B., and Schwedt, T. (2019). Pathophysiology, prevention, and treatment of medication overuse headache. *The Lancet Neurology*, 18(9), 891-902.
3. Westergaard, M. L., Hansen, E. H., Glümer, C., Olesen, J., and Jensen, R. H. (2014). Definitions of medication-overuse headache in population-based studies and their implications on prevalence estimates: a systematic review. *Cephalalgia*, 34(6), 409-425.
4. Diener, H. C., Dodick, D., Evers, S., Holle, D., Jensen, R. H., Lipton, R. B., and Schwedt, T. (2019). Pathophysiology, prevention, and treatment of medication overuse headache. *The Lancet Neurology*, 18(9), 891-902.
5. Felice, M. D., and Porreca, F. (2009). Opiate-induced persistent pronociceptive trigeminal neural adaptations: potential relevance to opiate-induced medication overuse headache. *Cephalalgia*, 29(12), 1277-1284.
6. Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society. (2004). The international classification of headache disorders. *cephalalgia*, 24(1), 9-160.
7. De Felice, M., Ossipov, M. H., and Porreca, F. (2011). Persistent medication-induced neural adaptations, descending facilitation, and medication overuse headache. *Current Opinion in Neurology*, 24(3), 193-196.
8. De Felice, M., Ossipov, M. H., Wang, R., Dussor, G., Lai, J., Meng, I. D., and Porreca, F. (2010). Triptan-induced enhancement of neuronal nitric oxide synthase in trigeminal ganglion dural afferents underlies increased responsiveness to potential migraine triggers. *Brain*, 133(8), 2475-2488.
9. De Felice, M., Ossipov, M. H., Wang, R., Lai, J., Chichorro, J., Meng, I., and Porreca, F. (2010). Triptan-induced latent sensitization: A possible basis for medication overuse headache. *Annals of neurology*, 67(3), 325-337.
10. Iyengar, S., Johnson, K. W., Ossipov, M. H., and Aurora, S. K. (2019). CGRP and the trigeminal system in migraine. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 59(5), 659-681.
11. Edvinsson, L. (2011). Tracing neural connections to pain pathways with relevance to primary headaches. *Cephalalgia*, 31(6), 737-747.
12. Falany, C. N. (1991). Molecular enzymology of human liver cytosolic sulfotransferases. *Trends in pharmacological sciences*, 12, 255-259.
13. Dooley, T. P., Obermoeller, R. D., Leiter, E. H., Chapman, H. D., Falany, C. N., Deng, Z., and Siciliano, M. J. (1993). Mapping of the phenol sulfotransferase gene (STP) to human chromosome 16p12. 1-p11. 2 and to mouse chromosome 7. *Genomics*, 18(2), 440-443.

14. Hempel, N., Gamage, N., Martin, J. L., and McManus, M. E. (2007). Human cytosolic sulfotransferase SULT1A1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(4), 685-689.
15. Richard, K., Hume, R., Kaptein, E., Stanley, E. L., Visser, T. J., and Coughtrie, M. W. (2001). Sulfation of thyroid hormone and dopamine during human development: ontogeny of phenol sulfotransferases and arylsulfatase in liver, lung, and brain. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(6), 2734-2742.
16. Salman, E. D., Kadlubar, S. A., and Falany, C. N. (2009). Expression and localization of cytosolic sulfotransferase (SULT) 1A1 and SULT1A3 in normal human brain. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(4), 706-709.
17. Nowell, S., and Falany, C. N. (2006). Pharmacogenetics of human cytosolic sulfotransferases. *Oncogene*, 25(11), 1673-1678.
18. Hart, R. F., Renskers, K. J., Nelson, E. B., and Roth, J. A. (1979). Localization and characterization of phenol sulfotransferase in human platelets. *Life sciences*, 24(2), 125-130.
19. Young Jr, W. F., Gorman, C. A., and Weinshilboum, R. M. (1988). Triiodothyronine: a substrate for the thermostable and thermolabile forms of human phenol sulfotransferase. *Endocrinology*, 122(5), 1816-1824.
20. Teubner, W., Meinel, W., Florian, S., Kretzschmar, M., and Glatt, H. (2007). Identification and localization of soluble sulfotransferases in the human gastrointestinal tract. *Biochemical Journal*, 404(2), 207-215.
21. Zou, J., Pentney, R., and Roth, J. A. (1990). Immunohistochemical detection of phenol sulfotransferase-containing neurons in human brain. *Journal of neurochemistry*, 55(4), 1154-1158.
22. Alnouti, Y., and Klaassen, C. D. (2006). Tissue distribution and ontogeny of sulfotransferase enzymes in mice. *Toxicological sciences*, 93(2), 242-255.
23. Falany, C. N., Xie, X., Wang, J., Ferrer, J., and Falany, J. L. (2000). Molecular cloning and expression of novel sulphotransferase-like cDNAs from human and rat brain. *Biochemical Journal*, 346(3), 857-864.
24. Mao, D., Zheng, Y., Xu, F., Han, X., and Zhao, H. (2022). HMGB1 in nervous system diseases: A common biomarker and potential therapeutic target. *Frontiers in Neurology*, 13, 1029891.
25. Peek, V., Harden, L. M., Damm, J., Aslani, F., Leisengang, S., Roth, J., and Rummel, C. (2021). LPS primes brain responsiveness to high mobility group box-1 protein. *Pharmaceuticals*, 14(6), 558.
26. Deng, M., Scott, M. J., Fan, J., and Billiar, T. R. (2019). Location is the key to function: HMGB1 in sepsis and trauma-induced inflammation. *Journal of leukocyte biology*, 106(1), 161-169.

27. Isackson, P. J., Bidney, D. L., Reeck, G. R., Neihart, N. K., and Bustin, M. (1980). High mobility group chromosomal proteins isolated from nuclei and cytosol of cultured hepatoma cells are similar. *Biochemistry*, 19(19), 4466-4471.
28. Sapojnikova, N., Maman, J., Myers, F. A., Thorne, A. W., Vorobyev, V. I., and Crane-Robinson, C. (2005). Biochemical observation of the rapid mobility of nuclear HMGB1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1729(1), 57-63.
29. Andersson, U., Yang, H., and Harris, H. (2018, August). High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells. *Seminars in Immunology*, 38, 40-48).
30. Tang, D., Billiar, T. R., and Lotze, M. T. (2012). A Janus tale of two active high mobility group box 1 (HMGB1) redox states. *Molecular medicine*, 18, 1360-1362.
31. Kang, R., Chen, R., Zhang, Q., Hou, W., Wu, S., Cao, L., and Tang, D. (2014). HMGB1 in health and disease. *Molecular aspects of medicine*, 40, 1-116.
32. Andersson, U., and Tracey, K. J. (2011). HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annual review of immunology*, 29(1), 139-162.
33. Eskandani, M., Vandghanooni, S., Barar, J., Nazemiyeh, H., and Omid, Y. (2017). Cell physiology regulation by hypoxia inducible factor-1: Targeting oxygen-related nanomachineries of hypoxic cells. *International journal of biological macromolecules*, 99, 46-62.
34. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the national academy of sciences*, 92(12), 5510-5514.
35. Chen, H., Ma, D., Yue, F., Qi, Y., Dou, M., Cui, L., and Xing, Y. (2022). The potential role of hypoxia-inducible factor-1 in the progression and therapy of central nervous system diseases. *Current Neuropharmacology*, 20(9), 1651.
36. Hellwig-Bürgel, T. (2009). HIF-1 and Neuroinflammation. M. D. Binder, N. Hirokawa, and U. Windhorst (Eds.). *Encyclopedia of Neuroscience*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1836-1839.
37. Siddiq, A., Aminova, L. R., and Ratan, R. R. (2007). Hypoxia inducible factor prolyl 4-hydroxylase enzymes: center stage in the battle against hypoxia, metabolic compromise and oxidative stress. *Neurochemical research*, 32, 931-946.
38. Semenza, G. L. (2001). Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends in molecular medicine*, 7(8), 345-350.
39. Gleadle, J. M., and Ratcliffe, P. J. (1998). Hypoxia and the regulation of gene expression. *Molecular medicine today*, 4(3), 122-129.
40. Wang, G. L., and Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1 (*). *Journal of biological chemistry*, 270(3), 1230-1237.

41. Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., and Semenza, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30), 17771-17778.
42. Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M., and Bunn, H. F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 271(50), 32253-32259.
43. Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., and Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733), 271-275.
44. Zhou, J., Schmid, T., and Brune, B. (2003). Tumor necrosis factor- α causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1 α through a nuclear factor- κ B-dependent pathway. *Molecular biology of the cell*, 14(6), 2216-2225.
45. Sandau, K. B., Zhou, J., Kietzmann, T., and Brüne, B. (2001). Regulation of the hypoxia-inducible factor 1 α by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor- α in contrast to desferroxamine and phenylarsine oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39805-39811.
46. Jung, Y. J., Isaacs, J. S., Lee, S., Trepel, J., and Neckers, L. (2003). IL-1 β mediated up-regulation of HIF-1 α via an NF κ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *The FASEB Journal*, 17(14), 2115-2117.
47. Wiener, C. M., Booth, G., and Semenza, G. L. (1996). In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical and biophysical research communications*, 225(2), 485-488.
48. Sandau, K. B., Fandrey, J., and Brüne, B. (2001). Accumulation of HIF-1 α under the influence of nitric oxide. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 97(4), 1009-1015.
49. Haddad, J. J., and Land, S. C. (2001). A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF- α -dependent regulation of HIF-1 α . *FEBS letters*, 505(2), 269-274.
50. Yang, D. G., Gao, Y. Y., Yin, Z. Q., Wang, X. R., Meng, X. S., Zou, T. F., and Yang, X. X. (2023). Roxadustat alleviates nitroglycerin-induced migraine in mice by regulating HIF-1 α /NF- κ B/inflammation pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 44(2), 308-320.
51. Vuralli, D., Ceren Akgor, M., Gok Dagidir, H., Gulbahar, O., Yalinay, M., and Bolay, H. (2024). Lipopolysaccharide, VE-cadherin, HMGB1, and HIF-1 α levels are elevated in the systemic circulation in chronic migraine patients with medication overuse headache: evidence of leaky gut and inflammation. *The journal of headache and pain*, 25(1), 23.
52. Bolay, H., Karadas, Ö., Oztürk, B., Sonkaya, R., Tasdelen, B., Bulut, T. D., and Baykan, B. (2021). HMGB1, NLRP3, IL-6 and ACE2 levels are elevated in COVID-19 with headache: a window to the infection-related headache mechanism. *The Journal of Headache and Pain*, 22(1), 94.

53. Dağdır, H. G., Topa, E., Vuralli, D., and Bolay, H. (2023). Medication overuse headache is associated with elevated lipopolysaccharide binding protein and pro-inflammatory molecules in the bloodstream. *The Journal of Headache and Pain*, 24(1), 150.
54. Vuralli, D., Dağdır, H. G., Topa, E. A., and Belen, H. B. (2024). Leaky gut and inflammatory biomarkers in a medication overuse headache model in male rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 54(1), 33-41.
55. Torres-Ferrús, M., Ursitti, F., Alpuente, A., Brunello, F., Chiappino, D., de Vries, T., and School of Advanced Studies of European Headache Federation (EHF-SAS). (2020). From transformation to chronification of migraine: pathophysiological and clinical aspects. *The journal of headache and pain*, 21, 1-12.
56. Goadsby, P. J., and Holland, P. R. (2019). An Update: Pathophysiology of Migraine. *Neurologic clinics*, 37(4), 651-671.
57. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. (2018). *Cephalalgia : an International Journal of Headache*, 38(1), 1–211.
58. Coppola, G., Currà, A., Di Lorenzo, C., Parisi, V., Gorini, M., Sava, S. L., and Pierelli, F. (2010). Abnormal cortical responses to somatosensory stimulation in medication-overuse headache. *BMC neurology*, 10, 1-9.
59. Grazzi, L., Chiapparini, L., Ferraro, S., Usai, S., Andrasik, F., Mandelli, M. L., and Bussone, G. (2010). Chronic migraine with medication overuse pre–post withdrawal of symptomatic medication: clinical results and fMRI correlations. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 50(6), 998-1004.
60. Fumal, A., Laureys, S., Di Clemente, L., Boly, M., Bohotin, V., Vandenheede, M., and Schoenen, J. (2006). Orbitofrontal cortex involvement in chronic analgesic-overuse headache evolving from episodic migraine. *Brain*, 129(2), 543-550.
61. Perrotta, A., Serrao, M., Sandrini, G., Burstein, R., Sances, G., Rossi, P., and Nappi, G. (2010). Sensitisation of spinal cord pain processing in medication overuse headache involves supraspinal pain control. *Cephalalgia*, 30(3), 272-284.
62. Ayzenberg, I., Obermann, M., Nyhuis, P., Gastpar, M., Limmroth, V., Diener, H. C., and Katsarava, Z. (2006). Central sensitization of the trigeminal and somatic nociceptive systems in medication overuse headache mainly involves cerebral supraspinal structures. *Cephalalgia*, 26(9), 1106-1114.
63. Zwart, J. A., Dyb, G., Hagen, K. M. D. P., Svebak, S., and Holmen, J. M. D. P. (2003). Analgesic use: a predictor of chronic pain and medication overuse headache: the head–HUNT study. *Neurology*, 61(2), 160-164.
64. Sharav, Y., and Benoliel, R. (Eds.) (2008). Migraine and possible facial variants (neurovascular orofacial pain), Chapter 9. In: *Orofacial Pain and Headache*. Edinburgh: Mosby Elsevier, 193-224.

65. Huff, T., Weisbrod, L. J., and Daly, D. T. (2024). *Neuroanatomy, Cranial Nerve 5 (Trigeminal)*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC., 79-83.
66. Spekker, E., Nagy-Grócz, G., and Vécsei, L. (2023). Ion channel disturbances in migraine headache: exploring the potential role of the Kynurenine System in the context of the trigeminovascular system. *International journal of molecular sciences*, 24(23), 16574.
67. Glenn, J. A., Sonceau, J. B., Wynder, H. J., and Thomas, W. (1993). Histochemical evidence for microglia-like macrophages in the rat trigeminal ganglion. *Journal of anatomy*, 183(3), 475-481.
68. LaGuardia, J. J., Cohrs, R. J., and Gilden, D. H. (2000). Numbers of neurons and non-neuronal cells in human trigeminal ganglia. *Neurological research*, 22(6), 565-566.
69. Wotherspoon, G., and Priestley, J. V. (1999). Expression of the 5-HT_{1B} receptor by subtypes of rat trigeminal ganglion cells. *Neuroscience*, 95(2), 465-471.
70. Lennerz, J. K., Rühle, V., Ceppa, E. P., Neuhuber, W. L., Bunnett, N. W., Grady, E. F., and 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.
71. Milosavljević, A., Jančić, J., Mirčić, A., Dožić, A., Boljanović, J., Milisavljević, M., and Četković, M. (2021). Morphological and functional characteristics of satellite glial cells in the peripheral nervous system. *Folia Morphologica*, 80(4), 745-755.
72. Milosavljević, A., Jančić, J., Mirčić, A., Dožić, A., Boljanović, J., Milisavljević, M., and Četković, M. (2021). Morphological and functional characteristics of satellite glial cells in the peripheral nervous system. *Folia Morphologica*, 80(4), 745-755.
73. Pannese, E. (2002). Perikaryal surface specializations of neurons in sensory ganglia. *International review of cytology*, 220, 1-34.
74. Messlinger, K., Balcziak, L. K., and Russo, A. F. (2020). Cross-talk signaling in the trigeminal ganglion: role of neuropeptides and other mediators. *Journal of neural transmission*, 127(4), 431-444.
75. Eftekhari, S., Salvatore, C. A., Calamari, A., Kane, S. A., Tajti, J., and Edvinsson, L. (2010). Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human trigeminal ganglion. *Neuroscience*, 169(2), 683-696.
76. Thalakoti, S., Patil, V. V., Damodaram, S., Vause, C. V., Langford, L. E., Freeman, S. E., and Durham, P. L. (2007). Neuron–glia signaling in trigeminal ganglion: implications for migraine pathology. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 47(7), 1008-1023.
77. Edvinsson, L., Haanes, K. A., and Warfvinge, K. (2019). Does inflammation have a role in migraine?. *Nature Reviews Neurology*, 15(8), 483-490.

78. Perini, F., D'Andrea, G., Galloni, E., Pignatelli, F., Billo, G., Alba, S., and Toso, V. (2005). Plasma cytokine levels in migraineurs and controls. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 45(7), 926-931.
79. Franceschini, A., Vilotti, S., Ferrari, M. D., Van Den Maagdenberg, A. M., Nistri, A., and Fabbretti, E. (2013). TNF α levels and macrophages expression reflect an inflammatory potential of trigeminal ganglia in a mouse model of familial hemiplegic migraine. *PloS one*, 8(1), e52394.
80. Spekker, E., Fejes-Szabó, A., and Nagy-Grócz, G. (2024). Models of Trigeminal Activation: Is There an Animal Model of Migraine?. *Brain Sciences*, 14(4), 317.
81. Ferrari, A., Baraldi, C., and Sternieri, E. (2015). Medication overuse and chronic migraine: a critical review according to clinical pharmacology. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 11(7), 1127-1144.
82. Srikiatkachorn, A., Tarasub, N., and Govitrapong, P. (2000). Effect of chronic analgesic exposure on the central serotonin system: a possible mechanism of analgesic abuse headache. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 40(5), 343-350.
83. Bonnet, C., Hao, J., Osorio, N., Donnet, A., Penalba, V., Ruel, J., and Delmas, P. (2019). Maladaptive activation of Nav1. 9 channels by nitric oxide causes triptan-induced medication overuse headache. *Nature communications*, 10(1), 4253.
84. Supornsilpchai, W., le Grand, S. M., and Srikiatkachorn, A. (2010). Cortical hyperexcitability and mechanism of medication-overuse headache. *Cephalalgia*, 30(9), 1101-1109.
85. Green, A. L., Gu, P., De Felice, M., Dodick, D., Ossipov, M. H., and Porreca, F. (2014). Increased susceptibility to cortical spreading depression in an animal model of medication-overuse headache. *Cephalalgia*, 34(8), 594-604.
86. Vuralli, D., Arslan, B., Topa, E., de Morais, A. L., Gulbahar, O., Ayata, C., and Bolay, H. (2022). Migraine susceptibility is modulated by food triggers and analgesic overuse via sulfotransferase inhibition. *The Journal of Headache and Pain*, 23(1), 36.
87. Tonini, M. C. (2018). Gender differences in migraine. *Neurological Sciences*, 39(1), 77-78.
88. Krause, D. N., Warfvinge, K., Haanes, K. A., and Edvinsson, L. (2021). Hormonal influences in migraine—interactions of oestrogen, oxytocin and CGRP. *Nature Reviews Neurology*, 17(10), 621-633.
89. Vetvik, K. G., and MacGregor, E. A. (2017). Sex differences in the epidemiology, clinical features, and pathophysiology of migraine. *The Lancet Neurology*, 16(1), 76-87.
90. Gupta, S., McCarson, K. E., Welch, K. M. A., and Berman, N. E. (2011). Mechanisms of pain modulation by sex hormones in migraine. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 51(6), 905-922.

91. Silberstein, S. D. (2000). Sex hormones and headache. *Revue neurologique*, 156(4), 30-41.
92. Borsook, D., Erpelding, N., Lebel, A., Linnman, C., Veggeberg, R., Grant, P. E., and Burstein, R. (2014). Sex and the migraine brain. *Neurobiology of disease*, 68, 200-214.
93. Pavlovic, J. M., Akcali, D., Bolay, H., Bernstein, C., and Maleki, N. (2017). Sex-related influences in migraine. *Journal of neuroscience research*, 95(1-2), 587-593.
94. Cairns, B. E., and Gazerani, P. (2009). Sex-related differences in pain. *Maturitas*, 63(4), 292-296.
95. Martin, V. T., and Behbehani, M. (2006). Ovarian hormones and migraine headache: understanding mechanisms and pathogenesis—part I. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 46(1), 3-23.
96. Olesen, J. (2014). Problem areas in the International Classification of Headache Disorders, (beta). *Cephalalgia*, 34(14), 1193-1199.
97. Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R. G., Windmill, K. F., Martin, J. L., and McManus, M. E. (2006). Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicological sciences*, 90(1), 5-22.
98. Wang, G. L., and Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1 (*). *Journal of biological chemistry*, 270(3), 1230-1237.
99. Wen, L., Huang, J. K., Johnson, B. H., and Gerald, R. (1989). A human placental cDNA clone that encodes nonhistone chromosomal protein HMG-1. *Nucleic acids research*, 17(3), 1197-1214.
100. Lu, B., Antoine, D. J., Kwan, K., Lundbäck, P., Wähämaa, H., Schierbeck, H., and Tracey, K. J. (2014). JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(8), 3068-3073.
101. Westwood, F. R. (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic pathology*, 36(3), 375-384.
102. Ajayi, A. F., and Akhigbe, R. E. (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility research and practice*, 6, 1-15.
103. Harriott, A. M., Waruinge, A., Appiah-Danquah, V., Berhanu, L., Morais, A., and Ayata, C. (2023). The effect of sex and estrus cycle stage on optogenetic spreading depression induced migraine-like pain phenotypes. *The Journal of Headache and Pain*, 24(1), 85.
104. Christensen, S. L., Hansen, R. B., Storm, M. A., Olesen, J., Hansen, T. F., Ossipov, M., and Kristensen, D. M. (2020). Von Frey testing revisited: Provision of an online algorithm for improved accuracy of 50% thresholds. *European Journal of Pain*, 24(4), 783-790.

105. Pillai-Kastoori, L., Schutz-Geschwender, A. R., and Harford, J. A. (2020). A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Analytical biochemistry*, 593, 113608.
106. Kirshner, Z. Z., and Gibbs, R. B. (2018). Use of the REVERT® total protein stain as a loading control demonstrates significant benefits over the use of housekeeping proteins when analyzing brain homogenates by Western blot: An analysis of samples representing different gonadal hormone states. *Molecular and cellular endocrinology*, 473, 156-165.
107. Wang, Y., Dong, L., Zhang, Y., Zhang, Y., Qin, G., Zhang, D., and Zhou, J. (2023). Activation of the microglial P2X7R/NLRP3 inflammasome mediates central sensitization in a mouse model of medication overuse headache. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16, 1177171.
108. Rau, J. C., Navratilova, E., Oyarzo, J., Johnson, K. W., Aurora, S. K., Schwedt, T. J., and Porreca, F. (2020). Evaluation of LY573144 (lasmiditan) in a preclinical model of medication overuse headache. *Cephalalgia*, 40(9), 903-912.
109. Ibironke, G. F., and Aji, K. E. (2011). Pain threshold variations in female rats as a function of the estrus cycle. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 26(1), 67-70.
110. Harriott, A. M., Chung, D. Y., Uner, A., Bozdayi, R. O., Morais, A., Takizawa, T., and Ayata, C. (2021). Optogenetic spreading depression elicits trigeminal pain and anxiety behavior. *Annals of neurology*, 89(1), 99-110.
111. Asai, Y., Sakakibara, Y., Kondo, M., Nadai, M., and Katoh, M. (2019). Expression and activities of sulfotransferase in rat brain. *Xenobiotica*, 49(3), 270-275.
112. Kilinc, Y. B., Kilinc, E., Danis, A., Hanci, F., Turay, S., Ozge, A., and Bolay, H. (2023). Mitochondrial metabolism related markers GDF-15, FGF-21, and HIF-1 α are elevated in pediatric migraine attacks. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 63(8), 1076-1086.
113. Huang, H., Nace, G. W., McDonald, K. A., Tai, S., Klune, J. R., Rosborough, B. R., and Tsung, A. (2014). Hepatocyte-specific high-mobility group box 1 deletion worsens the injury in liver ischemia/reperfusion: a role for intracellular high-mobility group box 1 in cellular protection. *Hepatology*, 59(5), 1984-1997.

EKLER

EK-1. Etik Kurul İzni

Evrak Tarih ve Sayısı: 12.08.2024-E.1014618



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : E-66332047-604.01-1014618
Konu : Değerlendirme ve Onay

12.08.2024

Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa BOLAY BELEN
Nöroloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Daha önce 31.01.2023 tarih ve E.571741 sayılı yazımız ile onay alan, araştırmacı grubu Hayrunnisa BOLAY BELEN, Elif Gülçiçek ABBASOĞLU TOPA, Doğa VURALLI, Ayşen ÇALIKUŞU'ndan oluşan, G.Ü.ET-23.007 kod numaralı **"İlaç Aşırı Kullanım Baş Ağrısı Modelinde SULT 1A1 Enzim Değişikliklerinin İncelenmesi"** başlıklı araştırma önerisi ile ilgili alınan **14.06.2024** tarihli dilekçe konusu Kurulumuzun **14.06.2024** tarih ve 06 sayılı toplantısında incelenmiş olup,

Dilekçede; araştırma olarak onay alan çalışmanın tez çalışması olarak devam etmesi ile immünohistokimya verilerinin Western Blot yöntemi kullanılarak protein analizleri ile desteklenmesi yayın kalitesinin artmasını sağlayacak olması nedeniyle, Western Blot analizleri için perfüzyon yapılmamış dokulara ihtiyaç bulunduğundan 2 grup (kontrol+ deney) toplamda 16 adet hayvan daha eklenmesi (toplam 32 hayvan) ve çalışmanın başlığının **"İlaç Aşırı Kullanım Baş ağrısının İnflamasyon ve Sulfotransferazlar Üzerine Etkisinin İncelenmesi"** olarak değiştirilmesi ile ilgili talebinizin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiş olup, karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Mustafa ARSLAN
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

EK-1. (devam) Etik Kurul İzni

Evrak Tarih ve Sayısı: 12.08.2024-E.1014618

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 14/06/2024		TOPLANTI SAYISI : 06	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Mustafa ARSLAN (Başkan)			
Prof.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK			
Prof.Dr.İpek SÜNTAR			
Prof.Dr.Serkan YAVUZ			
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER			
Prof.Dr.Fatma Gökçe APAYDIN			
Prof.Dr.Elvan ANADOL			
Doç.Dr.Yeliz KILINÇ			
Doç.Dr.Zeliha Aycan ÖZDEMİRKAN			
Doç.Dr. Duygu AĞAGÜNDÜZ			
Doç.Dr. Abdullah ÖZER			
Doç.Dr. Sühan GÜRBÜZ			
Dr.Öğr.Üyesi Şevki Mustafa DEMİRÖZ			
Dr.Öğr.Üyesi Zeynep YIĞMAN			
Dr.Öğr.Üyesi Nur Banu BAL			
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM			
Öğr.Gör.Dr. Beyza AYDOĞAN			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ABBASOĞLU TOPA, Elif Gülçiçek
Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Nörobilim Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2010
Lisans	Ankara Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2000
Lise	Ankara Lisesi	1995

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2024-devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

SCI, SSCI ve AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- Dağıdır, H. G., Bukan, N., Bahçelioğlu, M., Çalikuşu, A., Alim, E., Akarca Dizakar, S. Ö., Abbasoğlu Topa, E. G., Belen, H. B. (2024). tVNS alters inflammatory response in adult VPA-induced mouse model of autism: evidence for sexual dimorphism. *FEBS open bio*, 1(1), 1-12.
- Keleş, E., Aral, L. A., Elmazoğlu, Z., Kazan, H. H., Abbasoğlu TOPA, E. G., Ergün, M. A., & Bolay, H. (2024). Phthalate exposure induces cell death and ferroptosis in neonatal microglial cells. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 54(5), 1102-1115.
- Vuralli, D., Dağıdır, H. G., Topa, E. A., & Belen, H. B. (2024). Leaky gut and inflammatory biomarkers in a medication overuse headache model in male rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 54(1), 33-41.

4. Dağdır, H. G., Topa, E., Vuralli, D., & Bolay, H. (2023). Medication overuse headache is associated with elevated lipopolysaccharide binding protein and pro-inflammatory molecules in the bloodstream. *The Journal of Headache and Pain*, 24(1), 150.
5. Vuralli, D., Arslan, B., Topa, E., de Moraes, A. L., Gulbahar, O., Ayata, C., & Bolay, H. (2022). Migraine susceptibility is modulated by food triggers and analgesic overuse via sulfotransferase inhibition. *The Journal of Headache and Pain*, 23(1), 36.

Diğer Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Anadol, E., Demirel, M., Süntar, İ., Gültekin, S., Aslan, A. A., Gökçeoğlu, A., ... & Yarım, G. F. (2023). Investigation of the Effect of *Melissa officinalis* L. on Fetal Development by Ultrasonography in Rats. *Journal of Gazi University Health Sciences Institute*, 5(1), 7-16.

Hakemli Kongre / Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

1. Çalikuşu, A., Topa, E., Kılınç, H., Atalar, K., Barç, E. D., Bolay, H., & Bahçelioğlu, M. (2023). Bilateral transauricular vagal nerve stimulation modifies social adaption, anxiety, and neurodevelopmental biomarkers in an autism model: Sex matters. *IBRO Neuroscience Reports*, 15, 75.
2. Anadol, E., Demirel, M. A., Süntar, İ., Avdan Aslan, A., Gültekin, S., Gökçeoğlu, A., Bahçelioğlu, M., Abbasoğlu Topa, E. G., Çalikuşu, A., Yarım, G. F. (2023). *Melissa officinalis* L. Ekstraktının Sıçanlarda Fetal Gelişim Üzerindeki Etkiliğinin Ultrasonografik Olarak Değerlendirilmesi. Ulusal Laboratuvar Hayvanları Bilimi Kongresi, İstanbul, Türkiye, 191-192.
3. Atalar, K., Alim, E., Çalikuşu, A., Abbasoğlu, Topa, E. G., Gök Dağdır, H., Bahçelioğlu, M., Bukan, N., Belen, H. B. I. (2023). *The effects of bilateral transauricular vagus nerve stimulation on LPS-induced acute inflammation and pain behaviour*. Ibro 11th World Congres of Neuroescience, Granada, İspanya, 15, 362.
4. Çalikuşu, A., Abbasoğlu Topa, E. G., Kılınç, H., Atalar, K., Barç, D. E., Belen, H. B., Bahçelioğlu, M. (2023). *Deneyisel Otizm Spektrum Bozukluğu Modelinde Transauriküler Vagal Sinir Stimülasyonunun Davranış Üzerine Olan Etkileri*. 21. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Bolu, Türkiye, 24.
5. Çalikuşu, A., Abbasoğlu Topa, E. G., Bahçelioğlu, M. (2022). *Otizm Spektrum Bozukluğu Oluşturulan Kemirgen Modellerinde Kullanılabilecek Davranış Deneyleri*. 20. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, İstanbul, Türkiye.
6. Kılınç, H., Topa, E. G., Alaydın, H. C., Boran, H. E., Cengiz, B. (2022). *TU-102. Does playing an instrument affect sensorimotor integration?* 32nd International Congress of Clinical Neurophysiology, İsviçre, 141.
7. Keleş Gülnerman, E., Arala, A., Elmazoğlu, Z., Ergün, M. A., Abbasoğlu Topa, E. G., Kazan, H. H., Belen, H. B. (2021). *Evaluation of the Neurodevelopmental Effects and Mechanisms of Phthalates in Glial Cell Culture*. Global Migraine and Pain Summit, 5th MENA Meeting 3rd Turkish African Meeting of Headache and Pain Management, Antalya, Türkiye, 38(1), 2.

8. Vurallı, D., Abbasoğlu Topa, E. G., Arslan, B., Lopes De Morais, A., Gülbahar, Ö., Ayata, C., Belen, H. B. (2020). *Sulfotransferase Inhibitors in the Pathophysiology of Migraine*. Global Migraine and Pain Summit, 4th MENA Meeting 2nd Turkish African Meeting of Headache and Pain Management, Antalya, Türkiye, 1(1), 9.
9. Ermiş, O., Abbasoğlu Topa, E. G., AKÇALI, D. T., BELEN, H. B. (2020). *Effect of N-acetyl cysteine in oxaliplatin induced neuropathic pain in rat model*. Global Migraine and Pain, 3, 1-17.

Hobiler

-



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..