

Migren Araştırmalarında Kullanılan Güncel Hayvan Modelleri

Current Animal Models Used in Migraine Research

Melih Zeki KAYA¹
ORCID: 0000-0002-2874-6037
Sibel BOZDAĞ PEHLİVAN^{1*}
ORCID: 0000-0001-5066-2772
Levent ÖNER¹
ORCID: 0000-0002-6510-7680

¹Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı,
Eczacılık Fakültesi, Hacettepe Üniversitesi,
Ankara, Türkiye

Corresponding author:

Sibel BOZDAĞ PEHLİVAN
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı,
Eczacılık Fakültesi, Hacettepe Üniversitesi,
06100, Ankara, Türkiye
E-mail: sbozdag@hacettepe.edu.tr
Tel: +90 312 305 1241 / 124

Received date : 24.07.2023

Accepted date : 04.08.2023

DOI: [10.52794/hujpharm.1332342](https://doi.org/10.52794/hujpharm.1332342)

ÖZET

Hayvan modelleri, insana zarar verme riski olmadan insanda görülen hastalıkların incelenmesinde ve yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesinde kullanılan önemli araştırma araçlarıdır. Hayvan modellerinde gözlenen biyolojik aktivite ile insanda elde edilen arasında her zaman birebir benzerlik olmasa da insan hastalıkları için birçok ilaç ve tedavi hayvan modellerinin rehberliğinde geliştirilmektedir. Bu kapsamda, son yıllarda baş ağrısı ve migren mekanizmalarını incelemek için hayvan modelleri yoğun bir şekilde geliştirilmiş ve bunun sonucu olarak migrenin anlaşılmasında ve anti migren tedavilerin geliştirilmesinde önemli adımlar atılmıştır. Bu modeller arasında, genetik modifikasyonlarla oluşturulan fare ve sıçan modelleri, trigeminal sinir sistemi aktivasyonunu taklit eden modeller ve inflamatuvar ajanlarla baş ağrısı indüklenen modeller yer almaktadır. Her bir modelin kendine özgü üstünlük ve sınırlaması olduğundan, ilaç etkinliğini değerlendirmek için uygun hayvan modelinin seçimi ve sonuçların değerlendirilmesi için en uygun deneysel yöntemin seçimi kritik bir parametredir. Bu derlemede son yıllarda üzerinde yoğun bir biçimde çalışılan in-vivo migren modelleri, bu modellerin deneysel analizleri ve elde edilen bulgular üzerinde tartışılacaktır.

Anahtar Kelimeler: Migren, Hayvan modelleri, Preklinik araştırmalar, Baş ağrısı, Nörobiyoloji

ABSTRACT

Animal models are important research tools used in the study of human diseases and in the development of new therapeutic approaches without the risk of harming humans. Although there is not always one-to-one similarity between the biological activity observed in animal models and that obtained in humans, many drugs and treatments for human diseases are developed under the guidance of animal models. In this context, animal models have been extensively developed in recent years to examine the mechanisms of headache and migraine, and as a result, important steps have been taken in the understanding of migraine and the development of anti-migraine treatments. These models include mouse and rat models created by genetic modifications, models that mimic trigeminal nervous system activation, and models that induce headaches with inflammatory agents. Since each model has its own advantages and limitations, the selection of the appropriate animal model to evaluate drug efficacy and the most appropriate experimental method to evaluate the results is a critical parameter. In this review, in-vivo migraine models that have been studied extensively in recent years and the latest findings from these models will be discussed.

Keywords: Migraine, Animal models, Preclinical studies, Headache, Neurobiology

1. Giriş

Nörolojik hastalıklar dünya çapında önemli bir toplum sağlığı sorununu teşkil etmektedir. Bu hastalıklardan kaynaklanan ölüm ve hastalık oranlarını düşürmek için, yeni ve etkili terapi yöntemlerinin geliştirilmesi elzemdir. Migren, nörolojik hastalıklar arasında en sık görülen bozukluk olup nörolojik belirtilerin yanında gastrointestinal ve otonomik semptomları da içeren, toplumda ekonomik yükü yüksek ve tekrar eden baş ağrısı ile tanımlanan bir hastalıktır. Geniş kitleleri etkileyerek iş gücü kaybına yol açan migren, bireyin sosyal etkinliklerini ve iş yaşamını kısıtlarken, ilaç kullanımını artırarak ekonomik kayıplara da sebebiyet vermektedir [1].

Migren, epizodik baş ağrısı ve ağrı bozukluğundan daha fazlasını içeren karmaşık bir beyin hastalığıdır. Temelde duyuşal sinir sistemini etkileyen, duyuşal bilgi işleme ve entegrasyonunda genel bir işlev bozukluğu ile karakterize olan bu durum, çok yönlüdür. Çoğu migren atağında, tipik zonklayan tek taraflı baş ağrısı, artan duyuşal hassasiyete işaret eden çeşitli duyuşaların güçlenmesiyle ilişkilidir.

Migren hastalarında duyuşal fizyolojide farklı değişiklikler gösteren ataklar arası dönemlerde duyuşal uyaranlara karşı aşırı hassasiyet sürebilir. Bu değişikliklerin bazıları, ataklar arası dönemde bir sonraki atak yaklaştıkça artar ve birçok migren hastasında, ataktan bir gün önce en yüksek düzeye ulaşan prodromal belirtilerle (konuşma, okuma, konsantrasyon zorlukları, artan duygusallık, sinirlilik ve duyuşal aşırı hassasiyet gibi) geçici olarak örtüşür [2, 3].

Migren atağının başlamasına yol açan nedenlerle ilgili nörobiyolojik mekanizmalar ve çoklu duyuşal bilgi işlemedeki değişiklikler henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Son yıllarda, migren tedavisi için ilaç geliştirilmesi alanında önemli değişimler meydana gelmesine ve ağrı yollarına nispeten seçici olan çeşitli aday molekülleri keşfedilmesine rağmen, henüz beklenen sonuçlar elde edilememiştir [4]. Özellikle migren için geliştirilen triptanlar sayesinde birincil baş ağrısı bozuklukları tedavisinde daha iyi sonuçlar alınmaya başlanmıştır. Ancak, triptanların bu başarılarına rağmen tüm migren hastalarında görülmemekle birlikte aşırı ilaç kullanımı baş ağrısı ile ilişkilendirilmektedir ve önemli yan etkileri bulunmaktadır [5]. Bu sorunların aşılması için yakın zamanda kalsitonin geniyle ilişkili peptit (CGRP) ve reseptörünü hedefleyen monoklonal antikolar geliştirilmiş ancak güvenlik problemleri önemli bir sakınca olarak bildirilmiştir [6].

Son yıllarda migrenin patofizyolojisi için edinilen bilgi büyük ölçüde trigeminovasküler sistemin no-siseptif yollarının beyin sapı ile diensefalik çekirdeklere artan projeksiyonlarını ve bu yapıların no-siseptif ve diğer duyuşal etkiler üzerindeki kontrolü sonucu migren oluşumunu değerlendiren hayvan modellerine dayanmaktadır. Bu hayvan modelleri, migren semptomlarının patofizyolojik temelini belirlemek için elektrofizyoloji, video görüntüleme, lazer Doppler akış ölçer, immünohistokimya, biyokimya ve davranışsal değerlendirmeleri kapsamaktadır. Bu modeller özellikle migrenin patofizyolojisinin belirli yönlerini incelemektedir. Buna ilaveten, söz konusu modeller daha önceleri çoğunlukla migrenin ağrı özelliğine odaklanırken, son yıllarda nörolojik etkilerin temelleri de değerlendirilmektedir (Şekil 1) [7].

Araştırmacıların kronik ağrı ve migren gibi insan hastalıklarına ilişkin hayvan modellerinin işlevselliğini gösterebilmesi için hastalıkla ilgili patofizyoloji, semptomotoloji ve/veya tedavilerin translasyonel yönleriyle ilgili bir farmakodinamik son noktayı güvenilir bir şekilde değerlendirebilmesi gerekir. Bu bağlamda, ilaç etkinliği için uygun hayvan modelinin ve sonuçların değerlendirilmesi için en uygun deneysel yöntemin seçilmesi kritik bir noktadır. Bu derlemede, son yıllarda gerçekleştirilen, üzerinde yoğun bir biçimde çalışılan in-vivo migren modelleri ve bu modellerden elde edilen en son bulgular, deneysel analizler üzerinde durulmaktadır.

2. Deneysel hayvanlarında migren ağrısının modellemesi

2.1. Migren baş ağrısı modelleri: arteriovenöz anastomozlar ve izole kan damarları temelli deneysel migren modelleri

Migren baş ağrılarının genişlemiş karotis arteriovenöz anastomozlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Örneğin, migren hastalarında, migren ağrısının başlangıcında ve sonrasında arteriyel ve eksternal jugüler venöz kan örneklerinde arteriovenöz (A-V) oksijen saturasyon farkının azaldığı tespit edilmiştir [8]. Klinik olarak, bazı migren hastalarında atak sırasında yüzde solukluk, cilt sıcaklığında düşme ve artmış vasküler atım görülmektedir [9]. Ayrıca, büyük beyin damarlarında kan akım hızı, olası bir damar genişlemesine bağlı olarak azalmaktadır [10]. Bu şekilde, bölgesel damar genişlemesi atak

sırasında damar duvarında «germe reseptörlerini» uyarmakta, perivasküler trigeminal sinirleri aktive etmekte [11] ve beyin sapı trigeminal çekirdeklerine merkezi iletimle ağrı sinyalleri aktarılmaktadır. Bu şekilde, beyin sapındaki diğer alanlara ve gelen zararlı bilgiyi işleyen rostral beyin yapılarına ağrı kaydolmaktadır [12]. Bu hipoteze dayanarak, farmakolojik olarak uyarılan karotid damar genişlemesine dayalı in-vivo hayvan modelleri geliştirilmiştir [11]. Örneğin, anestezi uygulanmamış domuzlarda, karotid anastomozlarında kanın dolaşımı, jugüler venöz dolaşımında %3'ten azken, pentobarbital anestezisi altında %80'e kadar artmaktadır [13].

Dolaşım modeli, abortif (migren atağını durduran) antimigren ilaçlarının kan akımı etkilerini değerlendirmek için başarıyla kullanılmıştır [11]. Triptanlar gibi, domuzlardaki karotid A-V anastomotik kan akımı üzerinde istenen etkileri gösteren ilaçlar, akut migrende abortif aktivite sergilemektedir [11]. Bu model, son zamanlarda pentobarbitalin serebral damar hareketi üzerindeki nörojenik mekanizmalarını incelemek için kullanılmaktadır [14].

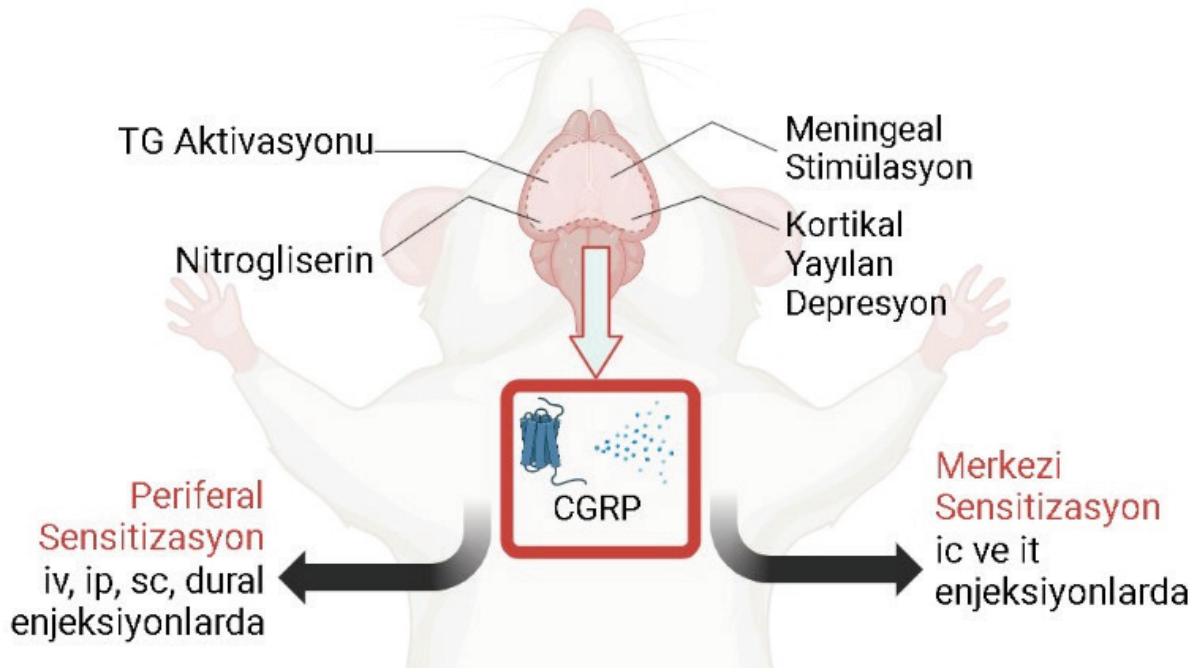
2.2. Trigeminal nöronları doğrudan uyararak oluşturulan in-vivo migren modelleri

Trigeminal nöronları doğrudan uyararak oluşturulan in-vivo migren modelleri, zamanla daha az girişim-

sel hale getirilerek kronik deneyler için uygulanabilir olmuştur. Bunun için geliştirilen ilk modelde trigeminal ganglion elektriksel olarak uyarılırken, ikinci modelde meningeal sinir uçları elektriksel olarak ve üçüncü modelde meningeal afferent sinir uçları kimyasal olarak uyarılmıştır [15].

Trigeminal ganglionunun anestezi uygulanmış hayvanlarda stereotaktik bipolar elektrotlarla elektriksel olarak uyarılması için, düşük frekanslı (yaklaşık 5-Hz) uyarı kullanılarak trigeminal ganglion nöronları aktive edilmektedir. Bu modelin üstünlüğü, meninks dokusundaki değişikliklerin ve merkezi nöronların aktivasyonunun ve ilaç tedavisine verdikleri yanıtın in-vitro modellere kıyasla daha doğrudan incelenebilmesidir. Örneğin, bu modelden elde edilen veriler, trigeminal ganglion uyarımının, meninkleri innerve eden perivasküler afferent terminalden CGRP salınmasına neden olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu durum, triptan duyarlı ultra yapısal morfolojik değişikliklerle birlikte nöropeptit içeren sinir uç şişliklerinde görülmüştür.

Trigeminal ganglionun elektriksel uyarılması, trigeminal nükleus kaudalis'teki nöronların da aktivasyonunu sağlar; ancak bu aktivasyon, sumatriptan uygulamasıyla değiştirilememektedir [16]. Bazı araştırmalarda morfolojik değişiklikleri indüklemek için supramaksimal olarak kabul edilebilecek uzun



Şekil 1 Migren araştırmalarında kullanılan bazı hayvan modellerin şematik gösterimi.

sürelî stimülasyon paradigması (yaklaşık 30 dakika) kullanılsa da, daha kısa ganglionik stimülasyon (3-5 dakika) protokolleri triptanlar ve dihidroergotaminin yanıt verdiği periferik nöropeptit salıverilmesini uyarmaktadır [17]. Bu şekilde kısa süreli ganglionik stimülasyon protokollerinin kullanılması, migren tedavisi için daha gerçekçi bir modelleme sağlamaktadır. Çünkü, migren atakları sırasında trigeminal ganglion nöronlarının sürekli aktivasyonunun olması muhtemeldir. Bu nedenle, triptanlar ve dihidroergotamin gibi ilaçların etkinliğini değerlendiren deneysel modellerde, kısa süreli ganglionik stimülasyon protokolleri kullanarak nöropeptit salımını incelemek önemlidir. Bu değerlendirme, migren patofizyolojisi ve tedavisi için daha doğru ve anlamlı sonuçlar elde etmeye yardımcı olmaktadır.

Migrenin prelinik modellenmesinde, trigeminal afferent aktivasyonunu uyarmak için superior sagittal sinüs [18], transvers sinüs [19] veya orta meningeal arterler [20, 21] üzerindeki meningeal sinir terminalinin elektriksel stimülasyonu kullanılmaktadır. Bu yaklaşım, insanlarda ağrı olduğunda bu ağrının genellikle yüze yansımından dolayı geliştirilmiştir. Buna ilaveten, bu yaklaşım ile kedilerdeki stimülasyonun migren hastalarına benzer nöropeptit salımı değişikliklerine neden olduğu gösterilmiştir [18]. Ayrıca, intrakraniyal damarların doğrudan uyarılması ve bunları innerve eden meningeal afferentlerin aktivasyonu, bu afferentlerin merkezi projeksiyon bölgelerinin trigeminal nükleus kaudalis ve merkezi sinir sistemi boyunca yükselen projeksiyonlarının polisentetik aktivasyonuna yol açmaktadır [22]. Bu tür çalışmalar, beyinde özellikle migrenle ilişkili ağrı işleme çekirdeklerinin tanımlanabilmesinde kritik bir rol oynamıştır. Buna ilaveten, intrakraniyal damarları ve onları innerve eden meningeal afferentleri doğrudan uyarmanın, yukarıda bahsedilen trigeminal ganglionun doğrudan uyarılması gibi, ilaç uygulamasına farklı yanıtları test etmek için sağlam bir model olduğunu kanıtlamıştır [19-21, 23].

Bu farmakolojik testlerin pozitif translyasyon [20, 24] ve terapötik potansiyel [25] açısından yüksek öngörülebilirlik sunduğu bildirilmiştir. İn-vitro modellere kıyasla, in-vivo elektriksel uyarı modellerinin hastalığın biyolojik karmaşıklığını daha iyi yansıtmasına rağmen kraniyotomi ve doku maruziyeti nedeniyle kullanımları sınırlıdır [15]. Hayvanlar anestezi altında olduğu için farklı anestezi uygulamaları dikkate alınmalıdır. Anestezinin çeşitli türleri ve düzeyleri, nöronal aktivasyon ve ilaç etkileri üzerinde

farklı etkiler gösterebilmekte ve bu nedenle çalışma sonuçlarını etkileyebilmektedir. Dolayısıyla, anestezi yönetimi ve seçimi, bu tür modellerde önemli bir faktördür ve uygun şekilde değerlendirilmelidir.

Bu modellerin bir başka sakıncası, belirli bir alandaki trigeminal nosisepsiyon aktivasyonunu taklit etseler de ağrının birçok yönünü içermemeleri ve tüm hayvanlarda genel ağrı fenotipini belirleyememeleridir. Başka bir deyişle, bu modeller, in-vivo koşulların daha doğru bir simülasyonunu sağlasa da ağrının karmaşıklığını ve hastaların yaşadığı tüm belirtileri tam olarak yansıtamayabilmektedir. Bu nedenle, migren ve diğer baş ağrısı türlerini araştırırken, farklı modellerin ve yaklaşımların kullanılması ve bu modellerin sınırlamalarının dikkate alınması önemlidir.

2.3. Kimyasal provokasyon

Prelinik migren araştırmalarında en yaygın kullanılan modellerden biri, farklı vazodilatör maddeler kullanılarak gerçekleştirilen kimyasal provokasyon modelidir. Yüksek tansiyon ve anjina tedavisi için kullanılan nitrik oksit verici gliseril trinitrat (GTN) sistematik olarak infüze edildiğinde, migren hastalarında gecikmeli bir migreni tetikleyebilir ve bu şekilde oluşan migren sumatriptana duyarlıdır. Benzer şekilde, GTN uygulaması, farelerde migren benzeri ağrıyı tetiklemek için kullanılan temel yöntemlerden biridir. GTN'nin intraperitoneal olarak uygulanmasının sakıncalarından biri, yüksek alkol konsantrasyonuna neden olan ekspiyanlardır [26]. Bu durum, hipersensitivitenin gelişimini ortaya çıkarmak için bir davranışsal son nokta olarak kullanıldığında nosiseptif refleksleri etkileyeceği beklenmektedir [27]. Bu model, trigeminovasküler sistemdeki ilgili duyarlılaştırıcı mekanizmaları da ele almaktadır. Buna ilaveten, trigeminal ganglion nöronlarının RNA dizilemesi, P2X3 reseptörünün, GTN infüzyonundan sonra yukarı veya aşağı regüle olan birkaç gen arasında olduğunu ortaya koymuştur [28].

P2X3 reseptör antagonistlerinin kronik ağrı tedavisi için kullanılması, reseptörün yaklaşık yirmi yıl önce klonlandığı ve memeli nosisepsiyon duyuşal nöronları içinde görece sınırlı bir ekspresyon modeli olduğu bildirildiğinde ilaç firmalarının dikkatini çekmiştir [29].

Günümüzde araştırmaların çoğunda, GTN kemirgenlere akut olarak uygulansa da farelere intraperitoneal GTN'nin kronik aralıklarla uygulanması beklenen

akut mekanik hiperaleji ile ilerleyici ve sürekli bir bazal hiperalejiye neden olmaktadır [30]. Bu modelin farmakolojik öngörülebilirliği istenen düzeyde olsa da hastalığı modelleme gücü diğer laboratuvarlarda doğrulama yapıldıktan sonra teyit edilebilir.

Ferrari ve arkadaşları, rat arka pençesine intradermal olarak enjekte edilen GTN'nin sumatriptan duyarlılığı olan ve gecikmeli başlayan mekanik hiperaleji oluşturduğunu göstermiştir [31]. Bu modelde, perivasküler hedefler arasında mast hücreleri ve endotel hücreleri gibi unsurların periferik nöro sensörleri duyarlı hale getirmedeki rolü gösterilmektedir. Bu yaklaşımın sınırlaması, trigeminovasküler sistemi içermemesi olsada, yaklaşımın sıçanlara kolayca uygulanabilir olması nedeniyle migren tedavisiyle ilgili yeni ağrı hedeflerinin belirlenmesi için son derece faydalı olabilmektedir.

2.4. Algojenik Maddelerin Uygulanması

Migrenin önemli bir özelliği, çeşitli tetikleyicilerin atakları başlatma potansiyeline sahip olmasıdır. Deneysel çalışmalarda, kimyasal tetikleyiciler insan migren modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Nitrik oksit kaynakları, nitrogliserin de dahil olmak üzere, bugüne kadar en önemli eksojen algojen maddeler olarak bilinmektedir. Bu durum, anjina hastalarında nitrogliserine maruziyet sırasında baş ağrısı oluşumunun gözlenmesine dayanmaktadır [32]. Bununla birlikte, daha yakın dönemde CGRP, hipofiz adenilat siklazı aktive eden polipeptit (PACAP) ve silostazol gibi maddeler de insan migren tetikleyicileri olarak tespit edilmiştir [33].

Translasyon açısından bu tür dışsal ağrı uyaranlarının sadece ağrı tepkilerini değil, migrenle ilişkili diğer özellikleri de tetiklemesi önemlidir. Örneğin hem nitrogliserin hem de PACAP migren öncü semptomlarını tetiklerken, CGRP'nin böyle bir özelliği bulunmamaktadır [34]. Ayrıca, nitrogliserin kranial allodiniyi tetiklemektedir [23]. Son dönem prelinik çalışmalarda bu tür ağrı uyaranlarının uygulanmasının ardından çeşitli fenotipler, ağrıya ilgili olmayan fenotipler de dahil olmak üzere tanımlanmıştır. Hem akut hem de kronik uygulama ile ilişkilendirilen kronikleşen migren nedeniyle, bu tür ağrı uyaranlarının önemi artmıştır [30].

Araştırmalarda nitrogliserin ve ilgili nitrik oksit vericiler, trigeminal duyuusal afferentlerin latent duyarlılaşmasını indüklemek için in-vivo elektrofizyolojik modellerle birlikte kullanılmıştır [23]. Bu maddeler,

serbest davranış modellerinde trigeminovasküler sistemin artan aktivasyonunu ve hem periorbital hem de arka pençede dokunsal ve termal uyarılara karşı hassasiyeti indüklemektedir [35, 36]. CGRP sinyalizasyonunun inhibe edilmesinin terapötik potansiyelinin artması nedeniyle, prelinik çalışmalarda CGRP kullanımını artmaktadır. CGRP, nörojenik dural vazodilatasyon modellerinde dura mater düzeyinde periferik nörovasküler CGRP sinyalizasyonu üzerinde terapötik müdahaleleri keşfetmek amacıyla kullanılmıştır. Son zamanlarda, farelerde CGRP'nin fotofobi, periorbital hiper duyarlılık ve spontan ağrı davranışlarını tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca, PACAP da prelinik değerlendirmelerde önemli bir potansiyele sahiptir. Hemiseksiyonlu kafatası modelinde, PACAP-38 mast hücrelerinin degranülasyonuna neden olmuştur. In-vivo çalışmalarda ise PACAP infüzyonunu takiben trigeminovasküler nosiseptif işlemede gecikmiş bir duyarlılaşma tespit edilmiştir [25].

Migren ile ilişkili ağrı prelinik modellerinde, algojenik veya migren tetikleyici maddelerin seçiminde dikkat edilmesi gereken pek çok parametre bulunmaktadır. Farelerde ağrı davranışları veya periorbital hassasiyeti indüklemeyen vazoaaktif intestinal peptit (VIP), amilin veya adrenomedulin gibi belirli migren tetikleyici maddelerin kullanımı özgüllükleri nedeniyle önerilmektedir [37]. Eksojen algojenik maddelerin belirli periferik veya merkezi sinir sistemi bölgelerine sınırlı olmaması ve bu nedenle migrenle ilgili yapılar açısından daha genel olarak etki gösterme potansiyeline sahip olması önemlidir. Bu durum, hastalık modellemede öncü semptomların hastalarda indüksiyonu için önemli derecede üstünlük sağlamaktadır [34]. Ayrıca, çalışmalar arasında daha kapsamlı bir karşılaştırma sağlamak için belirli dozlama yöntemlerinin benimsenmesi önemlidir. Örneğin, normal fareler klasik olarak 10 mg/kg nitrogliserin dozuna yanıt verirken, aura ile ilişkili migrenle ilişkili genetik mutasyonlar taşıyan farelerin çok daha düşük dozlara yanıt verdiği gösterilmiştir [36]. Bu modeller farelerde hem akut tepkilere hem de daha kronik bir duruma yol açma potansiyeline sahiptir örneğin, zamanla tekrarlayan dozlama, uzun süreli hiperalejiye neden olabilir [30].

2.5. Kortikal Yayılan Depresyon

Hemiplejik ve retinal migren gibi auralı migren grupları hastaların %30'unu etkileyebilmektedir. Görsel auranın yoğun uyarı dalgası tarafından oluşturulduğuna ilişkin gözlemler, bu durumu kortikal yayılım

depresyonu (CSD) adı verilen bir süreçle ilişkilendirilmiştir. CSD, nöronal ve glial depolarizasyonun yavaş yayılmasıyla oluşan bir dalga olup farelerde ve insanlarda deneysel olarak indüklenebilmektedir.

Genellikle, CSD farelerde kortekse enjeksiyon ile implante edilmiş mikro elektrotlar aracılığıyla kortikal nöronların elektriksel aktivitesinin ölçülmesi veya lazer Doppler akım ölçümü kullanılarak serebral kan akışındaki değişikliklerin değerlendirilmesiyle takip edilmektedir. CSD, trigeminal nükleer kompleks içinde ve trigeminal ağrı yolundaki beyin bölgelerinde nöronal aktivasyonu arttırmaktadır [38]. Ayrıca, tek taraflı CSD'ye sahip farelerin ipsilateral yarım küresinde artmış 11C-PK11195 bağlanması, bu sürecin mikroglia aktivasyonunu indükleyebileceğini göstermektedir [39].

Nöropatik ağrı fare modellerinde spinal kord ve diğer beyin yapıları içindeki mikroglial aktivasyonunun merkezi duyarlılaşma ve hiperaljeziye neden olan bir mekanizma olmasının tespit edilmesi [40], bu alandaki çok sayıda ilaç geliştirme programına ışık tutmuştur. Bu gelişme, modelleme yoluyla ortaya çıkarılan patofizyolojik bir buluşun ilaç keşfine yol göstermesine iyi bir örnektir.

Merkezi sinir sisteminde yayılma depresyonu benzeri bozukluklar, kemirgenler dışında çekirge ve *Drosophila melanogaster* gibi omurgasız hayvanların sinir sisteminde de indüklenebilmektedir. Bu durum, son zamanlarda moleküler genetik yaklaşımların artmasına neden olmuştur. Optogenetik yöntemlerin omurgalılarda geliştirilmesi ile, CSD'nin migren araştırmaları için önemli bir model sistem olduğu daha da belirgin hale gelmiştir. CSD, migrenin temel mekanizmalarını anlamaya yönelik önemli bilgiler sunabilmekte ve bu nedenle bu alanda çalışan araştırmacılar için değerli bir araç olarak nitelendirilmektedir. Ancak, klasik ağrı alanında çalışan uzman olmayan kişiler için, CSD'nin migren araştırmalarına birinci seçenek olarak benimsenmesi daha zordur. Bu zorluk, araştırmacıların CSD'nin karmaşıklığını ve teknik zorluklarını tam olarak anlamamaları veya bu modelin migren patofizyolojisindeki rolüne ilişkin sınırlı bilgilere sahip olmalarından kaynaklanabilmektedir. Ayrıca, migren ve ağrı araştırmalarında kullanılan başka modellerin daha geniş uygulama alanına sahip olması CSD'nin tek seçenek olmamasına neden olmaktadır [41].

Migren üzerindeki güncel araştırmalar, trigeminovasküler aktivasyona yol açan endojen mekanizmalar

hakkında da önemli bilgiler sunmaktadır. CSD, trigeminovasküler aktivasyonun öncülü olarak tanımlanan ilk endojendir ve migrenin patofizyolojisiyle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. CSD, nöronal ve glial membranların yoğun depolarizasyonu, iyonik gradyanların büyük ölçüde bozulması ve membran direncinin kaybı ile karakterize edilmektedir [42]. Bu yavaş yayılım, 3-5 mm/dakika hızında gerçekleşir ve Belousov-Zhabotinsky reaksiyonundaki dalga önlerinin yayılma hızıyla eşleşmektedir [43]. CSD, senkronize olmayan epileptik nöbetin aksine, senkronize bir dalga oluşturur [44]. Deney hayvanlarında CSD'nin, kortikal kan damarlarını çevreleyen ipsilateral trigeminal aksonları uyardığı bulunmuştur [45]. Ayrıca, CSD'nin matriks metalloproteinaz-9'a bağlı mekanizmalar aracılığıyla kan beyin bariyerinin bozulmasına neden olduğu ve migrenin temel mekanizmalarını anlamaya yönelik önemli bilgiler sunabileceği bildirilmiştir [43, 45]. Benzer şekilde, CSD ile ilgili yapılan bir başka araştırmada, trigeminal sinir aktivasyonunun, dura materde plazma proteinlerinin ipsilateral ekstrasvazasyonuna yol açarak deneysel bir belirteç olarak işlev gördüğü [46] ve trigeminal nükleus kaudalis içinde c-Fos ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir [47]. Ayrıca, bir transkripsiyon MRG çalışmasında [48], yoğun kortikal bozulmaların, özellikle tekrarlanan CSD'nin, kan beyin bariyerini açabileceği ve trigeminovasküler sistemi aktive edebileceği vurgulanmıştır.

Ayata ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada, CSD sırasında hücre dışı boşluğa H⁺, K⁺, nitrik oksit ve nörotransmitterler gibi çeşitli maddelerin salındığı, bu moleküllerin pial yüzeye toplu difüzyonla ulaştığı ve trigeminovasküler afferentlerin yakınında biriktiği tespit edilmiştir. Çalışmada, CSD sırasında pial boşlukta 40 mmol/l'den daha yüksek K⁺ seviyeleri ölçülmüş ve profilaktik migren ilaçlarının uzun süreli uygulanması sonucunda sıçanlarda CSD'nin baskılandığı bulunmuştur. Profilaktik ilaçların uzun süreli uygulanmasının önemli olduğu ve tedavinin 3-4 haftadan daha uzun bir süreye uzatılmasının, topiramet, valproat, metiserjrid, amitriptilin ve DL propranololün CSD üzerindeki inhibitör etkilerini artırdığı bildirilmiştir [49].

Güncel farmakolojik çalışmalar ve migren mutasyonları taşıyan farelerden elde edilen veriler, CSD'nin önemini vurgulamakta ve migren patofizyolojisi hakkında daha kapsamlı bir görüş sağlamaktadır. Bu görüşlerin değerlendirilmesiyle migren tedavisine yönelik yeni stratejiler ve terapötik hedefler geliştirilmesi mümkün olmaktadır.

3. Migren aura modelleri: nörovasküler tutulumu dayalı deneysel aura modelleri

Bu modelde CSD deneysel olarak KCl, iğne batırma veya elektriksel stimülasyon gibi kimyasalların topikal uygulamasıyla başlatılabilmekte [50] ve ayrıca endotelin-1 de CSD'yi indükleyebilmektedir [51]. CSD, serebral kan akışında önemli kortikal değişikliklere neden olmaktadır. Örneğin, başlangıçta serebral kan akışında türe bağlı küçük bir azalma, ardından taban çizgisinin %200'üne ulaşan derin bir hiperemi ve daha sonra daha uzun süreli bir oligemi (başlangıç çizgisinin %60-90'ı) gözlenmektedir [52]. Buna ilave olarak, meningeal kan akımı yaklaşık 5 dakika süren bir gecikme ile değişir, yavaşça artıp 20 dakika sonra maksimuma ulaşır ve 1 saat içinde taban çizgisine döner [46]. Bu bulgular, CSD'nin serebral ve meningeal kan akışındaki değişikliklerle doğrudan ilişkili olduğunu ve bu değişikliklerin migrenin patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Lissensefalik beyne göre oldukça kıvrımlı primat korteksinin, CSD'ye daha dirençli olduğu bildirilmiştir. Bu dirence rağmen fonksiyonel MRG [53], epidural elektrofizyolojik kayıt [54] ve intrakortikal multiparametrik elektrotlar [55] kullanılarak CSD'nin insanda ortaya çıktığının gösterilmesi önemli bir aşama olarak belirtilmiştir. 1944 yılındaki keşfinden bu yana CSD, migren aurasının altında yatan mekanizmayı açıklamak için birincil aday olmuştur [42]. Milner ve ark. [56], CSD yayılma hızı ile görsel auranın yayılımı arasındaki benzerliğe dikkat çekmiştir. Araştırmacılar yayılma hızının, memeli korteksindeki hızıyla tutarlı olarak yaklaşık 3 mm/dk olduğu ve bir migren atağı sırasında tahmin edilen oligeminin yayılmasının deneysel CSD modellerinde benzer olduğunu bildirmiştir.

Yapılan çalışmalarda dokunun iyi arteriyelize görünmesi ve oligeminin hafif olması (ortalama olarak taban çizgisinin %25-35 altında) nedeniyle aura semptomlarının oligemiden kaynaklanmadığını düşündürmüştür [57]. Ayrıca, odak semptomları ve kan akışı değişikliklerinin yayılan depresyonun neden olduğu nöronal ve glial bozulmalardan sonra gerçekleşen sekonder semptomlar olduğu bildirilmiştir [57]. Bununla birlikte son veriler, CSD'nin bitişik kılcal damarlar arasındaki mikro havza bölgelerindeki hücrelerde hipoksiye neden olduğunu göstermektedir. Lokal hipoksinin, aşırı oksijen talebine ve oksijen difüzyonunun sınırlı olmasına bağlı olduğu

bildirilmiştir [58]. Bu bulgular, CSD'nin insan migren aurasının altında yatan mekanizma olabileceğini ve migren atağı sırasında kan akışı değişikliklerinin CSD ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

4. Deneysel Analizler

Migren ve trigeminal duyuşal işleme üzerine yapılan deneysel çalışmalar, farklı teknikler kullanarak nöronal ve fizyolojik tepkileri ölçmektedir.

- **Elektrofizyoloji:** Nöronların elektriksel aktiviteleri ölçülür. Trigeminal nükleus kaudalis ve diğer beyin bölgelerindeki nöronların ağrı ve migrenle ilgili aktiviteleri değerlendirilebilir.
- **İmmunohistokimya:** Hücrelerde ve dokularda spesifik proteinlerin lokalizasyonu ve ekspresyonu incelenir. Migren ve ağrı süreçlerinde rol oynayan nöronal ve glial hücrelerin aktivasyonu ve modülasyonu analiz edilir.
- **Mikroiyontoforez:** İlaçların hücrelere lokal olarak uygulanmasını sağlar. Nöronların farmakolojik tepkilerini incelemek ve potansiyel migren tedavilerinin etkinliğini değerlendirir.
- **Davranışsal Testler:** Migren ve ağrı ile ilişkili hayvan davranışlarını değerlendirir. Ağrı algısı, motor fonksiyon ve stres gibi migrenle ilgili davranışları inceleyerek, migrenin nörobiyolojik temelini ve tedavi etkinliğini değerlendirmeye yardımcı olur.
- **Optogenetik:** Işığa duyarlı proteinler kullanarak nöronların aktivasyonunu veya inhibisyonunu kontrol etmeye olanak tanır. Migren ve ağrı mekanizmaları ile ilgili nöronal devrelerin işleyişini anlamak için kullanılır.
- **İn-vivo görüntüleme:** Canlı hayvanlarda gerçek zamanlı olarak beyin aktivitesini ve kan akışını ölçer. Migren sırasında meydana gelen beyin değişikliklerini ve tedavilerin etkisini değerlendirmek için kullanılır.
- **Farmakolojik taramalar:** Migren tedavisinde kullanılan ilaçların etkinliğini ve mekanizmalarını incelemek için kullanılır. Nöronların ve hücresel süreçlerin ilaçlara nasıl tepki verdiğini ölçer ve potansiyel yeni tedavi hedeflerini belirlemeye yardımcı olur.
- **Genetik Manipülasyon:** Migrenle ilgili genlerin fonksiyonunu ve rolünü incelemek için kullanılır.

Gen düzenlemesi veya transgenik hayvan modelleri ile migrenin moleküler temelini ve genetik faktörlerin etkisini anlamaya yardımcı olur.

- **Yüzey Elektromiyografi (yEMG):** Kaslardaki elektriksel aktiviteyi ölçer ve migren ağrısı ile ilişkili kas aktivasyonu ve gerilimi değerlendirmek için kullanılır. Migren hastalarında kas aktivasyonu düzeylerini ve tedaviye cevapları belirlemeye yardımcı olur.
- **Kan-Beyin Bariyeri Modelleri:** Migrenle ilgili ilaçların beyin penetrasyonunu ve etkinliğini değerlendirmek için kullanılır. İn vitro ve in-vivo koşullarda, migren tedavilerinin beyin dokusuna ulaşma yeteneğini ve potansiyel terapötik etkilerini incelemeye olanak tanır.

4.1. Elektrofizyoloji

Elektrofizyolojik analizler trigeminal nükleus kaudalis ve diğer beyin bölgelerindeki nöronların ağrı ve migrenle ilgili aktivitelerini değerlendirmek için kullanılabilir. Orta meningeal arter ve superior saggittal ve transvers sinüsler dahil olmak üzere dural kan damarlarını innerve eden meningeal afferentlerin aktivasyonu, migren ağrısına çok benzeyen baş ağrısına neden olmaktadır [59]. Bu nedenle, trigeminovasküler sistemin aktivasyonu sürekli olarak migrene bağlı ağrı modeli olarak kullanılmıştır. Trigeminal nükleus kaudalis ile ilgili birinci ve ikinci servikal seviyelere [61] merkezi projeksiyonlar gönderen trigeminal ganglionu içermektedir. İkinci dereceden nöronlar, trigeminal çekirdek kaudalisinden beyin sapındaki daha yüksek dereceli yapılara ve ağrı işleme yer alan diensefalik çekirdeklere projekte olmaktadır [62].

Trigeminal nükleus sistemin in-vivo aktivasyonunu kolaylaştırmak için çeşitli paradigmlar geliştirilmiş ve hedeflenen elektrot yerleşimi, merkezi sinir sistemi boyunca durovasküler uyarılmış yanıtların kaydedilmesini kolaylaştırmıştır. Meningeal afferentlerin ve bunların trigeminal nükleus kaudalis üzerindeki merkezi sinapslarının önemi göz önüne alındığında, trigeminal nükleus kaudalis'in hedeflenen nöronal aktivite kayıtları açısından büyük ilgi görmesi beklenen bir durumdur. Nosiseptif durovasküler stimülasyona trigeminal nükleus kaudalis nöronal yanıtlarının elektrofizyolojik kayıtları, nosiseptif trigeminovasküler aktivasyonun bir analizi olarak

yaygın şekilde kullanılmaktadır [19, 20]. Omurilik dorsal boynuzundan yapılan kayıtların doğası, dura materin kesilmesiyle birlikte birinci servikal vertebranın laminektomisini gerektirmektedir. Elektrot yerleşimini kaydetmek, kutanöz ve dural alıcı alan yanıtlarının haritalanması yoluyla büyük ölçüde optimize edilip uygun seviye bulunduğu, spesifik hücre tipleri tanımlanabilmektedir [15]. İkinci derece trigeminotalamik projeksiyon nöronları, girdilerinin çoğunu trigeminal ganglionda ortaya çıkan ince miyelinli A δ - ve miyelinsiz C-liflerinden [63, 64] almaktadırlar. Bu nedenle, her iki fiberin de gecikme yanıtı kaydedilebilir ve spesifik etkileri belirlemek için diferansiyel olarak analiz edilebilir [65]. Spesifik A ve C fiber gecikmelerine ek olarak, tek hücre yanıtlarının kaydedilmesine izin veren yüksek empedanslı elektrotlar kullanılarak çeşitli nöronal alt tipler tanımlanabilmektedir. Bu konuda üç nöronal alt tip tanımlanmıştır: zararsız uyarıma yanıt veren düşük eşikli mekanoreseptörleri hem zararlı hem de zararsız uyaranlara yanıt veren geniş dinamik aralıklı nöronları veya yalnızca zararlı girdiye yanıt veren nosiseptif spesifik nöronlar [66].

Beyindeki belirli çekirdekleri hedefleme özelliğine ek olarak, doğrudan trigeminal çekirdek kaudalis kaydı, işlevsel bağlantıları belirlemek için ayrı beyin alanlarına mikroenjeksiyon da dahil olmak üzere genellikle alternatif yöntemlerle birleştirilmektedir. Bu şekilde, A11 [67], locus coeruleus [21], ventrolateral periaqueductal grey [68], talamik [24] ve hipotalamik [19] çekirdekler dahil olmak üzere trigeminal nükleus kaudalis durovasküler uyarılmış yanıtları düzenleyen birkaç modülatör ağ tanımlanmıştır. Ayrıca, çevresel uyaranların etkisini araştıran çalışmalarda, posterior talamusta durovasküler nosiseptif işlemenin ışığa bağlı alevlenmesinin altında yatan potansiyel mekanizmalar tanımlanmıştır [69]. Bu in-vivo modelin, potansiyel antimigren ilaçların farmakolojik taramasında oldukça etkili olduğu bildirilmiştir. İn-vivo elektrofizyolojinin mikroiyontoforez ile kombinasyon şeklinde kullanılması, nöronal yanıtların farmakolojisini karakterize etmek için uygulanan bir yaklaşımdır [70]. Ergot alkaloidlerinin ve triptanların [71] trigeminal nükleus kaudalis'teki mikroiyontoforetik püskürmesinin, bu bileşiklerin potansiyel merkezi aktivite gösteren nosiseptif durovasküler ve lokal glutamat kaynaklı tepkileri inhibe ettiğini göstermiştir. Bu yaklaşım, CGRP reseptör antagonisti olcegepant [72] ve 5-HT1B/1D reseptör agonisti naratriptan [73] dahil olmak üzere çeşitli anti-migren ilaçları için potansiyel etki bölgelerini tanımlamıştır.

Yöntemin spesifik bileşiklerin potansiyel lokal etkisini belirleme özelliği bir üstünlük olsa da kan beyin bariyerini taklit edememesi klinik sonuçların kestirilmesi açısından önemli bir problemidir.

In-vivo elektrofizyolojinin kullanımının önemli üstünlüklerinden biri, spesifik dural uyarılmış tepkiler ve eksojen algojenik maddelerin uygulanmasını takiben ortaya çıkanlar dahil olmak üzere, ilgili temel yolları aktive etmek için yöntemlerin esnekliğidir. Bununla birlikte, periferik ve merkezi bölmeler arasındaki karmaşık arayüzlere sahip bozulmamış bir sinir sisteminde migrenle ilişkili ağrının modellenmesi de bir üstünlüktür. Son olarak, mevcut in-vivo elektrofizyolojik işlemler büyük ölçüde akut ve bu nedenle uzun süreli çalışmaları engellemektedir [74].

4.2. İmmünohistokimya

4.2.1. C-Fos immünoaktivitesi

Migrenle ilişkili ağrının in-vivo modelleri için tamamlayıcı veya alternatif bir yöntem, başta c-Fos immünoaktivitesi olmak üzere nöronal aktivasyon belirteçleri kullanılarak trigeminal nükleus kaudalis gibi anahtar nosiseptif işleme yapılarında nöronal aktivasyonun tanımlanmasıdır [75]. Fos geni, aşağı akış hedef genlerinin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörü AP-1'i oluşturmak için Jun ailesinin transkripsiyon faktörleriyle dimerize olan proto-onkogen c-Fos'u kodlayan acil bir erken genidir [76]. Nöronlarda c-Fos ekspresyonu, CREB/Cre kompleksinin aktivasyonu yoluyla cAMP, protein kinaz C ve kalsiyum-kalmodulin dahil olmak üzere en az 3 haberci tarafından uyarılabilmektedir [77]. C-Fos ekspresyonu, yoğun uyarılardan 30 dakika ila bir saat sonra saptanabilmekte, 2-4 saatte zirvesine ulaşır uyarıdan 8-24 saat sonra bazal seviyelere dönmektedir [78]. Genellikle, c-Fos ekspresyonu, hücre gövdelerinin çekirdeklerinde c-Fos'un immünohistokimyasal tespiti yoluyla gösterilmektedir [79].

C-Fos, indüksiyonunun aktiviteye bağlı olduğu gösterilen ilk transkripsiyon faktörlerinden biridir [80]. Bu konudaki başlangıç çalışmalarında c-Fos'un periferik stimülasyonu takiben spinal dorsal boynuzda indüklendiği gösterilerek takip eden çalışmalarda bu yapının nosisepsiyonu incelemek için yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur [81]. Migrenle ilişkili ağrı araştırmalarında, c-Fos ekspresyonu, zararlı uyarılara ve ilgili nosiseptif yollara yanıt olarak aktive edilen nöronların alt popülasyonlarını tanımlamak için sıklıkla kullanılmaktadır [82].

Bu nedenle, birçok çalışma, migren patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olan trigeminovasküler sistem boyunca nöronal aktivasyonun haritasını çıkarmak için c-Fos immünoaktivitesini incelemiştir [83]. Meningeal afferentlerin elektriksel, mekanik ve kimyasal stimülasyonu ve nitrogliserin dahil algojenik maddelerin sistemik uygulaması, trigeminal nükleus kaudalis'in [83] nosiseptif-spesifik laminasında c-Fos ekspresyonunu indükleyebilmekte ve bu anti-triptanlar, dihidroergotamin ve lasmiditan gibi migren tedavileri ile inhibe edilebilmektedir. c-Fos'un polisinaptik aktivasyona yanıt verme özelliği sayesinde, aynı zamanda bu yöntem fonksiyonel yolların haritalanmasına ve dolayısıyla migren patofizyolojisinde yer alan artan ve azalan yolların belirlenmesine olanak tanımaktadır. Bu amaçla, PAG [84], parabrakiyal çekirdek ve locus coeruleus [84] dahil olmak üzere çeşitli beyin sapı yapılarında c-Fos ekspresyonu haritalanmıştır.

Araştırmacıların c-Fos ifadesini yönlendirmek için kullanılan uyarın da dahil olmak üzere belirli sınırlamalara karşı dikkatli olması gerektiği bildirilmiştir [82]. Bu sınırlamalar, P-nörokinin-1 reseptörü antagonistlerinin migrenin akut ve önleyici tedavisindeki başarısızlığıyla ortaya çıkarılmıştır [85]. Ancak bu antagonistlerin trigeminal ganglion stimülasyonunu takiben trigeminal çekirdek kaudalinde c-Fos ekspresyonunu bloke ettikleri gösterilmiştir [86]. Buna ilaveten, c-Fos ekspresyonunun olmaması, nöronal aktivasyonun yokluğunu garanti etmemektedir çünkü dorsal kök ganglionlarındakiler de dahil olmak üzere, aktive edilmiş tüm nöronlar c-Fos'u eksprese etmemektedir [87]. Bir başka önemli husus da ölçülebilir c-Fos seviyelerinin uyarılmasının, genellikle fizyolojik olarak ilgili olmayan, güçlü ve tutarlı bir stimülasyon gerektirmesidir.

4.2.2. Nöronal aktivasyonun alternatif belirteçleri

Belirli koşullarda ve c-Fos ifade etmeyen belirli dokularda alternatif nöronal aktivasyon belirteçlerinin kullanılması gerekli olabilmektedir. Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), mitojenle aktive olan protein kinaz ailesinin bir üyesidir. Aktive edildikten sonra fosforile edilmiş ERK (pERK), birkaç transkripsiyon faktörünü aktive ettiği çekirdekle yer değiştirir [88]. c-Fos gibi, pERK ekspresyonu [89] çok sağlamdır, yüksek eşikli uyarılar gerektirmektedir ve analjezikler tarafından inhibe edilebilmektedir.

4.3. Davranış Analizleri

Uyanık ve özgürce hareket eden deney hayvanlarında ağrı benzeri davranışları ölçmek migren benzeri ağrının altında yatan karmaşık süreçler hakkında önemli bilgiler sağlayabilmektedir. Bilinci açık hayvanlarda acı benzeri davranışı değerlendirmenin üstünlüklerinden biri, deneysel yönlendirmelerin veya terapötik müdahalelerin hayvan üzerindeki etkisinin bütünüyle değerlendirilebilmesidir. Bununla birlikte, birçok davranış analizi öznel olabileceğinden deneyi yapan kişinin tedavilere/deney gruplarına karşı kör olması zorunludur. Uygun şekilde planlandığında davranışsal analizler migren patofizyolojisinin altında yatan migren benzeri ağrı fenotiplerini araştırmak için paha biçilmez araçlardır.

4.3.1. Mekanik Allodini

Klinik öncesi baş ağrısı modellerinde ağrı benzeri davranışın en sık kullanılan davranışsal değerlendirme aracı mekanik allodinidir. Mekanik veya dokunsal hassasiyet, kalibre edilmiş von Frey filamentleri kullanılarak kolayca ölçülebilmektedir. Bu filamentler, uyarılmış yanıt eşiklerini belirlemek için tipik olarak sefalik (bıyık çevresi veya periorbital alanlar) veya ekstrasefalik (arka pençe) bölgelere uygulanmaktadır. Filamentlerin nasıl uygulanacağı ve bir geri çekilme yanıtının nasıl hesaplanacağı konusunda yaygın olarak kullanılan üç yöntem : yukarı-aşağı yöntemi, artan uyaran ve yüzde yanıt oranı yöntemi olarak sıralanabilir. Yukarı-aşağı yöntemi, istatistiksel bir formüle dayalı olarak hayvanların %50'sinde bir yanıtı geçersiz kılmak için eşiği hesaplamaktadır [90]. Bu yöntem, filamentlerin hayvanın önceki filamentte verdiği tepkiye dayalı bir modelde uygulanmasını içermektedir. Burada, ilk pozitif yanıtın itibaren beş uygulama için tekrarlanıp %50 mekanik geri çekme eşiği hesaplanmaktadır [90]. Yükselen uyaran yöntemi, filamentlerin bir geri çekilme tepkisi uyandırılana kadar artan kuvvetle uygulandığını görmekte ve bu filamentin kuvveti mekanik geri çekilme eşiği olarak kaydedilmektedir [91].

Moleküler biyolojik saatin düzenlenmesinde yer alan ve insanlarda migren ile bağlantılı olan kazein kinaz I deltasında bir insan mutasyonunu taşıyan transgenik farelerin, kontrollere kıyasla nitrogliserine yanıt olarak arka pençe mekanik duyarlılığında değişiklik olduğu gösterilmiştir [36]. Bu nedenle, nitrogliserinin ailesel hemiplejik migren hastalarında daha önce tanımlanmış olan atakları tetikleyememesinin aksine,

migrenle ilgili spesifik genetik mutasyonların nitrogliserine duyarlılığı artırdığı tespit edilmiştir[92]. Akut davranışsal tepkilere ilave olarak, migren kronikleşmesinde yer alan biyolojik mekanizmaları değerlendirmek için nitrogliserin uygulamalarının tekrarlanmasının değerlendirildiği bir çalışmada, 9 gün boyunca gün aşırı tekrarlanan dozlama ile, tedavi sonrası akut yanıtlara ek olarak ilerleyici ve sürekli bir bazal aşırı duyarlılık gözlemlendiği bildirilmiştir [30]. Bu bazal aşırı duyarlılığın , topiramet ve propranolol [30] gibi migren önleyiciler tarafından bloke edilebilmesi bu yöntemi kronik migren modeli olarak desteklemektedir [93]. Ayrıca, nitrik oksit reseptörü çözümlü guanilil siklazın doğrudan uyarılması, bazal aşırı duyarlılığı kronik olarak artırabilmekte ve bu durum, daha sonra triptanlar ve topiramet gibi akut ve önleyici migren ilaçları tarafından bloke edilebilmektedir[94]. Nitrogliserine ek olarak, migreni tetikleyen diğer maddelerin kemirgenlerde sefalik ve ekstrasefalik allodinik tepkiler ortaya çıkardığı tespit edilmiştir. CGRP, PACAP, histamin ve prostaglandin E2'nin akut uygulamasının, sistemik antagonistler tarafından zayıflatılan periorbital mekanik duyarlılığı ortaya çıkardığı gösterilmiştir [37]. Ayrıca, CGRP'nin intratekal enjeksiyonunun yaban tip farelerde arka ayak mekanik allodinisini indüklediği de gösterilmiş ve bu yanıtın, CGRP reseptör aktivitesini modifiye eden protein 1'i aşırı eksprese eden transgenik farelerde daha da güçlendiği tespit edilmiştir [95]. Ayrıca, enflamatuvar karışım ve CSD gibi diğer modeller ile trigeminal duyarlılaşmaya yanıt olarak mekanik allodini görülmüştür. Migren aurasının elektrofizyolojik karşılığı olan CSD da trigeminal ağrı yollarını aktive edebilmektedir. CSD'nin indüklediği mekanik allodini, birden fazla olayı takiben sıçanların hem yüzlerinde hem de arka ayaklarında gözlemlenmiştir [96]. CSD'ye ipsilateral mekanik geri çekilme eşiklerindeki azalma, bir CGRP reseptör antagonisti tarafından tersine çevrilebilmektedir [97].

4.3.2. Termal Allodini

Termal allodini (hem sıcak hem de soğuk) prelinik modellerde migren patofizyolojisinde alta yatan mekanizmaları daha detaylı incelemek için mekanik hassasiyet çalışmalarına tamamlayıcı olarak gerçekleştirilmektedir. Aseton buharlaşma testi kullanılarak hem sefalik hem de ekstrasefalik vücut bölgelerinde soğuğa duyarlılık kolaylıkla ölçülebilmektedir. Burada nosiseptif davranışlar, asetonun cilt üzerinde

buharlaşarak soğumasıyla indüklenebilmekte ve bu tür davranışlar sayılıp, zamanlanıp veya puanlanabilmektedir [98]. Ekstrasefalik termal allodininin değerlendirilmesi, Hargreaves veya kuyruk çevirme testi kullanılarak kolayca değerlendirilebilmektedir. Hargreaves testi, hayvanın arka pençesine bir ısı uyarısının yönlendirilmesini ve geri çekilme gecikmesinin ölçülmesini içerir[99]. Buna ilaveten, hayvanın kuyruğuna bir ısı uyarısı yönlendirip geri çekilme gecikmesi kaydedilebilmektedir. Hargreaves testini kullanarak, akut nitrogliserin ve algojenik maddelerin kronik uygulaması termal duyarlılığı artırdığı görülmüştür [30, 94].

4.3.3. Ağrının bilişsel yönlerini değerlendirmek için edimsel modeller

Edimsel ağrı değerlendirme analizleri, ağrının duygusal işlev bozukluğunu ve duygusal-motivasyonel bileşenlerini değerlendirmek için klinik öncesi baş ağrısı araştırmalarında kullanılmaktadır. Edimsel tabanlı testlerin diğer uyarılmış duyuşal ayırım testlerine kıyasla üstünlüğü, spinal refleks tabanlı no-sisepsiyona dayanmak yerine aynı zamanda daha yüksek dereceli ağrı işlemenin bir ölçüsü olmasıdır. OPAD cihazı, hayvanın ağrıdan kaçınmak için ağırlı bir uyarana ilişkili bir ödül veya ödülün vazgeçme arasında seçim yapmasını gerektirdiğinden [100], ağrının duygusal veya motivasyonel bileşeninin değerlendirilmesini sağlamaktadır [100]. Bu durum değerlendirmenin ağrının sadece refleksif bileşenine dayanmaması nedeniyle translyonel değer katmaktadır.

Başka bir edimsel analiz, hayvanın caydırıcı veya ağırlı bir uyarana ilişkilendirilmiş bir alanda geçirdiği süreyi ölçen şartlandırılmış yerden kaçınma testidir. Kronik nitrogliserinin, hayvanların nitrogliserin ve dolayısıyla acı verici deneyimle ilişkili haznede daha az zaman geçirmeyi öğrendikleri yerlerden kaçınmaya neden olduğu gösterilmiştir. Yeni terapötik hedefler ya analjezik etkiler yoluyla ya da ödül yollarını uyararak, durumdan kaçınmayı önleyebilmektedir [93].

5. Sonuç

Migren, baş ağrısı ve değişen duyuşal algı gibi semptomlarla yaşam kalitesini düşüren kompleks, nörolojik bir hastalıktır. Migren tedavisinde günümüzde henüz istenen başarıya ulaşılamadığından araştırmacılar yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi

için yoğun şekilde çalışmaktadır. Etkili tedavilerin sağlanmasında anahtar role sahip olan yeni terapötiklerin geliştirilmesi, deney hayvanlarında yapılan translyonel araştırmalar sayesinde gerçekleştirilmektedir. Bu derlemede, büyük ölçüde migrenle ilişkili ağrının en sık kullanılan prelinik hayvan modellerine odaklanılmıştır. Ancak modellerin önemli başarısına rağmen, migrenin başlamasının altında yatan mekanizmalar, ilişkili semptomlar ve atağın sonlandırılması hakkında bilinmeyen pek çok noktanın aydınlatılması için yeni araştırmalara büyük bir ihtiyaç vardır. Bunun için, şimdilik periferik ve merkezi sinir sistemleri arasındaki karmaşık etkileşimleri doğru bir şekilde inceleyebilen tek araç deney hayvanı modelleri olsa da gelecekte araştırmalarda hayvanların kullanımını azaltmaya/sıfırlamaya yardımcı olabilecek alternatif analizlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, araştırmacıların yeni tedavilerin geliştirilmesi için yeni yöntemler geliştirilmesi ve mevcut yöntemleri iyileştirme yönünde de çalışması önem kazanmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazarların finansal veya başka bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Araştırmacıların Katkı Beyanı

Konsept – M.Z.K., S.B.P, L.Ö.; Literatür Tarama – M.Z.K.; Yazım – M.Z.K.; Değerlendirme – S.B.P., L.Ö.; Danışmanlık – S.B.P., L.Ö.

Kaynaklar

1. Yildirim Ş, Akkoca Y, İnan LE. Migren ve Gerilim Tipi Baş Ağrısında Bilişsel-Davranışçı Tedavinin Kullanımı. Bilişsel Davranışçı Psikoterapi ve Araştırmalar Dergisi. 2015;4(1):10-7
2. Pietrobon D, Moskowitz MA. Pathophysiology of migraine. Annu Rev Physiol. 2013;75:365-91. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183717>
3. Burstein R, Nosedá R, Borsook D. Migraine: multiple processes, complex pathophysiology. J Neurosci. 2015;35(17):6619-29. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0373-15.2015>
4. Kissin I. Scientometrics of drug discovery efforts: pain-related molecular targets. Drug Des Devel Ther. 2015;9:3393-404. <https://doi.org/10.2147/dddt.S85633>
5. Thorlund K, Toor K, Wu P, Chan K, Druyts E, Ramos E, et al. Comparative tolerability of treatments for acute migraine:

- A network meta-analysis. *Cephalalgia*. 2017;37(10):965-78. <https://doi.org/10.1177/0333102416660552>
6. Chang DS, Hsu E, Hottinger DG, Cohen SP. Anti-nerve growth factor in pain management: current evidence. *J Pain Res*. 2016;9:373-83. <https://doi.org/10.2147/jpr.S89061>
 7. Romero-Reyes M, Akerman S. Update on animal models of migraine. *Curr Pain Headache Rep*. 2014;18(11):462. <https://doi.org/10.1007/s11916-014-0462-z>
 8. Létienne R, Verscheure Y, John GW. Investigation of the effects of naratriptan, rizatriptan, and sumatriptan on jugular venous oxygen saturation in anesthetized pigs: implications for their mechanism of acute antimigraine action. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307(1):168-74. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.054940>
 9. Drummond PD, Lance JW. Extracranial vascular changes and the source of pain in migraine headache. *Ann Neurol*. 1983;13(1):32-7. <https://doi.org/10.1002/ana.410130108>
 10. Friberg L, Olesen J, Iversen HK, Sperling B. Migraine pain associated with middle cerebral artery dilatation: reversal by sumatriptan. *Lancet*. 1991;338(8758):13-7. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)90005-a](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)90005-a)
 11. De Vries P, Villalón CM, Saxena PR. Pharmacological aspects of experimental headache models in relation to acute antimigraine therapy. *Eur J Pharmacol*. 1999;375(1-3):61-74. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(99)00197-1)
 12. Edvinsson L. Blockade of CGRP receptors in the intracranial vasculature: a new target in the treatment of headache. *Cephalalgia*. 2004;24(8):611-22. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2003.00719.x>
 13. Den Boer MO, Van Woerkens LJ, Somers JA, Duncker DJ, Lachmann B, Saxena PR, et al. On the preservation and regulation of vascular tone in arteriovenous anastomoses during anesthesia. *J Appl Physiol* (1985). 1993;75(2):782-9. <https://doi.org/10.1152/jappl.1993.75.2.782>
 14. Kapoor K, Arulmani U, Heiligers JP, Garrelts IM, Willems EW, Doods H, et al. Effects of the CGRP receptor antagonist BIBN4096BS on capsaicin-induced carotid haemodynamic changes in anaesthetised pigs. *Br J Pharmacol*. 2003;140(2):329-38. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705451>
 15. Akerman S, Holland PR, Hoffmann J. Pearls and pitfalls in experimental in vivo models of migraine: dural trigeminovascular nociception. *Cephalalgia*. 2013;33(8):577-92. <https://doi.org/10.1177/0333102412472071>
 16. Knyihár-Csillik E, Tajti J, Samsam M, Sárosi G, Slezák S, Vécsei L. Effect of a serotonin agonist (sumatriptan) on the peptidergic innervation of the rat cerebral dura mater and on the expression of c-fos in the caudal trigeminal nucleus in an experimental migraine model. *J Neurosci Res*. 1997;48(5):449-64
 17. Buzzi MG, Carter WB, Shimizu T, Heath H, 3rd, Moskowitz MA. Dihydroergotamine and sumatriptan attenuate levels of CGRP in plasma in rat superior sagittal sinus during electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neuropharmacology*. 1991;30(11):1193-200. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(91\)90165-8](https://doi.org/10.1016/0028-3908(91)90165-8)
 18. Zagami AS, Goadsby PJ, Edvinsson L. Stimulation of the superior sagittal sinus in the cat causes release of vasoactive peptides. *Neuropeptides*. 1990;16(2):69-75. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(90\)90114-e](https://doi.org/10.1016/0143-4179(90)90114-e)
 19. Robert C, Bourgeois L, Arreto CD, Condes-Lara M, Noseda R, Jay T, et al. Paraventricular hypothalamic regulation of trigeminovascular mechanisms involved in headaches. *J Neurosci*. 2013;33(20):8827-40. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0439-13.2013>
 20. Holland PR, Akerman S, Andreou AP, Karsan N, Wemmie JA, Goadsby PJ. Acid-sensing ion channel 1: a novel therapeutic target for migraine with aura. *Ann Neurol*. 2012;72(4):559-63. <https://doi.org/10.1002/ana.23653>
 21. Vila-Pueyo M, Strother LC, Kefel M, Goadsby PJ, Holland PR. Divergent influences of the locus coeruleus on migraine pathophysiology. *Pain*. 2019;160(2):385-94. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001421>
 22. Knight YE, Classey JD, Lasalandra MP, Akerman S, Kowacs F, Hoskin KL, et al. Patterns of fos expression in the rostral medulla and caudal pons evoked by noxious craniovascular stimulation and periaqueductal gray stimulation in the cat. *Brain Res*. 2005;1045(1-2):1-11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.01.091>
 23. Akerman S, Karsan N, Bose P, Hoffmann JR, Holland PR, Romero-Reyes M, et al. Nitroglycerine triggers triptan-responsive cranial allodynia and trigeminal neuronal hypersensitivity. *Brain*. 2019;142(1):103-19. <https://doi.org/10.1093/brain/awy313>
 24. Summ O, Charbit AR, Andreou AP, Goadsby PJ. Modulation of nociceptive transmission with calcitonin gene-related peptide receptor antagonists in the thalamus. *Brain*. 2010;133(9):2540-8. <https://doi.org/10.1093/brain/awq224>
 25. Akerman S, Goadsby PJ. Neuronal PAC1 receptors mediate delayed activation and sensitization of trigeminocervical neurons: Relevance to migraine. *Sci Transl Med*. 2015;7(308):308ra157. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa7557>
 26. Ramachandran R, Bhatt DK, Ploug KB, Olesen J, Jansen-Olesen I, Hay-Schmidt A, et al. A naturalistic glyceryl trinitrate infusion migraine model in the rat. *Cephalalgia*. 2012;32(1):73-84. <https://doi.org/10.1177/0333102411430855>
 27. Pedersen SH, Ramachandran R, Amrutkar DV, Petersen S, Olesen J, Jansen-Olesen I. Mechanisms of glyceryl trinitrate pro-

- ked mast cell degranulation. *Cephalalgia*. 2015;35(14):1287-97. <https://doi.org/10.1177/0333102415574846>
28. Hougaard Pedersen S, Maretty L, Ramachandran R, Sibben JA, Yakimov V, Elgaard-Christensen R, et al. RNA Sequencing of Trigeminal Ganglia in *Rattus Norvegicus* after Glyceryl Trinitrate Infusion with Relevance to Migraine. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155039>
29. Ford AP. In pursuit of P2X3 antagonists: novel therapeutics for chronic pain and afferent sensitization. *Purinergic Signal*. 2012;8(Suppl 1):3-26. <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9271-6>
30. Pradhan AA, Smith ML, McGuire B, Tarash I, Evans CJ, Charles A. Characterization of a novel model of chronic migraine. *Pain*. 2014;155(2):269-74. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.10.004>
31. Ferrari LF, Levine JD, Green PG. Mechanisms mediating nitroglycerin-induced delayed-onset hyperalgesia in the rat. *Neuroscience*. 2016;317:121-9. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.005>
32. McGuinness BW, Harris EL. "Monday head": an interesting occupational disorder. *Br Med J*. 1961;2(5254):745-7. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5254.745>
33. Guo S, Olesen J, Ashina M. Phosphodiesterase 3 inhibitor cilostazol induces migraine-like attacks via cyclic AMP increase. *Brain*. 2014;137(Pt 11):2951-9. <https://doi.org/10.1093/brain/awu244>
34. Maniyar FH, Sprenger T, Monteith T, Schankin C, Goadsby PJ. Brain activations in the premonitory phase of nitroglycerin-triggered migraine attacks. *Brain*. 2014;137(Pt 1):232-41. <https://doi.org/10.1093/brain/awt320>
35. Bates EA, Nikai T, Brennan KC, Fu YH, Charles AC, Basbaum AI, et al. Sumatriptan alleviates nitroglycerin-induced mechanical and thermal allodynia in mice. *Cephalalgia*. 2010;30(2):170-8. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2009.01864.x>
36. Brennan KC, Bates EA, Shapiro RE, Zyuzin J, Hallows WC, Huang Y, et al. Casein kinase i δ mutations in familial migraine and advanced sleep phase. *Sci Transl Med*. 2013;5(183):183ra56, 1-11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005784>
37. De Logu F, Landini L, Janal MN, Li Puma S, De Cesaris F, Geppetti P, et al. Migraine-provoking substances evoke periorbital allodynia in mice. *J Headache Pain*. 2019;20(1):18. <https://doi.org/10.1186/s10194-019-0968-1>
38. Cui Y, Toyoda H, Sako T, Onoe K, Hayashinaka E, Wada Y, et al. A voxel-based analysis of brain activity in high-order trigeminal pathway in the rat induced by cortical spreading depression. *Neuroimage*. 2015;108:17-22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.12.047>
39. Cui Y, Takashima T, Takashima-Hirano M, Wada Y, Shukuri M, Tamura Y, et al. 11C-PK11195 PET for the in vivo evaluation of neuroinflammation in the rat brain after cortical spreading depression. *J Nucl Med*. 2009;50(11):1904-11. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.066498>
40. Ji RR, Chamesian A, Zhang YQ. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science*. 2016;354(6312):572-7. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8924>
41. Spong KE, Rodríguez EC, Robertson RM. Spreading depolarization in the brain of *Drosophila* is induced by inhibition of the Na⁺/K⁺-ATPase and mitigated by a decrease in activity of protein kinase G. *J Neurophysiol*. 2016;116(3):1152-60. <https://doi.org/10.1152/jn.00353.2016>
42. Haerter K, Ayata C, Moskowitz MA. Cortical Spreading Depression: A Model for Understanding Migraine Biology and Future Drug Targets. *Headache Currents*. 2005;2(5):97-103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1743-5013.2005.00017.x>
43. Biosa G, Bastianoni S, Rustici M. Chemical waves. *Chemistry*. 2006;12(13):3430-7. <https://doi.org/10.1002/chem.200500929>
44. Kunkler PE, Hulse RE, Schmitt MW, Nicholson C, Kraig RP. Optical current source density analysis in hippocampal organotypic culture shows that spreading depression occurs with uniquely reversing currents. *J Neurosci*. 2005;25(15):3952-61. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0491-05.2005>
45. Gursoy-Ozdemir Y, Qiu J, Matsuoka N, Bolay H, Berman D, Jin H, et al. Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. *J Clin Invest*. 2004;113(10):1447-55. <https://doi.org/10.1172/jci21227>
46. Moskowitz MA. Genes, proteases, cortical spreading depression and migraine: impact on pathophysiology and treatment. *Funct Neurol*. 2007;22(3):133-6
47. Moskowitz MA, Nozaki K, Kraig RP. Neocortical spreading depression provokes the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. *J Neurosci*. 1993;13(3):1167-77. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-03-01167.1993>
48. Liu CH, You Z, Ren J, Kim YR, Eikermann-Haerter K, Liu PK. Noninvasive delivery of gene targeting probes to live brains for transcription MRI. *Faseb j*. 2008;22(4):1193-203. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9557com>
49. Ayata C, Jin H, Kudo C, Dalkara T, Moskowitz MA. Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann Neurol*. 2006;59(4):652-61. <https://doi.org/10.1002/ana.20778>

50. Lauritzen M. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain*. 1994;117 (Pt 1):199-210. <https://doi.org/10.1093/brain/117.1.199>
51. Kleberg J, Petzold GC, Major S, Dirnagl U, Dreier JP. ET-1 induces cortical spreading depression via activation of the ETA receptor/phospholipase C pathway in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(4):H1339-46. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00227.2003>
52. Otori T, Greenberg JH, Welsh FA. Cortical spreading depression causes a long-lasting decrease in cerebral blood flow and induces tolerance to permanent focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(1):43-50. <https://doi.org/10.1097/01.Wcb.0000035180.38851.38>
53. Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, et al. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(8):4687-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.071582498>
54. Fabricius M, Fuhr S, Bhatia R, Boutelle M, Hashemi P, Strong AJ, et al. Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain*. 2006;129(Pt 3):778-90. <https://doi.org/10.1093/brain/awh716>
55. Mayevsky A, Doron A, Manor T, Meilin S, Zarchin N, Ouzkine GE. Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain Res*. 1996;740(1-2):268-74. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)00874-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)00874-8)
56. Milner PM. Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leão. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1958;10(4):705. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(58\)90073-7](https://doi.org/10.1016/0013-4694(58)90073-7)
57. Olesen J, Larsen B, Lauritzen M. Focal hyperemia followed by spreading oligemia and impaired activation of rCBF in classic migraine. *Ann Neurol*. 1981;9(4):344-52. <https://doi.org/10.1002/ana.410090406>
58. Lauritzen M, Skyhøj Olsen T, Lassen NA, Paulson OB. Changes in regional cerebral blood flow during the course of classic migraine attacks. *Ann Neurol*. 1983;13(6):633-41. <https://doi.org/10.1002/ana.410130609>
59. PENFIELD W, McNAUGHTON F. DURAL HEADACHE AND INNERVATION OF THE DURA MATER. *Archives of Neurology & Psychiatry*. 1940;44(1):43-75. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1940.02280070051003>
60. Amin FM, Asghar MS, Hougaard A, Hansen AE, Larsen VA, de Koning PJ, et al. Magnetic resonance angiography of intracranial and extracranial arteries in patients with spontaneous migraine without aura: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2013;12(5):454-61. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(13\)70067-x](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(13)70067-x)
61. May A, Goadsby PJ. The trigeminovascular system in humans: pathophysiologic implications for primary headache syndromes of the neural influences on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(2):115-27. <https://doi.org/10.1097/00004647-199902000-00001>
62. Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(10):570-84. <https://doi.org/10.1038/nrn3057>
63. Holland PR, Akerman S, Goadsby PJ. Modulation of nociceptive dural input to the trigeminal nucleus caudalis via activation of the orexin 1 receptor in the rat. *Eur J Neurosci*. 2006;24(10):2825-33. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05168.x>
64. Liu Y, Broman J, Edvinsson L. Central projections of the sensory innervation of the rat middle meningeal artery. *Brain Res*. 2008;1208:103-10. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.078>
65. Melo-Carrillo A, Strassman AM, Nir RR, Schain AJ, Nosedá R, Stratton J, et al. Fremanezumab-A Humanized Monoclonal Anti-CGRP Antibody-Inhibits Thinly Myelinated (Aδ) But Not Unmyelinated (C) Meningeal Nociceptors. *J Neurosci*. 2017;37(44):10587-96. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2211-17.2017>
66. Hu J, Milenkovic N, Lewin GR. The high threshold mechanotransducer: a status report. *Pain*. 2006;120(1-2):3-7. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.11.002>
67. Charbit AR, Akerman S, Goadsby PJ. Trigemino-cervical complex responses after lesioning dopaminergic A11 nucleus are modified by dopamine and serotonin mechanisms. *Pain*. 2011;152(10):2365-76. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.07.002>
68. Pozo-Rosich P, Storer RJ, Charbit AR, Goadsby PJ. Periaqueductal gray calcitonin gene-related peptide modulates trigeminovascular neurons. *Cephalalgia*. 2015;35(14):1298-307. <https://doi.org/10.1177/0333102415576723>
69. Nosedá R, Bernstein CA, Nir RR, Lee AJ, Fulton AB, Bertisch SM, et al. Migraine photophobia originating in cone-driven retinal pathways. *Brain*. 2016;139(Pt 7):1971-86. <https://doi.org/10.1093/brain/aww119>
70. Bloom FE. To spritz or not to spritz: the doubtful value of aimless iontophoresis. *Life Sci*. 1974;14(10):1819-34. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(74\)90400-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(74)90400-7)
71. Donaldson C, Boers PM, Hoskin KL, Zagami AS, Lambert GA. The role of 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors in the selective inhibitory effect of naratriptan on trigeminovascular neurons. *Neuropharmacology*. 2002;42(3):374-85. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(01\)00190-3](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(01)00190-3)
72. Storer RJ, Akerman S, Goadsby PJ. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) modulates nociceptive trigeminovascular

- transmission in the cat. *Br J Pharmacol.* 2004;142(7):1171-81. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705807>
73. Shields KG, Goadsby PJ. Serotonin receptors modulate trigeminovascular responses in ventroposteromedial nucleus of thalamus: a migraine target? *Neurobiol Dis.* 2006;23(3):491-501. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.04.003>
74. Thankachan S, Katsuki F, McKenna JT, Yang C, Shukla C, Deisseroth K, et al. Thalamic Reticular Nucleus Parvalbumin Neurons Regulate Sleep Spindles and Electrophysiological Aspects of Schizophrenia in Mice. *Sci Rep.* 2019;9(1):3607. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40398-9>
75. Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol.* 1990;296(4):517-30. <https://doi.org/10.1002/cne.902960402>
76. Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell.* 1988;54(4):541-52. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90076-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90076-1)
77. Gallo FT, Kathe C, Morici JF, Medina JH, Weisstaub NV. Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Front Behav Neurosci.* 2018;12:79. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00079>
78. Coggeshall RE. Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol.* 2005;77(5):299-352. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.11.002>
79. Sundquist SJ, Nisenbaum LK. Fast Fos: rapid protocols for single- and double-labeling c-Fos immunohistochemistry in fresh frozen brain sections. *J Neurosci Methods.* 2005;141(1):9-20. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.05.007>
80. Morgan JI, Curran T. Calcium as a modulator of the immediate-early gene cascade in neurons. *Cell Calcium.* 1988;9(5-6):303-11. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(88\)90011-5](https://doi.org/10.1016/0143-4160(88)90011-5)
81. Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull.* 1998;45(1):1-8. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(97\)00277-3](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(97)00277-3)
82. Bergerot A, Holland PR, Akerman S, Bartsch T, Ahn AH, MaassenVanDenBrink A, et al. Animal models of migraine: looking at the component parts of a complex disorder. *Eur J Neurosci.* 2006;24(6):1517-34. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05036.x>
83. Hoskin KL, Bulmer DC, Goadsby PJ. Fos expression in the trigeminocervical complex of the cat after stimulation of the superior sagittal sinus is reduced by L-NAME. *Neurosci Lett.* 1999;266(3):173-6. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(99\)00281-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(99)00281-5)
84. Tassorelli C, Joseph SA. Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Res.* 1995;682(1-2):167-81. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00348-t](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00348-t)
85. May A, Goadsby PJ. Substance P receptor antagonists in the therapy of migraine. *Expert Opin Investig Drugs.* 2001;10(4):673-8. <https://doi.org/10.1517/13543784.10.4.673>
86. Shephard SL, Williamson DJ, Williams J, Hill RG, Hargreaves RJ. Comparison of the effects of sumatriptan and the NK1 antagonist CP-99,994 on plasma extravasation in Dura mater and c-fos mRNA expression in trigeminal nucleus caudalis of rats. *Neuropharmacology.* 1995;34(3):255-61. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(94\)00153-j](https://doi.org/10.1016/0028-3908(94)00153-j)
87. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature.* 1987;328(6131):632-4. <https://doi.org/10.1038/328632a0>
88. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 1999;79(1):143-80. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.143>
89. Martins-Oliveira M, Akerman S, Holland PR, Hoffmann JR, Tavares I, Goadsby PJ. Neuroendocrine signaling modulates specific neural networks relevant to migraine. *Neurobiol Dis.* 2017;101:16-26. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.01.005>
90. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods.* 1994;53(1):55-63. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9)
91. Minett MS, Quick K, Wood JN. Behavioral Measures of Pain Thresholds. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2011;1(3):383-412. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo110116>
92. Hansen JM, Thomsen LL, Olesen J, Ashina M. Familial hemiplegic migraine type 1 shows no hypersensitivity to nitric oxide. *Cephalalgia.* 2008;28(5):496-505. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2008.01559.x>
93. Farajdokht F, Mohaddes G, Shanebandi D, Karimi P, Babri S. Ghrelin attenuated hyperalgesia induced by chronic nitroglycerin: CGRP and TRPV1 as targets for migraine management. *Cephalalgia.* 2018;38(11):1716-30. <https://doi.org/10.1177/0333102417748563>
94. Ben Aissa M, Tipton AF, Bertels Z, Gandhi R, Moye LS, Novack M, et al. Soluble guanylyl cyclase is a critical regulator of migraine-associated pain. *Cephalalgia.* 2018;38(8):1471-84. <https://doi.org/10.1177/0333102417737778>
95. Edelmayer RM, Vanderah TW, Majuta L, Zhang ET, Fioravanti B, De Felice M, et al. Medullary pain facilitating neurons mediate allodynia in headache-related pain. *Ann Neurol.* 2009;65(2):184-93. <https://doi.org/10.1002/ana.21537>
96. Fioravanti B, Kasasbeh A, Edelmayer R, Skinner DP, Jr., Hartings JA, Burklund RD, et al. Evaluation of cutaneous allody-

- nia following induction of cortical spreading depression in freely moving rats. *Cephalalgia*. 2011;31(10):1090-100.<https://doi.org/10.1177/0333102411410609>
97. Filiz A, Tepe N, Eftekhari S, Boran HE, Dilekoz E, Edvinsson L, et al. CGRP receptor antagonist MK-8825 attenuates cortical spreading depression induced pain behavior. *Cephalalgia*. 2019;39(3):354-65.<https://doi.org/10.1177/0333102417735845>
98. Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ, Jr., Wang Y, Lawrence D, D'Andrea MR, et al. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron*. 2007;54(3):379-86.<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.017>
99. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1988;32(1):77-88.[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90026-7)
100. Anderson EM, Mills R, Nolan TA, Jenkins AC, Mustafa G, Lloyd C, et al. Use of the Operant Orofacial Pain Assessment Device (OPAD) to measure changes in nociceptive behavior. *J Vis Exp*. 2013(76):e50336.<https://doi.org/10.3791/50336>