

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LEVKROMAKALİMİN SIÇANLARDA AKUT MİGREN BENZERİ
FENOTİP İNDÜKLEYİCİ ETKİSİ VE KORTİKAL YAYILAN
DEPOLARİZASYON İLE İLİŞKİSİ

Dr. Berkay Alpay

Tıbbi Farmakoloji
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2024

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LEVKROMAKALİMİN SIÇANLARDA AKUT MİGREN BENZERİ
FENOTİP İNDÜKLEYİCİ ETKİSİ VE KORTİKAL YAYILAN
DEPOLARİZASYON İLE İLİŞKİSİ**

Dr. Berkay Alpay

**Tıbbi Farmakoloji
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet Yıldırım SARA**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Hayrunnisa BOLAY BELEN**

**ANKARA
2024**

**LEVKROMAKALİMİN SIÇANLARDA AKUT MİGREN BENZERİ
FENOTİP İNDÜKLEYİCİ ETKİSİ VE KORTİKAL YAYILAN
DEPOLARİZASYON İLE İLİŞKİSİ**

Berkay Alpay

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Yıldırım Sara

İkinci Danışman: Prof. Dr. Hayrunnisa Bolay Belen

Bu tez çalışması 01.07.2024 tarihinde jürimiz tarafından “Tıbbi Farmakoloji Doktora Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Alper B. İskit

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Melih Ö. Babaoğlu

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Doç. Dr. Güray Soydan

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Aslı Fahriye Ceylan

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

Üye:

Doç. Dr. Ergin Dileköz

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Gazi Üniversitesi

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezimin aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

04/07/2024
Berkay Alpay

Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Yıldırım Sara danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

(İmza)
Berkay Alpay

TEŞEKKÜR

Bilimi ve bilimsel süreci bizzat öğrendiğim, desteğiyle her daim yanımda olan, gerek laboratuvarında deneyde iken gerek bir fikri en iyi nasıl ifade edeceğimi titizlikle gösterirken sarf ettiği emekleri, yaşadığım en ufak bir problemde rahatlıkla iletişime geçip derdimi anlatabileceğim, bu tezin ve bu tezin sınırları dışında kalan tüm bilimsel projeler ve çalışmalarımın inşasındaki büyük katkıları için kendisine minnet duyduğum değerli tez danışmanım sayın Prof. Dr. Yıldırım Sara'ya,

Akademiye ve doktora çalışmalarına adım attığım ilk anda desteğini hissettiğim, beni baş ağrısı camiasıyla tanıştırap bu camianın bir ferdi olmaya sevk ve teşvik eden, azim ve çalışkanlığıyla bana ilham kaynağı olan, öğrencisi olma fırsatı bulmuş olduğum süre zarfında her daim bana titizlikle yol gösterip beni eğiterek bilimsel gelişmemde yadsınamaz katkıları için minnet duyduğum ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Hayrunnisa Bolay'a,

MD-PhD programına ilk kabul aldığımda tanıştığım, beni program süresince destekleyen MD-PhD program danışmanım başta sayın Prof. Dr. Alper Bektaş İskit'e ve üzerimde emeği bulunan tüm Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Doktora sürecimin başlamasıyla tanıştığım, tezim sürecinde bilimsel tecrübelerinden çokça faydalandığım, emekdaşlıkları hayat boyu dostluğa dönüşmüş olan çok değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Barışcan Çimen ve Dr. Elif Akaydın'a,

Doktora öğrencisi olarak burs aldığım Türkiye Cumhuriyeti'nin bilimsel kuruluşları olan TÜBİTAK ve YÖK'e,

Beni bugüne kadar tüm benlikleriyle sonsuzca destekleyen, tüm başarılarım üzerindeki haklarını asla ödeyemeyeceğim ve tezimi ithaf etmekten gurur duyduğum babam eczacı Mehmet Ali Alpay ve annem Funda Alpay'a teşekkürü borç bilirim.

Bu vesileyle, farmakoloji mütehassısı eczacı emekli general dedem Bekir Gültekin'i anıyor, kendisine Allah'tan rahmet diliyorum.

Bu tez yazılırken TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında destek alınmıştır.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından THD-2022-20171 numaralı proje bütçesi ile desteklenmiştir.

ÖZET

Alpay B., Levkromakalimin Sıçanlarda Akut Migren Benzeri Fenotip İndükleyici Etkisi ve Kortikal Yayılan Depolarizasyon ile İlişkisi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2024. Migren atakları, migren hastalarında aura benzeri semptomları tetikleyebilen levkromakalim (*levkromakalim* - LVC) de dahil olmak üzere çeşitli maddeler tarafından indüklenebilmektedir. Çalışmamızda, tek bir LVC enjeksiyonunun sıçanlarda akut migren benzeri fenotipe neden olup olmadığı ve kortikal yayılan depolarizasyonu (KYD) indükleyip/modüle edip etmediği araştırıldı. Wistar sıçanlara LVC (1 mg/kg, ip) uygulanmış ve kontrol (CTRL) ve nitrogliserin (NTG, 10 mg/kg, ip) gruplarıyla karşılaştırıldı. Periorbital ve arka pati mekanik allodini Von Frey filamentleriyle; ışıktan kaçınma ve anksiyete ile ilgili davranışlar karanlık-aydınlık kutusu, yükseltilmiş artı testi ve açık alan arena testi ile değerlendirildi. LVC'nin KYD parametreleri, somatosensoriyel uyarılmış potansiyeller (SSEP) ve bazal dural elektroensefalografi (EEG) üzerindeki etkileri araştırıldı. Olası KYD kaynaklı c-fos ekspresyonu Western Blot ile incelendi. Korteksteki kan-beyin bariyeri bütünlüğü Evans mavisi testi ile incelendi. LVC ve NTG sırasıyla 30 ve 120 dakika içinde periorbital mekanik eşikleri belirgin biçimde azalttı, anksiyete benzeri davranışları ve ışıktan kaçma davranışını indükledi. LVC'nin indüklediği migren benzeri fenotip 2 saat içinde düzelirken, NTG uygulanan grupta bulgular 4 saatten önce tam olarak düzelmedi. LVC, DC (doğru akım) shifti, EEG değişikliklerini veya KYD'ye özgü c-fos ekspresyonunu tetiklemedi. LVC KYD'yi *de novo* indüklememiş ve yayılma başarısızlığındaki artış dışında KYD parametrelerini etkilemedi. NTG hem KYD duyarlılığını hem de yayılma başarısızlığını önemli ölçüde artırdı. Hem LVC hem de NTG gruplarında SSEP latansları KYD'den sonra uzadı. Akut LVC veya NTG enjeksiyonu kortikal kan beyin bariyeri geçirgenliğini artırmadı. LVC'nin hızlı etkisinin trigeminal sistemdeki fonksiyonel değişikliklerle ve potasyum kanal açıcı özellikleriyle ilişkili olduğunu düşünülebilir. Buradaki nörobiyolojik mekanizmalarının anlaşılması, migren tedavisinde yeni bir hedef sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: levkromakalim, migren, aura, kortikal yayılan depolarizasyon, c-fos, allodini

ABSTRACT

Alpay B., The Acute Migraine-like Phenotype Inducing Effect of Levromakalim and Its Relationship with Cortical Spreading Depolarization in Rats, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Department of Medical Pharmacology, Ankara, 2024. Migraine attacks can be triggered by various substances. Levromakalim elicits aura in individuals with migraine with aura. In this study, we explored the migraine-like phenotype inducing properties of levromakalim (LVC) on rats. We examined if a single injection of LVC could cause a migraine-like phenotype and affect cortical spreading depolarization (CSD) in rats, a model of migraine aura. Rats were given 1 mg/kg LVC, and were compared to control and 10 mg/kg nitroglycerin groups. We measured periorbital and hind paw mechanical allodynia using Von Frey filaments. Anxiety-related behaviors and light sensitivity were assessed using the elevated plus maze, dark-light box and open field arena. We also examined the effects of LVC on CSD parameters, somatosensory evoked potentials, dural electroencephalography, and blood-brain barrier integrity. Both LVC and NTG reduced periorbital mechanical thresholds, induced anxiety-like behaviors, and caused photophobia within 30 and 120 minutes, respectively. The migraine-like phenotype induced by LVC recovered in 2 hours, while the NTG group took 4 hours to fully recover. LVC did not provoke any CSD or CSD-like change such as DC shift, EEG alterations, or cortical c-fos expression. LVC did not induce CSD *de novo* and had minimal effects on CSD parameters, except for an increase in propagation failure. However, NTG significantly increased both CSD susceptibility and propagation failure. SSEP latencies were prolonged after CSD in LVC group. Acute LVC or NTG injection did not increase blood-brain barrier permeability. In conclusion, a single administration of LVC induced a migraine-like phenotype with fast onset and recovery, which is not mediated by CSD waves in the cerebral cortex. LVC-triggered rapid-onset migraine-like symptoms may be related to functional changes in the trigeminal system and the potassium channel opening properties of LVC. Understanding these neurobiological mechanisms could offer a new target for migraine treatment.

Keywords: levromakalim, migraine, aura, cortical spreading depolarization, c-fos, allodynia

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	iii
YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. Migren	5
2.1.1. Tanım	5
2.1.2. Migren Prevalansı	7
2.1.3. Migrenin Tanı Kriterleri	8
2.1.4. Migrenin Patofizyolojisi	9
2.1.5. Migren ve Nöronal Hipereksitabilite	15
2.1.6. Migren İndükleyici Maddeler	17
2.1.7. Migren ve ATP kapılı Potasyum Kanalları	19
2.1.8. Preklinik Migren Modelleri	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. Deney Hayvanları	28
3.2. Deney Protokolü ve Grupları	28
3.3. Davranış Deneyleri	30
3.3.1. Von Frey Filamanı Testi	30
3.3.2. Yükseltilmiş Artı Testi	32
3.3.3. Karanlık-Aydınlık Kutu Testi	33

3.3.4. Açık Alan Arena Testi	34
3.5. İn vivo Elektrofizyoloji	35
3.6. Protein Düzeyi Ölçümü	37
3.6.1. Doku Toplanması	37
3.6.2. Protein İzolasyonu	37
3.6.3. Protein Konsantrasyon Ölçümü	37
3.6.4. Western Blot	38
3.7. Kan Beyin Bariyeri Permeabilite Değerlendirmesi	39
3.8. İstatistiksel Metodoloji	39
4. BULGULAR	
4.1. Nitrogliserin veya Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modellerinde Periorbital ve Arka Pati Mekanik Eşikleri	40
4.2. Nitrogliserin veya Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modellerinde Ağrı İlişkili Anksiyete ve Işıktan Kaçma Davranışı	42
4.3. Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modelinde Kortikal c-fos Ekspresyonu	44
4.4. Nitrogliserin veya Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modellerinde Kortikal Yayılan Depolarizasyon Parametreleri	45
4.5. Nitrogliserin veya Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modellerinde Somatosensoryel Uyarılmış Potansiyel Parametreleri	47
4.6. Nitrogliserin veya Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modellerinde Güç Spektrum Analizi	49
4.7. Nitrogliserin veya Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modellerinde Kortikal Kan Beyin Bariyeri Permeabilitesi	51
5. TARTIŞMA	
5.1. Nitrogliserin veya Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modellerinin Davranışsal Karakterizasyonu	53
5.2. Nitrogliserin veya Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modellerinin Elektrofizyolojik Karakterizasyonu	57
5.3. Nitrogliserin veya Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modellerinin Moleküler Karakterizasyonu	59
5.4. Çalışmanın Kısıtlılıkları	60

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
7. KAYNAKLAR	62
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu ve Dijital Makbuz	
EK-3: Tez Çalışmasından Üretilen Makale	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AC	Alternatif Akım (<i>Alternative Current</i>)
AP	Anteroposterior
5-HD	5-hidroksidekanoik asit
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
ATP	Adenozin trifosfat
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
CGRP	Kalsitonin gen ilişkili peptit (<i>Calcitonin gene-related peptide</i>)
cm	santimetre
CTRL	Kontrol (<i>Control</i>)
DC	Direkt Akım (<i>Direct Current</i>)
EAAT1	Eksitator aminoasit taşıyıcısı 1
EEG	Elektroensefalografi
EM	Evans mavisi
g	gram
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
ICHD	Uluslararası Baş Ağrısı Bozuklukları Sınıflaması (<i>International Classification of Headache Disorders</i>)
IHS	Uluslararası Baş Ağrısı Derneği (<i>International Headache Society</i>)
K_{ATP} kanalı	ATP kapılı potasyum kanalı
KBB	Kan beyin bariyeri
KCl	Potasyum klorür
KYD	Kortikal yayılan depolarizasyon
LVC	Levkromakalim (<i>Levcromakalim</i>)
lx	Lüks
mA	Miliamper
mitoK_{ATP} kanalı	Mitokondrial ATP kapılı potasyum kanalı
ML	Mediolateral

NIH	<i>National Institute of Health</i>
NO	Nitrik oksit
NTG	Nitrogliserin
PACAP-38	Hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptit-38 (<i>Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38</i>)
PDE	Fosfodiesteraz
PVDF	Poliviniliden florür
SSEP	Somatosensoriyel uyarılmış potansiyel (<i>Somatosensorial Evoked Potential</i>)
SUR	Sülfonilüre reseptörü
TBS-T	Tris-tamponlu salin – Tween 20
TSK	Trigeminoservikal kompleks
V	Volt
VEH	Vehikül
VKKK	Voltaj kapılı kalsiyum kanalı
μ	Mikro

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Sintilasyonların eşlik ettiği bir skotomun dakikalar içindeki değişimini gösteren örnek çizim.	6
2.2.	Uluslararası Başağrısı Cemiyeti tarafından yayımlanan görsel aura tablosu.	7
2.3.	Dünyada ülkelere göre migren prevalansı.	8
2.4.	Trigeminal sistem ve migren baş ağrısı matrisi.	10
2.5.	KYD'nin serebral korteks boyunca yayılma mekanizması.	11
2.6.	KYD'nin üzerinden ilerlediği nöronlardaki iyonik değişimler.	12
2.7.	C-fos aktivasyon yolağı ve örnek immünohistokimyasal görüntü.	13
2.8.	KYD'nin indüklediği kan akımı değişikliğinin zamana bağlı gösterimi.	14
2.9.	Migrendeki hipereksitabilite ile ilişkili mekanizmalar.	16
2.10.	Vizüel uyarılmış potansiyel ve somatosensoriyel uyarılmış potansiyel ölçümleri.	17
2.11.	Migren provokasyon çalışmalarından elde edilmiş farklı migren indükleyici maddelerin migren atağı indükleme oranları.	18
2.12.	K _{ATP} kanalı morfolojisi ve ekspresyon profili.	20
2.13.	ATP kapılı potasyum kanallarının CGRP, PACAP ve NO sinyal yollarıyla ilişkisi.	22
2.14.	K _{ATP} kanalı açıcı ve blokörlerinin kimyasal yapıları.	23
3.1.	Deney protokolü ve zaman çizelgesi.	29
3.2.	Arka pati ve periorbital mekanik allodini test aparatları.	31
3.3.	Yükseltilmiş artı testi platformu.	32

3.4.	Karanlık-aydınlık kutu testi.	33
3.5.	Açık alan arena testi.	34
3.6.	Elektrofizyoloji deney ekipmanları.	36
3.7.	Örnek KYD ve SSEP traseleri ve bu traselerden ölçülen parametreler.	36
4.1.	CTRL, NTG ve LVC gruplarında zamana göre periorbital eşiklerdeki değişim.	40
4.2.	CTRL, NTG ve LVC gruplarında zamana göre arka pati eşiklerindeki değişim.	41
4.3.	CTRL, NTG ve LVC gruplarında ağrı ilişkili anksiyete benzeri davranış ve ışıktan kaçma davranışı.	43
4.4.	CTRL, KYD ve LVC gruplarında uyanık hayvanlardan toplanmış doku örneklerinde kortikal c-fos ifadeleri.	44
4.5.	CTRL, NTG ve LVC gruplarında KYD parametreleri.	46
4.6.	CTRL, NTG ve LVC gruplarında SSEP parametreleri.	48
4.7.	CTRL, NTG ve LVC gruplarında güç spektrumu analizleri.	50
4.8.	CTRL, NTG ve LVC gruplarında kortikal kan beyin bariyeri geçirgenliği.	52
5.1.	İnsan çalışmalarında levkromakalim enjeksiyonundan sonra auralı migren ataklarının başlamasına kadar geçen medyan süre grafiği.	54
5.2.	Kronik levkromakalim enjeksiyonu ile oluşturulan migren modelinde geçmiş literatüre ait von Frey ölçümleri.	55

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Prelinik Migren Modelleri	25

1. GİRİŞ

Migren baş ağrısı, dünya genelinde yaklaşık 800 milyon insanın muzdarip olduğu yaygın bir sağlık sorunudur (1). Migren atağında, 4 ila 72 saat süren tek taraflı zonklayıcı ağrı, fotofobi, fonofobi, bulantı ve kusma görülebilmektedir (2). Migren hastalarının yaklaşık %30'unda genellikle baş ağrılarında önce olan ve 1 saat süren auralar bulunur. Bu auralar, genellikle görsel, işitsel, somatosensoriyel ve motor anormallikleri içeren geçici, tamamen geri dönüşümlü fokal nörolojik bozukluklardır (3).

Migren aurası, atağın başlamasından önce, baş ağrısıyla aynı anda veya sonrasında ortaya çıkabilir. Görsel semptomlar arasında skotomlar, sintilasyonlar ve zikzaklar en yaygın olanlardır. Aura semptomları genellikle 30-60 dakika içinde tedricen genişleyerek yayılır (4). Birden fazla semptom varsa, genellikle önce görsel semptomlar olmak üzere art arda ortaya çıkarlar. Somatosensoriyel aura genellikle yüzde veya üst ekstremitelerde parestezi ve uyuşma ile karakterizedir (5, 6). Beyin sapı aurası, nadir görülen semptomlar arasında yer alır ve dizartri, vertigo, kulak çınlaması, hiperakuzi, diplopi ve ataksi içerebilir (7).

Uluslararası Baş Ağrısı Derneği'nin tanı kriterlerine (IHS-ICHD-3) göre, temelde migren auralı, aurasız ve kronik migren olarak sınıflandırılmaktadır. Atak sıklığına göre epizodik ve kronik migren olarak tanımlanmaktadır (8). Migren atağı, 4-72 saat süren tedavi edilmemiş veya yetersiz tedavi uygulandığında ortaya çıkan baş ağrısı ataklarıyla karakterizedir. Baş ağrısı şu dört özellikten en az ikisine sahip olmalıdır: tek taraflı yerleşim, zonklayıcı nitelik, orta veya şiddetli ağrı yoğunluğu, rutin fiziksel aktivitenin şiddetlenmesi veya bunlardan kaçınmaya neden olması. Bu baş ağrısına bulantı ve/veya kusma, fotofobi ve fonofobiden en az biri eşlik etmektedir. Ayrıca, baş ağrısı başka bir ICHD-3 tanısı ile açıklanamaz olmalıdır. Auralı migren atağı tanısı koymak için, geri dönüşlü aura semptomlarından en az biri (görsel, duyuşsal, konuşma/dil becerisi, motor beceri, beyin sapı, retinal) gerekmekte ve ayrıca şu altı özellikten en az üçü sağlanmalıdır: aura semptomlarının süresi, sıralı ortaya çıkışı, tek taraflılık, pozitif semptomların varlığı, auraya baş ağrısının eşlik etmesi veya auradan 5-60 dakika sonra baş ağrısının başlaması. Migren tanısı için bireyin yaşamı boyunca en az iki auralı migren atağı veya beş aurasız migren atağı geçirmiş olması gerekmektedir. Migren ataklarının klinik özellikleri hastalar arasında, aynı hastanın

farklı atakları arasında ve hastanın yaşamı boyunca önemli ölçüde değişiklik gösterebilir. Kronik migren ise ayda en az 8 gün migren baş ağrısı özellikleri gösteren, 3 aydan uzun süredir devam eden ve ayda 15 veya daha fazla gün ortaya çıkan baş ağrısı olarak tanımlanabilir.

Migren baş ağrısının temelinde, birinci sıra trigeminal nöronların steril inflamasyona bağlı aktivasyonu olduğu düşünülmektedir (9, 10). Ağrı, trigeminal sinirin nosiseptif dallarıyla trigeminoservikal komplekse (TSK) taşınır. Ve bu girdiler, talamik ventrobazal çekirdeğe ulaşarak ağrının bilinç boyutunda algılanmasını sağlar. Migren atağının tetikleyicisi hala net olarak belirlenememiş olup, perivasküler nöral afferent aktivasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu aktivasyon, dural damarlar üzerindeki parasempatik tonusu artırarak nöroinflamatuvar mediatörlerin salıverilmesine yol açabilir. Bununla birlikte, migrenin serebral bir kökeni olduğunu savunan görüşlere de rastlanmaktadır. Bir hipoteze göre auralı migren atağında, kortikal yayılan depolarizasyon (KYD) adı verilen bir depolarizasyon dalgasının, nöronal uyarımı başlatarak çeşitli nöromediatörlerin salıverilmesine neden olduğu düşünülmektedir (11). KYD'nin trigeminal nosiseptif yollarını aktive ettiği gösterilmiş olmasına rağmen, insanlarda KYD, aura sırasında net olarak gözlemlenmemiştir. KYD'nin yayılma hızı ve bazı klinik gözlemler arasındaki uyumsuzluklar, KYD'nin migren baş ağrısının tek tetikleyicisi olmadığını göstermektedir. Ayrıca, migren tedavisinde kullanılan CGRP antagonistleri gibi bazı ilaçların KYD'yi baskılamadan etkili olması, bu fenomenin migren ağrısıyla birebir ilişkili olmadığını düşündürmektedir (12).

Migren hastalarında bir diğer patoloji nöronal hipereksitabilite olarak kabul edilir (13). Çalışmalar P/Q tip kalsiyum kanallarının ve sodyum-potasyum ATPaz disfonksiyonunun bu aşırı uyarılabilirliğe yol açabileceğini göstermiştir (14-16). Epizodik ataksi ve hemiplejik migren hastalarında eksitatör aminoasit taşıyıcı 1 mutasyonunun glutamat geri alımını azaltarak nöronal hipereksitabiliteye neden olabileceği de yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (17). Klinik çalışmalarda ise migren hastalarında kortikal glutamat seviyeleri yüksek bulunmuştur (18). Ek olarak migren hastalarında duyuşsal kapılanmanın bozuk olduğu saptanmıştır (19). Duyuşsal kapılanmadaki bozukluklar vizüel ve somatosensöriyel uyarılmış potansiyeller ile gösterilebilir (20-22). KYD, nitrogliserin ve levkromakalim ile indüklenen migren

modellerinde somatosensoriyel uyarılmış potansiyellerin nasıl etkilendiği bilinmemektedir.

Migren patofizyolojisinin anlaşılmasına yönelik yapılan klinik çalışmalarda, migren hastalarına uygulanan maddelerin migren atağını başlatabildiği gösterilmiştir (23). Bu maddeler arasında CGRP, PACAP-38, nitrogliserin (NTG) ve silostazol bulunmaktadır (24-27). Migren hastaları, bu moleküllere maruz kaldıklarında migren atağı yaşarken, sağlıklı bireylerde hafif baş ağrısı veya hiç baş ağrısı görülmemektedir. Özellikle nitrogliserin infüzyonu, migren hastalarının büyük bir kısmında migren atağına neden olmuştur. Ancak, bu provokasyon çalışmalarında hem migren ağrısını hem de migren aurasını indükleyebilen maddeler arasında bir ATP kapılı potasyum kanalı açıcısı olan levkromakalim (LVC) öne çıkmaktadır (28, 29). Bu çalışmalarda, LVC aracılığıyla tetiklenen auralı migren atağı daha kısa sürede başlarken, diğer migren indükleyici maddelerde bu süre daha uzundur. LVC, aura tetikleyebilme özelliği bakımından diğer maddelerden ayrılmaktadır.

ATP kapılı potasyum kanalları ilk olarak kalp kasında bulunmuştur ve daha sonra pankreas, düz kas ve nöronlarda da tespit edilmiştir. Bu kanallar potasyum kanallarının "inward rectifier (ir)" türünden olup Kir6.x alt ailesine dahildir ve iki tür alt ünite içerir: Kir6.1 ve Kir6.2. KATP kanallarının aktivitesi, dört Kir alt ünitesine bağlı dört sülfonilüre reseptörü (SUR) ile düzenlenir (30, 31). Kanallar, yüksek ATP konsantrasyonlarında inhibe olurken, düşük ATP seviyelerinde aktive olurlar (32). Farklı dokularda, farklı Kir ve SUR kombinasyonları bulunur, örneğin pankreas β hücrelerinde Kir6.2/SUR1, miyokardda Kir6.2/SUR2A, vasküler düz kas hücrelerinde Kir6.1/SUR2B baskındır (30, 33-35). ATP kapılı potasyum kanallarının aktivasyonu vasküler düz kaslarda hiperpolarizasyon ve vazodilatasyona yol açar. Nitrik oksit ve siklik GMP, ATP kapılı potasyum kanallarını fosforilleyerek açılma olasılığını artırır (36). Fosfodiesteraz inhibitörleri de siklik AMP ve siklik GMP birikimine yol açarak kanalların açılmasını sağlar (37). Bu mekanizmalar halihazırda diğer migren indükleyicilerin etki mekanizmaları olup migren patofizyolojisinde yeri bilinmemektedir.

NTG ile indüklenen migren modeli, sıçan ve farelerde trigeminoservikal kompleks aktivasyonuna yol açar ve baş ağrısı benzeri bir fenotipe sebep olur (38, 39). Bu model aynı zamanda, migren hastalarında görülen anksiyete/depolarizasyon benzeri davranışları ve fotofobiyi de taklit edebilmektedir (26).

Çalışmamızda **hipotezlerimiz** şu şekildedir:

- 1) Levkromakalim sıçanlarda migren-benzeri bir fenotipi indükler.
- 2) Levkromakalimin sıçanlarda indüklediği migren benzeri fenotipe kortikal yayılan depolarizasyon eşlik eder.
- 3) Levkromakalim sıçanlarda KYD eşiğini düşürür.
- 4) Levkromakalim somatosensoriyel uyarılmış potansiyelleri ve genel kortikal ağ aktivitesini etkiler.

Çalışmamızda **amaçlarımız** şunlardır:

- 1) Akut intraperitoneal LVC uygulamasının sıçanlarda KYD ve baş ağrısı benzeri fenotipi indükleyip indükleyemeyeceğini araştırmak,
- 2) Kimyasal olarak indüklenen KYD parametrelerinin LVC tarafından değiştirilip değiştirilmediğini anlamak,
- 3) Sıçanlarda tek bir LVC enjeksiyonundan sonra olası duyuşal kapılanmadaki bozuklukları ve genel kortikal ağ aktivitesini değerlendirmek,
- 4) LVC enjeksiyonu sonrası direkt bir nöroinflamasyona sekonder ya da KYD aracılı bir kortikal kan beyin bariyeri bozukluğu olup olmadığını tespit etmek.

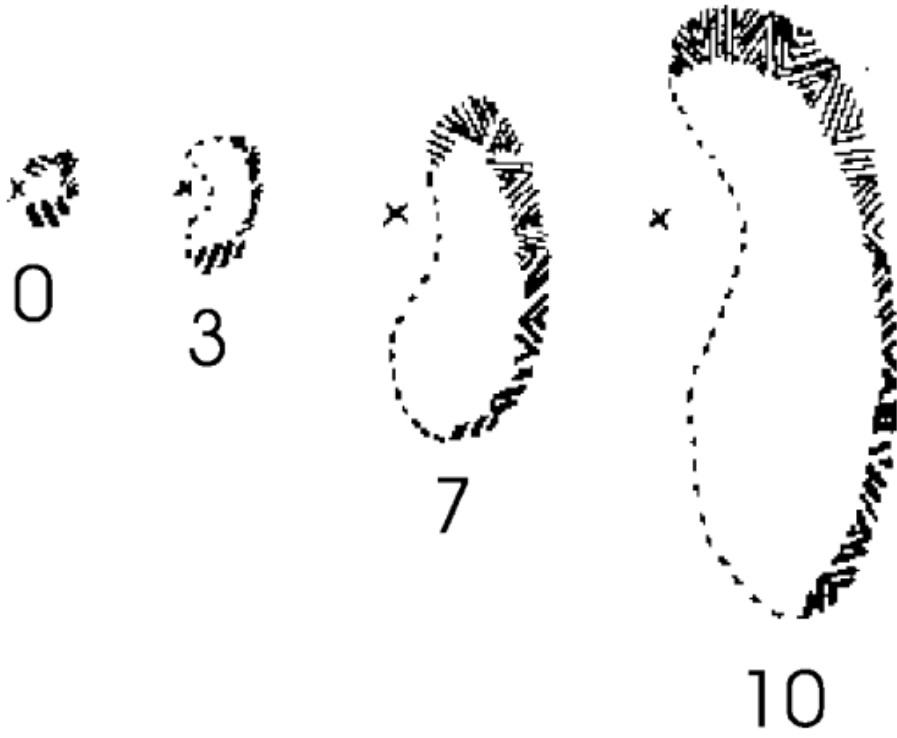
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Migren

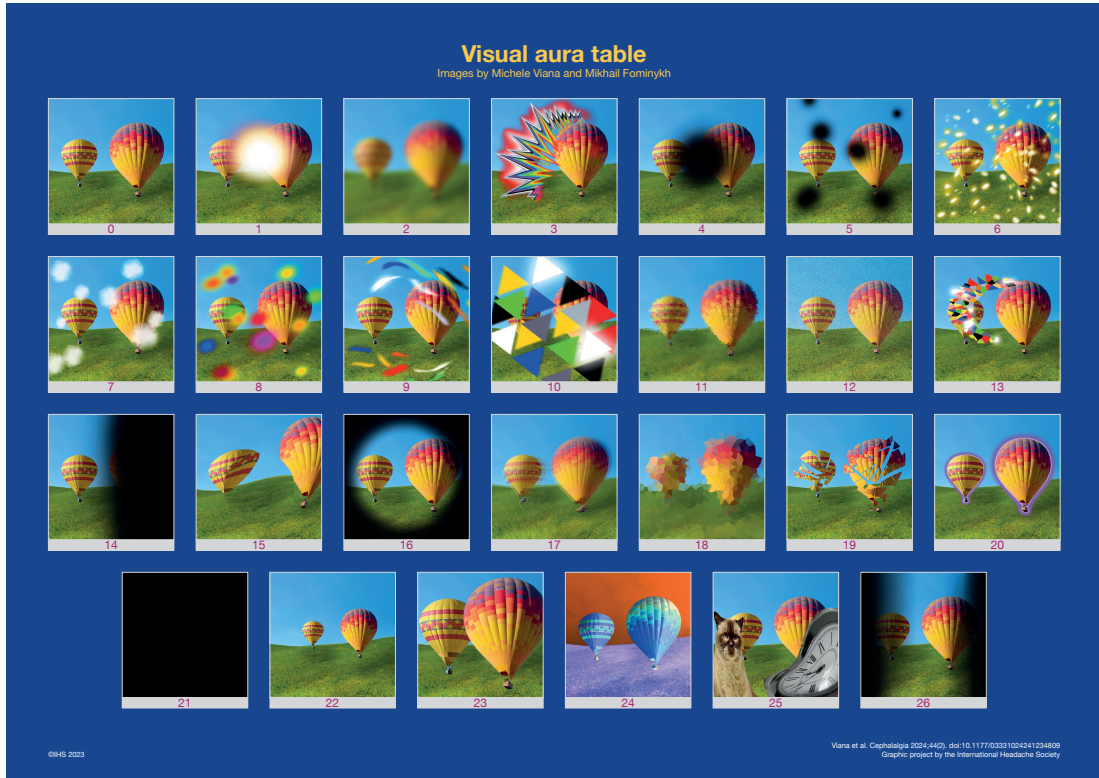
2.1.1. Tanım

Migren, dünya çapında milyonlarca insanın muzdarip olduğu primer bir baş ağrısıdır. 50 yaş altı kadın ve erkeklerde en sık üçüncü engellilik nedeni olarak tanımlanmaktadır (40). Hastalar 4 ilâ 72 saat süren, unilateral zonklayıcı ağrıdan, fotofobiden, fonofobiden, bulantı ve kusmadan şikâyet eder. Migren hastalarının yaklaşık %30'u baş ağrılarında önce seyreden ve yaklaşık 1 saat süren “auralar” yaşarlar. Bunlar görsel, işitsel, somatosensoriyel ve/veya motor anormallikler olarak ortaya çıkan geçici, tamamen geri dönüşümlü fokal nörolojik bozukluklardır (40, 41). Aura semptomlarının %90'ından fazlası görme duyusuyla ilişkilidir. En sık ikinci aura tipi ise somatosensoriyel auralardır ve genellikle bir ekstremitede, yüzde veya dilde iğnelenme, uyuşma ve/veya karıncalanma hissi ile karakterizedir (42).

Migren aurası bir migren atağında baş ağrısından önce, baş ağrısıyla aynı anda veya baş ağrısından sonra gerçekleşebilir. Görme alanının merkezinden periferine doğru ortaya çıkan skotomlar, sintilasyonlar ve zikzaklar şeklindeki görsel semptomlar en yaygın olanıdır (43), ancak duyusal, dil, motor ve 'beyin sapı' semptomları da ortaya çıkabilir (5). Aura semptomları tipik olarak 30-60 dakika içinde kademeli olarak genişleyerek yayılır. Birden fazla semptom mevcutsa, genellikle önce görsel semptomlar olmak üzere çoğunlukla art arda ortaya çıkar (5, 44). Yaygın olarak görsel aura, sintilasyonların eşlik ettiği skotom, genişleyen ve parıldayan ışık dalgasıyla başlar ve bunu görme bozukluğu takip eder (45, 46) (Şekil 2.1). Sintilasyonsuz skotom ve yanıp sönen ışıklar gibi sabit görsel semptomlar da ortaya çıkabilir (Şekil 2.2). İkinci en yaygın aura tipi olan somatosensoriyel aura auralı migren hastalarının %10'unu etkiler ve yüzde ve/veya üst ekstremitede parestezi ve uyuşma şeklinde kendini gösterir (5, 6). Beyin sapı aurasının eşlik ettiği migren alt tipi, migrenin nadir görülen bir alt tipidir. Bu aura tipinde dizartri, vertigo, kulak çınlaması, hiperakuzi, diplopi ve ataksi görülebilir (47).



Şekil 2.1. Sintilasyonların eşlik ettiği bir skotomun dakikalar içindeki değişimini gösteren örnek çizim. Çarpılar bakış merkezini, sayılar ise sintilasyonun ilk ortaya çıkışından itibaren geçen süreyi dakika cinsinden belirtmektedir. 46 numaralı referanstan uyarlanmıştır.



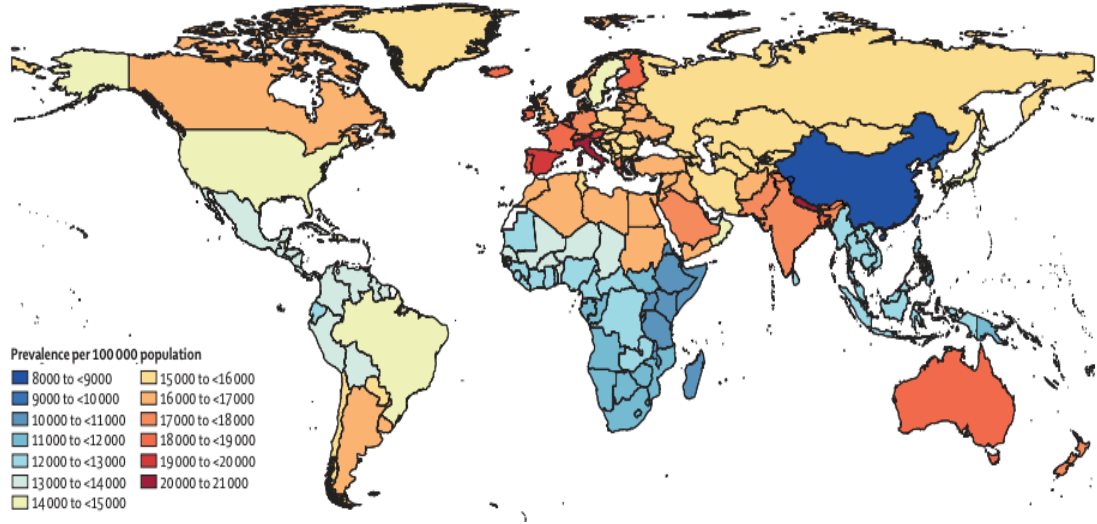
Şekil 2.2. Uluslararası Baş ağrısı Cemiyeti tarafından yayımlanan görsel aura tablosu. Tabloda “0” ile işaretli görüntü aura olmadan normal görüntü iken, diğer resimler sırasıyla farklı vizüel aura çeşitlerine ait görüntülerdir.

2.1.2. Migren Prevalansı

Migren prevalansının ölçümü için son bir yılda atak geçirip geçirmediği aktif hastalık için önemli bir kriterdir (1). Bu bağlamda, migrenin 1 yıllık prevalansının dünya çapında %15 civarında olduğu (%25-35 ile en yüksek Güneydoğu Asya’da, %9 ile en düşük Çin’de olacak şekilde) tahmin edilmektedir (Şekil 2.2) (48). Dokuz Avrupa ülkesinden verinin toplandığı Eurolight çalışmasında %35’e varan bir prevalans bildirilmiştir (49). Buna karşın, ABD merkezli çalışmalarda migren prevalansı %12-13 olarak belirlenmiştir (50).

Migren, erişkin hastalığı olup en çok 25-45 yaşları arasında görülür (48, 50-52). Yapılan çalışmalar, pediyatrik ve geriyatrik popülasyonlarda migrenin prevalansının azaldığını göstermektedir. Türkiye’de yapılan ve 6-17 yaşlar arası kapsayan bir çalışmada migren prevalansı %7 olarak bulunmuştur (53). ABD’de yapılan bir başka çalışmada ergenlerde migren prevalansı %6 olarak hesaplanmıştır.

Bu oran, ailede migren öyküsü olmayan ergenlerde %4'e kadar düşmektedir (54). Geriyatrik popülasyonda ise prevalansın %3-6 olduğu görülmüştür.



Şekil 2.3. Dünyada ülkelere göre migren prevalansı. Migren prevalansı gelişmiş dünya ülkelerinde %15-20 civarında seyrederken gelişmemiş ülkelerde %10 civarında seyretmektedir. Türkiye’de prevalans bu grafiğe göre %16’dır. 48 numaralı referanstan uyarlanmıştır.

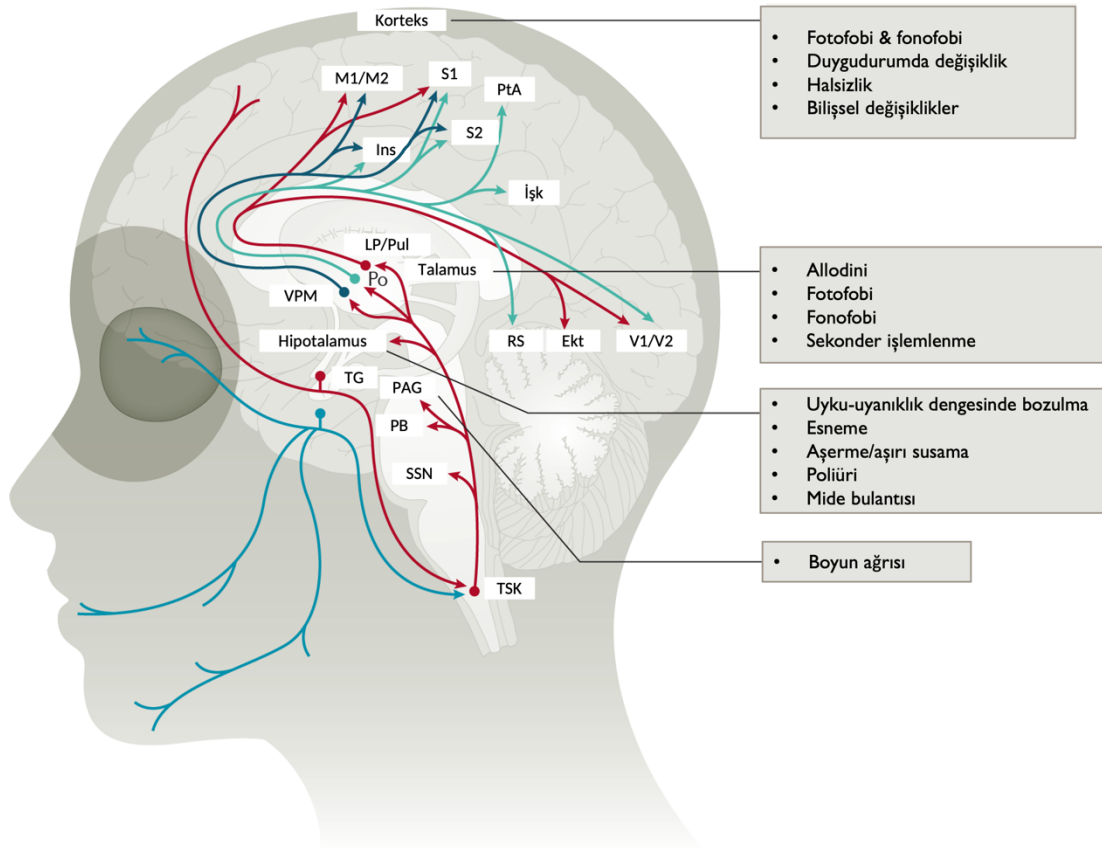
2.1.3. Migrenin Tanı Kriterleri

Uluslararası Baş Ağrısı Derneği (International Headache Society)'nin tanı kriterlerine (IHS-ICHD-3) göre migren ataklarının alt tipleri tanımlanmaktadır (55). Bu kriterlere göre migren, auranın eşlik edip etmemesine göre (auralı ve aurasız migren) ve atak sıklığına göre (epizodik ve kronik) olarak sınıflanmaktadır. Temelde migren atağı 4-72 saat süren baş ağrısı ataklarıyla (tedavi edilmediğinde veya yetersiz tedavi uygulandığında) karakterizedir. Baş ağrısı şu dört özellikten en az ikisine sahiptir: tek taraflı yerleşim, zonklayıcı nitelik, orta veya şiddetli ağrı yoğunluğu, rutin fiziksel aktivite (örneğin, yürüme veya merdiven çıkma) ile şiddetlenmesi veya bunlardan kaçınmaya neden olması. Baş ağrısı sırasında şu şikayetlerden en az biri eşlik etmektedir: bulantı ve/veya kusma, fotofobi ve fonofobi. Aynı zamanda bu baş ağrısı başka bir ICHD-3 tanısı ile daha iyi açıklanamaz olmalıdır. Auralı migren atağı tanısı koyabilmek için ise yukarıdaki kriterler haricinde şu kriterler de gerekmektedir: Tamamen geri dönüşlü aura semptomlarından en az biri: görsel, duyuşsal, konuşma ve/veya dil becerisi, motor beceri, beyin sapı, retinal. Şu altı özellikten en az üçünün de bulunması gerekmektedir: en az bir aura semptomunun ≥ 5 dakika boyunca

kademeli olarak yayılması, iki veya daha fazla aura belirtisinin arka arkaya ortaya çıkması, 5-60 dakika süren aura belirtileri, en az bir aura belirtisinin tek taraflı olması, en az bir aura belirtisinin pozitif semptom içermesi, auraya baş ağrısının eşlik etmesi ya da auradan 5-60 dakika sonra baş ağrısının başlaması. Pozitif semptomlar yanıp sönen ışıklar, zikzaklar, parlamalar, karıncalanma, iğne batması hissi gibi tariflenirken negatif semptomlar görmede kayıp (skotom), uyuşma gibi hissin yokluğu ile karakterize semptomlar olarak tariflenirler (56). Bir kişiye migren tanısının konabilmesi için bireyin yaşamı boyunca en az 2 auralı migren atağı veya 5 aurasız migren atağı geçirmiş olması gerekmektedir. Migren ataklarının klinik özellikleri hastalar arasında, aynı hastadaki ataklar arasında ve hastanın yaşamı boyunca önemli ölçüde değişiklik gösterebilir.

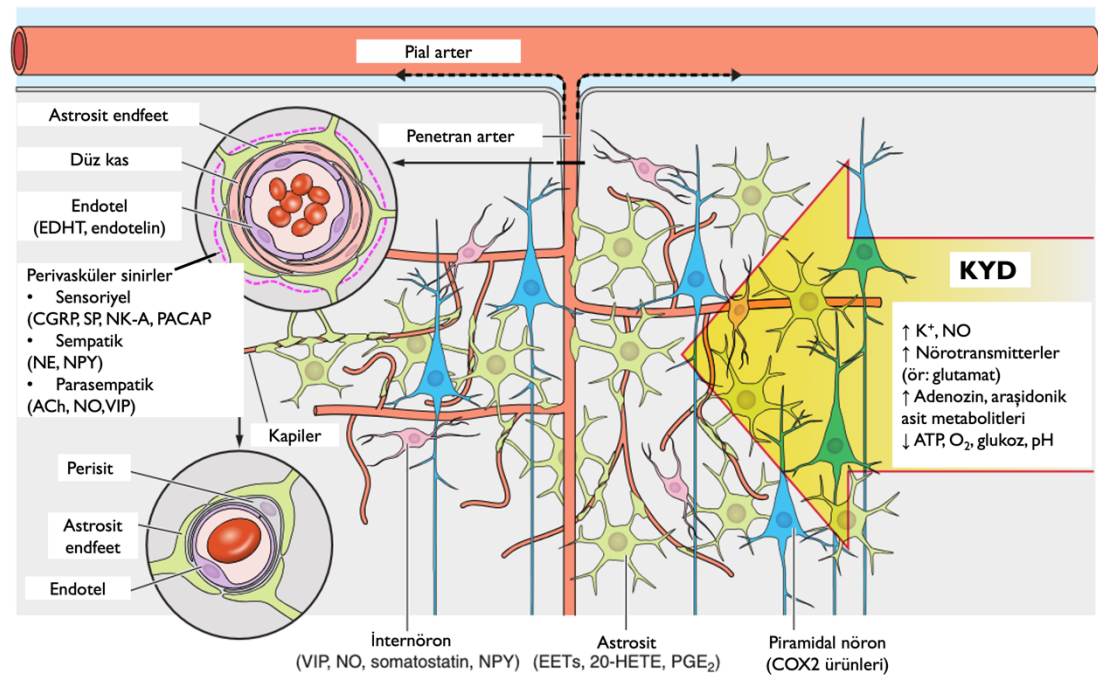
2.1.4. Migrenin Patofizyolojisi

Migren baş ağrısının altında yatan sebebin steril bir inflamasyona bağlı birinci sıra trigeminal nöronların aktivasyonu olduğu düşünülmektedir (57). Anatomik olarak, trigeminal sinir, trigeminoservikal komplekse (TSK) nosiseptif girdi taşır. TSK'den kaynaklanan lifler, ikinci sıra trigeminal yolak nöronlarını içeren talamik ventrobazal çekirdeğe [özellikle ventroposteromedial kısım (VPM)] kadar ulaşır. Son olarak, VPM'den birincil somatosensoriyel alana uzanan üçüncü sıra duyu nöronları, ağrının bilinç boyutunda algılanmasını sağlar (Şekil 2.3) (58). TSK ve talamik çekirdeklerle anatomik bağlantıları olan diğer subkortikal yapılar da migren ağrı matriksinin önemli komponentleridir. Bu subkortikal yapılar arasında sayılabilecek iki önemli yapı amigdala ve hipokampustur. İlaveten, TSK - parabrakiyal korteks arasında doğrudan nöronal projeksiyonlar bulunmaktadır (59). Bu merkezlerin ağrıya verilen duygusal ve bilişsel tepkiler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (60). Tüm bu ağrı yolları aynı zamanda inen yollar (*descending pathway*) ile modüle edilmektedir. İnen yolların önemli istasyonları arasında periakueduktal gri cevher, rostral ventrolateral medulla sayılabilir. Bu istasyonlar endojen opioidler aracılığıyla birinci, ikinci ve üçüncü sıra nöronların tümünde ağrı iletimini modüle etmektedirler (10).



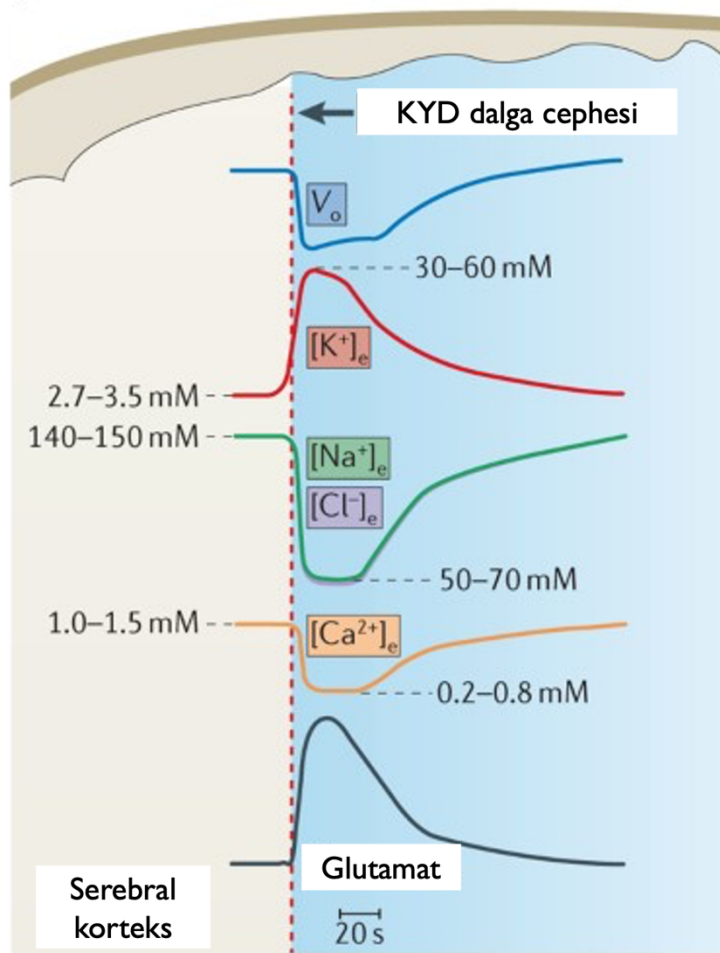
Şekil 2.4. Trigeminal sistem ve migren baş ağrısı matrisi. Periferik dural afferent psödonipolar nöronların gövdeleri trigeminal ganglionda bulunur. Bu nöronlar TSK'deki ikinci sıra nosiseptif nöronları aktive ederler. TSK'dan yükselen ikinci sıra nöronlar talamustaki üçüncü sıra nöronlar ile sinaps yapar. Bu sinapsa paralel olarak TSK'den PAG ve PB gibi ağrı modülasyonundan sorumlu diğer çekirdeklere de girdi taşınır. TSK'den üçüncü sıra talamik nöronlara taşınan nosiseptif girdi, kortekste migren ağrısı ile ilişkili birçok merkeze taşınarak ağrının somatosensoryel, bilişsel ve emosyonel bağlamda algılanması sağlanır. 57 numaralı referanstan dilimize uyarlanmıştır. (İşk, işitsel korteks; Ekt, ektorial korteks; İns, insular korteks; LP, lateral posterior talamik nükleus; M1, primer motor korteks; M2, sekonder motor korteks; PAG, periakueduktal gri cevher; PB, parabrakial nükleus; PtA, paryetal asosiyasyon korteksi; Pul, pulvinar; RS, retrosplenial korteks; S1, primer somatosensoryel korteks; S2, sekonder somatosensoryel korteks; SSN, süperior salivatuvar nükleus; TSK, trigeminoservikal kompleks; TG, trigeminal ganglion; V1, primer vizüel korteks; V2, sekonder vizüel korteks; VPM, ventral posteromedial nükleus).

Şimdiye kadar yapılan araştırmalara rağmen, migren baş ağrısının kesin tetikleyicisini açıklayabilen bir kanıt bulunamamıştır. Bazı kanıtlar, aktive edilmiş perivasküler nöral afferentlerin dural damarlar üzerindeki parasempatik tonusu artırdığını ve hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptid (PACAP-38), nitrik oksit (NO), vazoaaktif intestinal peptid (VIP) ve kalsitonin G-ilişkili peptid (CGRP) gibi nöroinflamatuvar mediatörlerin serbestlendiğini işaret etmektedir. Ancak dural nöronal afferentlerin kendiliğinden nasıl aktive olduğu hala bilinmemektedir. Bu mediatörler meningeal arterlerde hiperpolarizasyona ve vazodilatasyona neden olmaktadır (37). Öte yandan, diğer araştırmacılar serebral bir kökeni öne sürmektedir. Bu görüşlerden birine göre, kortikal yayılan depolarizasyon (KYD) olarak adlandırılan bir depolarizasyon dalgası, tüm kortekse yayılan bir nöronal uyarımı başlatır ve bu da potasyum iyonlarının, hidrojen iyonlarının, araşidonik asit metabolitlerinin ve NO'nun hücre dışı aralığa dökülmesine neden olur (Şekil 2.4) (61).

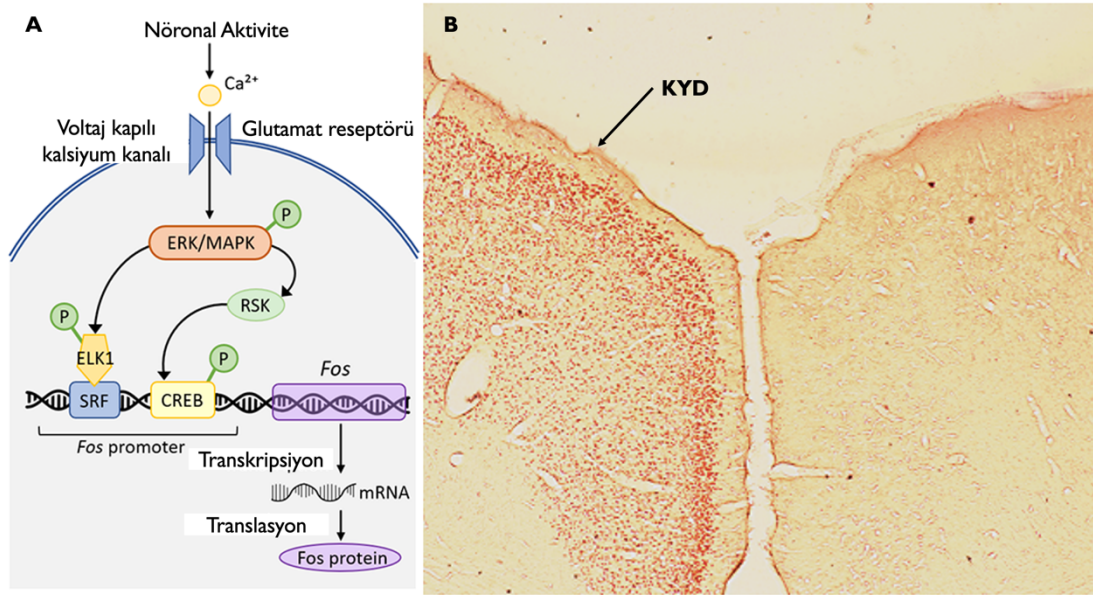


Şekil 2.5. KYD'nin serebral korteks boyunca yayılma mekanizması. Kanonik KYD hipotezine göre; KYD, yayıldığı korteks boyunca internöronlar, glia ve piramidal nöronlar olmak üzere neredeyse tüm uyarılabilir hücrelerde bir depolarizasyona sebep olur. Bu depolarizasyon sırasında yüksek miktarlarda potasyum, nitrik oksit, glutamat, adenozin ve araşidonik asitleri açığa çıkar. Açığa çıkan bu maddeler nosiseptif maddeler olduğundan periferik nöral afferentleri uyarır ve ağrı meydana gelir. Bununla beraber, hücre içinde giren kalsiyum sonucu nöroinflamatuvar kaskadlar aktive olur ve kan beyin bariyeri bütünlüğü KYD sırasında bozulur. 62 numaralı referanstan uyarlanmıştır.

Bu nöromediyatörlerin hücre dışı boşluğa dökülmesi dinlenme membran potansiyelinin çöküşüne, su, sodyum ve kalsiyumun hücre içine girmesine ve sonuç olarak nöronal şişmeye (*neuronal swelling*) yol açar (Şekil 2.5) (63). Hücre içine giren kalsiyum birçok nöroinflamatuvar kaskadın aktivasyonuna sebep olur ve bazı aktivite proteinlerinin sentezini başlatır. Bu aktivite proteinlerinden biri olan c-fos proteini, nöronal aktiviteden sonraki iki saat içerisinde maksimum ekspresyon seviyesine ulaşır ve 12 saat içerisinde tamamen sönümlenir (64). C-fos proteininin aktivasyon yolu ve örnek bir immünohistokimyasal boyama şekil 2.6’da gösterilmiştir. Nöroinflamatuvar kaskadların aktivasyonu ise yine nosiseptif birçok mediatörün ekstraselüler alana dökülmesine sebep olur ve ek olarak kan beyin bariyeri disfonksiyonuna neden olur.

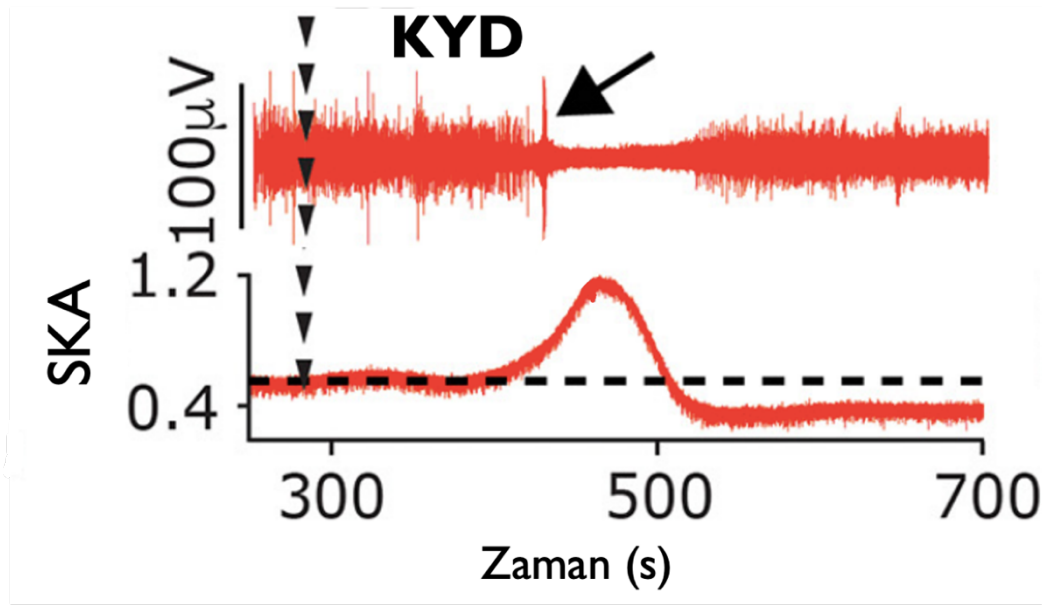


Şekil 2.6. KYD'nin üzerinden ilerlediği nöronlardaki iyonik değişimler. KYD, nöronlarda yaklaşık 1-2 dakikalık uzun bir depolarizasyona sebep olur. Bu depolarizasyon sonucu hücrelerden potasyum ve glutamat çıkarırken, yüksek miktarda sodyum, klor, su ve kalsiyum girişi olur. Tüm bunların sonucunda hücreler şişer ve artan intraselüler kalsiyum birçok nöroinflamatuvar yolu aktive eder. 65 numaralı referanstan uyarlanmıştır.



Şekil 2.7. C-fos aktivasyon yolağı ve örnek immünohistokimyasal görüntü. A) Nöronal depolarizasyon sonucu hücreye giren kalsiyum ERK/MAPK yolağını aktive eder. Bu yolak üzerindeki transkripsiyon faktörleri “Fos promoter” denen bir bölgeye bağlanarak c-Fos denen bir aktivite proteininin üretimini artırır. B) KYD indüklenmiş bir kortekste hücre içine çok yüksek miktarda kalsiyum girdiğinden c-fos protein ekspresyonunda belirgin bir artış görülür. KYD indüklenmiş korteks tarafıyla (sol) indüklenmemiş taraf arasındaki (sağ) fark göze çarpmaktadır. 66 ve 67 numaralı referanslardan uyarlanmıştır.

KYD'nin mast hücre degranülasyonuna ve plazma protein ekstrasözasyonuna neden olabildiği de kanıtlanmıştır (68). Nihayetinde, sıçan ve insanlarda KYD dalgasından sonra kısa süreli hiperemi ve ardışık uzun süreli oligemi ortaya çıkar (Şekil 2.7) (69).



Şekil 2.8. KYD'nin indüklediği kan akımı değişikliğinin zamana bağlı gösterimi. KYD, işgal ettiği bölgede öncelikle hızlı ve kısa süren bir hiperemiye, ardından uzun süren bir oligemiye sebep olur. 69 numaralı referanstan uyarlanmıştır (SKA: serebral kan akımı, KYD: kortikal yayılan depolarizasyon).

Hayvan modellerindeki deneysel veriler KYD'nin trigeminal nosiseptif yolları aktive ettiğini göstermektedir (70-72). KYD, pial ve dural makrofajların ve dendritik hücrelerin aktivasyonu ve yukarıda belirtildiği gibi çeşitli nosiseptif araçların (araşidonik asit metabolitleri, potasyum, glutamat gibi) salıverilmesi ile ilişkilidir (73). Bu olaylar daha sonra trigeminal ganglionda hücre gövdeleri bulunan periferik trigeminovasküler nöronları ve ardından spinal trigeminal çekirdek ve ikinci derece trigeminal nöronları aktive edebilir (70, 71).

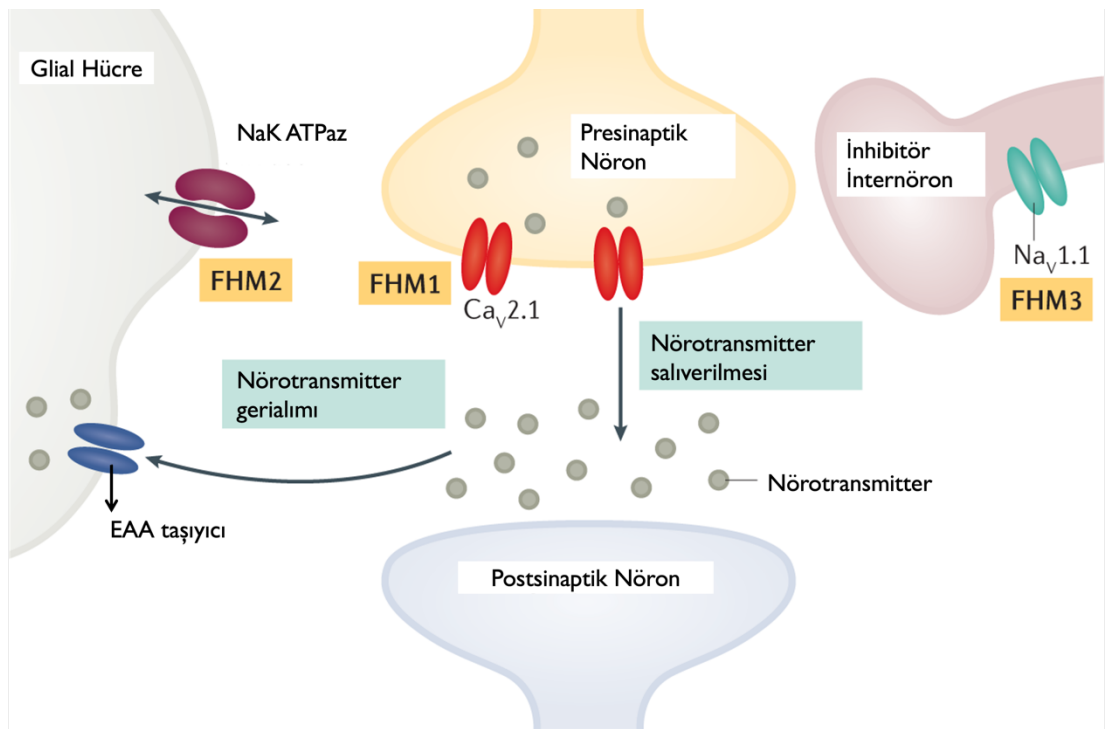
Hayvan deneylerinde ve klinikte serebral iskemi sonrası insan beyninden alınan elektroensefalografi kayıtlarında KYD ortaya çıkabildiği gösterilmiş olmasına rağmen, insanlarda aura sırasında hala kesin olarak KYD'nin varlığı gözlemlenememiştir (63). Bir fMRI çalışmasında, araştırmacılar hastalarda egzersize bağlı aurayı ve spontan aurayı incelemiştir; bulgular, her ne kadar KYD benzeri bir hiperemi-oligemi paternine işaret etse de kesin olarak KYD'yi kanıtlamamıştır (74). Hipoksi veya egzersiz ile indüklenen migren aurası üzerine yapılan bir başka çalışmada, skotom bildiren hastalarda kan oksijen seviyesine bağlı BOLD yanıtının azaldığı ve sadece pozitif semptomlar yaşayan hastalarda BOLD yanıtının arttığı bulunmuştur (75). Bunların dışında, KYD'nin maymun beyni gibi girensel bir

beyinde 7 mm'den fazla yayıldığı hiçbir zaman başarılı bir şekilde gösterilmemiştir (76). KYD'nin yayılma hızı (3mm/dk) göz önüne alındığında, somatosensoryel aura sırasında, migren hastalarının somatosensoryel korteksine KYD'nin ulaşması teorik olarak saatler alacaktır. KYD sadece ipsilateral TSK'yi aktive edebilir, bu da tek taraflı baş ağrısının auranın karşı tarafında olması gerektiği anlamına gelir. Bununla birlikte, somatosensoryel auralı migren hastalarının sadece %40'ı kontralateral baş ağrısı bildirmiştir (77). Görsel auralı hastalarda bu kontralateral ağrı oranı %8'e düşmektedir (78). Bilateral auralar ve ipsilateral migren baş ağrıları da KYD fenomeni ile açıklanamamaktadır. Terapötik müdahalelerin mekanizması da geleneksel KYD-migren anlayışında bir uyumsuzluğa işaret etmektedir. CGRP antagonistleri ve CGRP'ye karşı oluşturulan monoklonal antikolar, KYD'yi baskılamadan migren baş ağrısını hafifletebilmektedir (12). Ayrıca, hayvan çalışmalarında KYD'yi baskıladığı gösterilen bir grup ilacın (tonabersat, gabapentin, sitalopram, fluoksetin) migren analjezisinde hiçbir rolü olmadığı kanıtlanmıştır (79-81). Bu ilaçların KYD baskılayıcı ve analjezik etkileri arasındaki bu tutarsızlık, KYD ve migren ağrısı arasında birebir neden-sonuç ilişkisinin olmadığını göstermektedir.

2.1.5. Migren ve Nöronal Hipereksitabilite

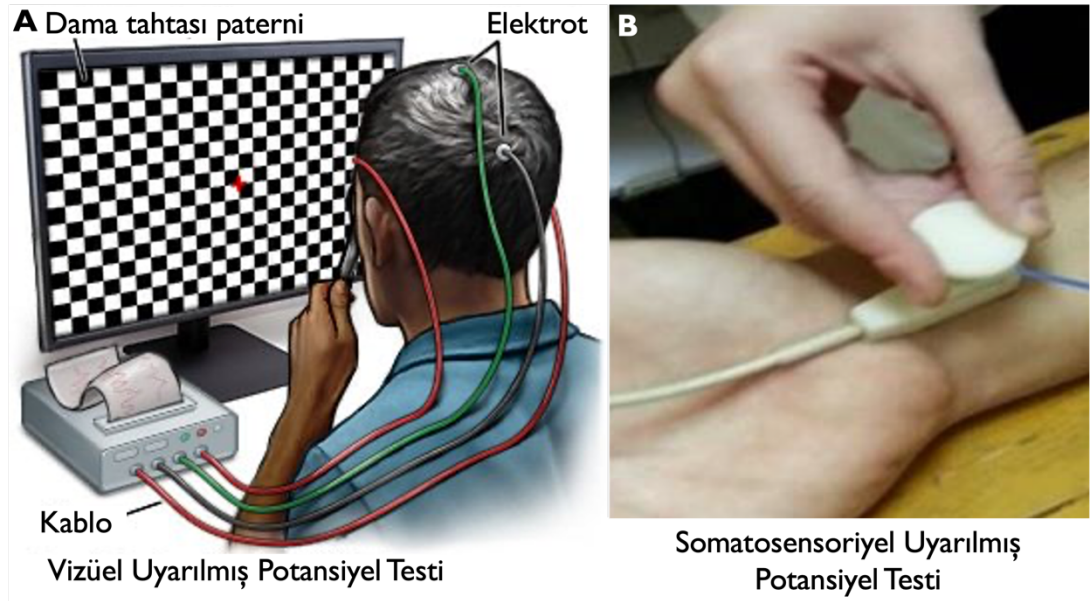
Literatürdeki bazı çalışmalarda, migren hastalarında nöronal hipereksitabilite temel bir fizyolojik bozukluk olarak öne çıkmaktadır (13). Nöronal uyarılabilirlikteki artışın nedenleri birçok faktöre bağlı olabilir. Genetik çalışmalar, nöronal uyarılabilirliğin sebebi olarak kalsiyum kanallarının anormalliğini öne sürmüştür (14). Voltaj kapılı P/Q tipi kalsiyum kanal genlerindeki varyasyon sonucu, eksitator amino asitlerin (glutamat gibi) presinaptik salıverilmesinin etkilendiği bulunmuştur. Diğer genetik çalışmalar, sodyum-potasyum ATPazı kodlayan ATP1A2 geninde işlev bozukluğu olduğunu göstermiştir (15, 16). Son zamanlarda hem CACNA1A hem de ATP1A2'de mutasyon bulunmayan epizodik ataksi ve hemiplejik migren hastalarından elde edilen veriler, eksitator aminoasit taşıyıcı 1 (EAAT1)'deki heterozigot bir mutasyonun glutamat geriliminde azalmaya yol açabileceğini ve bunun nöbetler, hemipleji ve epizodik ataksiye neden olacak şekilde nöronal hipereksitabiliteye sebep olabileceğini göstermiştir (17). Bu sistemlerde mutasyonu olmayan hem auralı hem aurasız migren hastalarında yapılan bir çalışmada kortikal

glutamat seviyelerinin kontrollere göre yüksek olduğu gösterilmiştir (18). Hipereksitabiliteye sebep olduğu düşünülen mekanizmalar Şekil 2.8’de belirtilmiştir.



Şekil 2.9. Migrendeki hipereksitabilite ile ilişkili mekanizmalar. Şekilde 3 temel mekanizma göze çarpmaktadır: 1) artmış eksitator nörotransmitter (glutamat gibi) saliverilmesi, 2) sodyum-potasyum ATPaz pompasının disfonksiyonu sonucu nöronun dinlenim membran potansiyelinin ateşleme eşğine daha yakın olması, 3) inhibitör internöronların üzerindeki sodyum kanallarının disfonksiyonu sonucu inhibisyonda bozulma ve eksitasyon/inhibisyon dengesinin eksitasyon lehine değişmesi. Bu figür 57 numaralı referanstan dilimize uyarlanmıştır (EAA: eksitator aminoasit, NaK ATPaz: Sodyum potasyum adenozin trifosfataz).

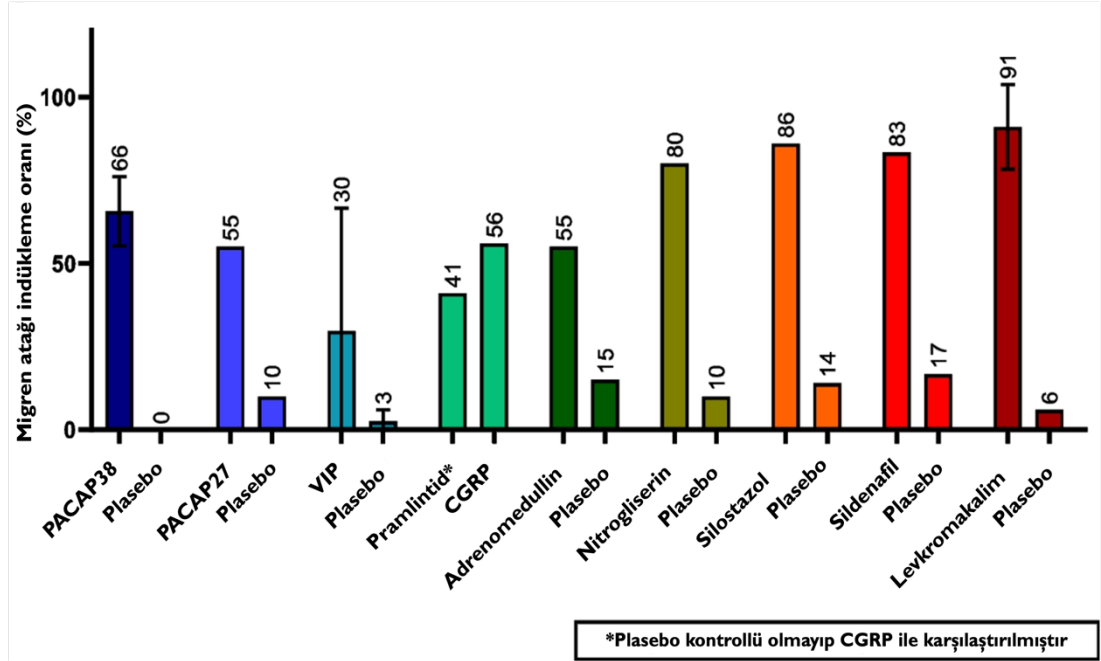
Aynı zamanda migren hastalarında duyuşal kapılanmanın bozuk olduğu da bulunmuştur (19). Kortikal hipereksitabilite ve bozulmuş duyuşal kapılanma vizüel uyarılmış potansiyeller ve somatosensoriyel uyarılmış potansiyeller (SSEP) ile değerdendirilebilir (Şekil 2.9) (20-22). SSEP’lerin amplitüd ve latansları ölçülerek nöron popülasyonu hakkında fikir edinilebilir (82, 83). Bu SSEP parametrelerinin NTG ve LVC ile oluşturulan akut migren modellerinde nasıl değıştiğı bilinmemektedir.



Şekil 2.10. Vizüel uyarılmış potansiyel ve somatosensoryel uyarılmış potansiyel ölçümleri. A) Vizüel uyarılmış potansiyeller genellikle dama tahtası görünümüne sahip bir paternin hastaya gösterilmesi ve eşzamanlı olarak korteksten kayıt alınmasıyla elde edilir. B) Benzer şekilde, somatosensoryel uyarılmış potansiyeller klinikte en yaygın olarak median sinirin stimüle edilmesiyle eşzamanlı somatosensoryel korteksten kayıt alınarak elde edilir.

2.1.6. Migren İndükleyici Maddeler

Migren patofizyolojisinde rol oynayan maddelerin migren hastalarına uygulanması sonucu bu kişilerde migren atağının başlatılabildiği klinik çalışmalarda gösterilmiştir. Güçlü vazodilatör özelliğe sahip olan bu moleküller arasında CGRP, PACAP-38, nitrogliserin ve silostazol bulunmaktadır (84-87). Migren hastaları bu maddelere maruz kaldıklarında migren atakları tetiklenirken, sağlıklı kişilerde hafif şiddetli baş ağrısı görülür. NO donörü nitrogliserinin intravenöz infüzyonu migren hastalarının %80'inde, CGRP infüzyonu %57'sinde ve PACAP-38 infüzyonu %58'inde migren ataklarına neden olmuştur (85, 88, 89). Şimdiye kadar yapılan bazı provokasyon çalışmalarını kapsayan bir grafik Şekil 2.10'da sunulmuştur.

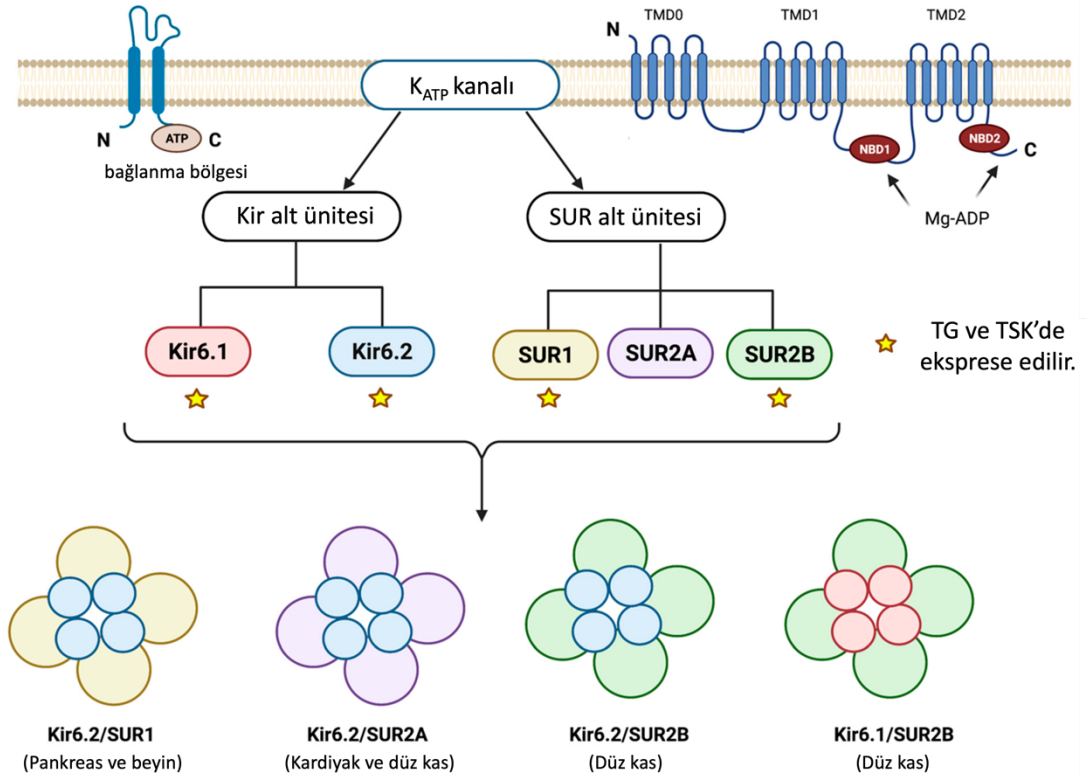


Şekil 2.11. Migren provokasyon çalışmalarından elde edilmiş farklı migren indükleyici maddelerin migren atağı indüklenme oranları. 90 numaralı referanstan dilimize uyarlanmıştır.

Nitrogliserin ile yapılan provokasyon çalışmalarında migren hastası olmayan sağlıklı kişiler ve migren hastalarında “nitrogliserin baş ağrısı” olarak tariflenen, ilacın enjeksiyonunu takiben 3-5 dakika içinde ortaya çıkan bir baş ağrısı görülmektedir. Buna karşın, ortalama 2-4 saat içerisinde migren hastalarında migren atağı başlamaktadır (84, 87). Provokasyon çalışmalarında kullanılan migren indükleyici maddelerin çoğunluğu nadiren migren aurasını indükleyebilmiştir. Nitrogliserin, sildenafil ve hipoksinin nadiren aurayı indükleyebildiğini söyleyen çalışmalar bulunmaktadır (91, 92). Ancak, Al-Karagholi ve ekibinin (28) klinik çalışmasında, bir ATP kapılı potasyum kanal açıcısı olan levkromakalim (LVC), auralı migren hastalarının büyük bir kısmında (%82) migren aurasını tetikleyebilmiştir. Aurasız migren ataklarının başlamasına kadar geçen medyan süre 2,8 saat (1-4 saat) iken, auralı migren ataklarının başlamasına kadar geçen medyan süre 44 dakika (20-120 dakika) olarak saptanmıştır. Bu bağlamda LVC, aura tetikleyici özellikleri açısından diğer migren indükleyici maddelerin arasında belirgin olarak öne çıkmaktadır.

2.1.7. Migren ve ATP kapılı Potasyum Kanalları

ATP kapılı potasyum kanalları (K_{ATP} kanalı), 1980'li yıllarda kalp kasında gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda pankreas hücreleri, düz kas ve nöronlar üzerinde de yerleştikleri kanıtlanmıştır. K_{ATP} kanalları içeri doğrultucu (*inward rectifying*) transmembran iyon kanalları olup $K_{ir6.x}$ alt ailesine dahildir. $K_{ir6.x}$ alt ailesinde iki çeşit alt ünite bulunmaktadır: $K_{ir6.1}$ ve $K_{ir6.2}$. K_{ir} alt üniteleri, hücre dışı gözenek oluşturuvcu bir bölge (H5) ile iki transmembran yayılma bölgesine sahiptir (30, 93). Bununla birlikte, işlevsel bir kanal elde etmek için dört K_{ir} alt ünitesi gereklidir ve kanalın aktivitesi dört K_{ir} alt ünitesine bağlı dört sülfonilüre reseptörü (SUR) tarafından düzenlenir (Şekil 2.11) (30, 31). Kanalın içeri doğrultucu işlevi, magnezyumun veya poliaminlerin kanal gözenegini tıkaması sonucu potasyumun geçişini engellemesinden kaynaklanır. Kanal aktivasyonu sırasında magnezyum ve/veya poliaminler uzaklaşır ve potasyum hücre dışına çıkar (94). Yüksek ATP konsantrasyonları kanalı inhibe ederken, düşük ATP seviyeleri kanalı aktive ederek açar (32).

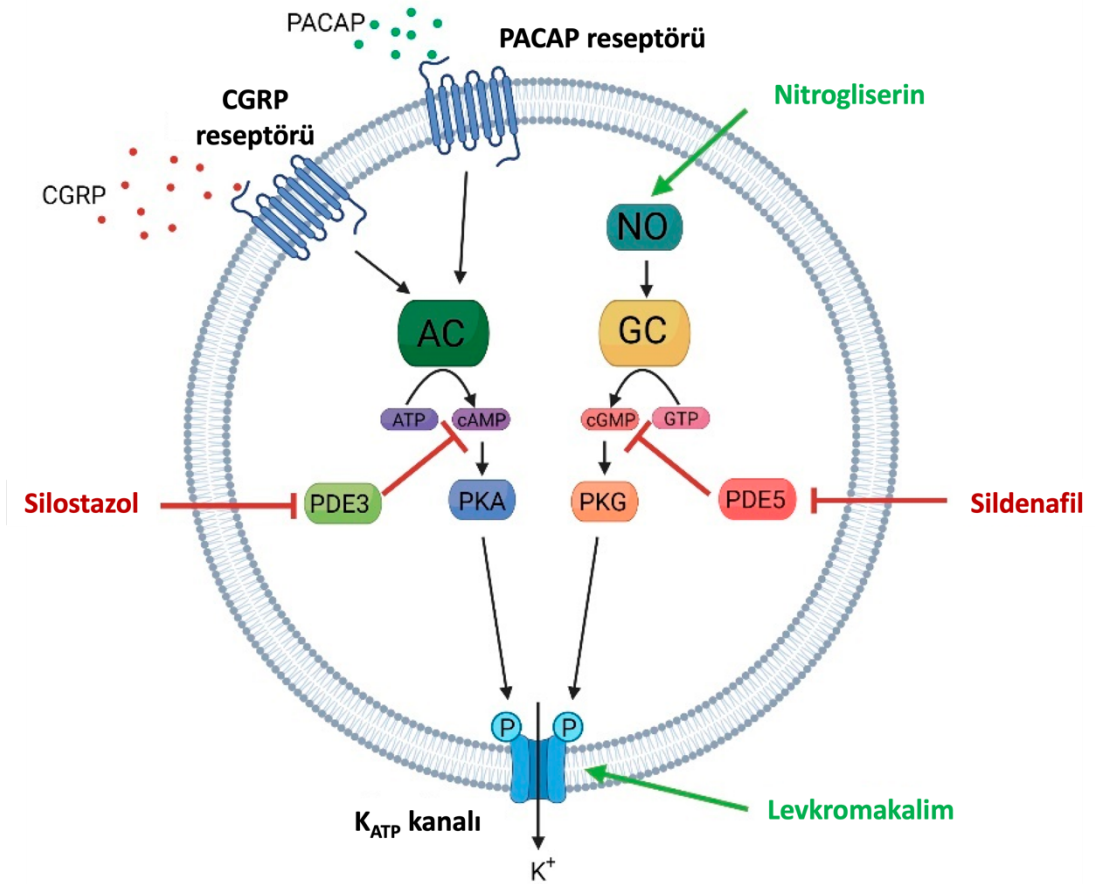


Şekil 2.12. K_{ATP} kanalı morfolojisi ve ekspresyon profili. Tetramerik K_{ATP} kanal kompleksi, dört Kir6 ve dört SUR alt ünitesinden oluşur. Kir6 alt ünitesi, ATP bağlanma bölgesine sahip iki transmembran domainine (TMD) sahipken, SUR alt ünitesi her birinde 5-6 transmembran domaini bulunan üç bileşenden (TMD0, TMD1 ve TMD2) oluşur. SUR alt ünitesi, Mg-ADP için nükleotid bağlanma domainini (NBD) içerir. Her alt üniteye farklı alt tipler, K_{ATP} kanallarının çeşitli kombinasyonlarına yol açar. Kir6.1, Kir6.2, SUR1 ve SUR2B, trigeminal ganglionda (TG) ve trigeminoservikal komplekste (TSK) eksprese edilir. 95 numaralı referanstan dilimize uyarlanmıştır (Kir6: içeri doğrultucu potasyum kanalı; SUR: sülfonilüre reseptörü; TG: trigeminal ganglion; TSK: trigeminoservikal kompleks).

K_{ATP} kanalları birçok organda eksprese edilir ancak farklı Kir6.x ve SUR alt ünitesinin farklı kombinasyonu vasküler sistem, nöronal sistem ve pankreas gibi dokularda değişiklik gösterir. Pankreas β hücreleri, glikozla uyarılan insülin salgısını kontrol eden Kir6.2/SUR1'i eksprese ederken, Kir6.2/SUR2A kanalları miyokarda bulunan baskın formdur (30, 33, 34). Vasküler düz kas hücrelerinde ise Kir6.1/SUR2B eksprese edilir. Kir6.1 kanalları spontan kanal aktivitesi göstermezken, pankreatik ve miyokardiyal Kir6.2 kanalları ATP seviyeleri düşük olduğunda veya olmadığında spontan olarak açılır (34, 96).

Kir6.1/SUR2B, beyin arterlerinde ve dura materde baskın formdur ve vazokonstriksiyon/vazodilatasyonda rol oynar (35). Vasküler düz kas hücrelerinde, K_{ATP} kanalının açılmasıyla potasyum çıkışı nedeniyle meydana gelen

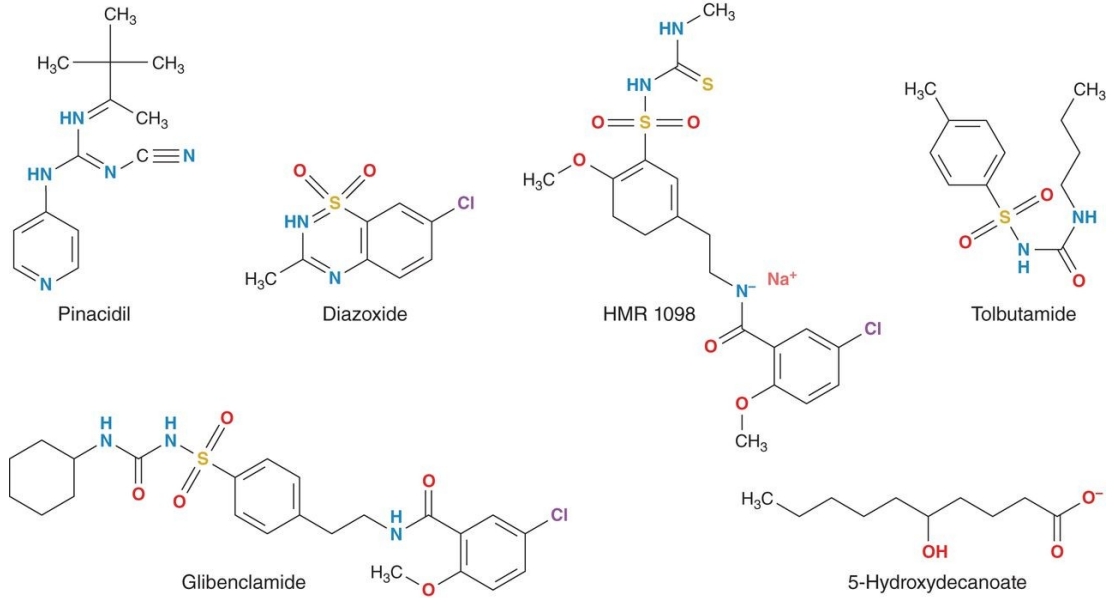
hiperpolarizasyon, voltaj kapılı kalsiyum kanallarının (VKKK) inhibisyonuna yol açar, bu da kalsiyum girişini azaltır ve sonuç olarak düz kas gevşemesi ve vazodilatasyona neden olur (34, 97, 98). Birçok vazodilatör madde, K_{ATP} kanallarıyla alakalı reseptörleri veya ikinci haberci molekülleri hedef alır. Nitrik oksit (NO), guanilat siklaz (GS) ile etkileşir, bu da GTP'yi siklik GMP'ye dönüştürür ve cGMP daha sonra K_{ATP} kanallarını fosforilleyip açılma probabilesini artırır (36). Ayrıca, endotelde bulunan K_{ATP} kanalları da vazodilatasyona katkıda bulunur (99). Güçlü vazodilatörler olan CGRP ve hipofiz adenilat siklazı aktive eden peptid (PACAP), vasküler düz kas üzerindeki G-protein bağlı reseptörlerine bağlanarak adenilat siklaz (AS) enziminin aktivasyonuna neden olur, böylece ATP cAMP'ye dönüştürülür (100). Siklik AMP miktarındaki artış aynı cGMP'de olduğu gibi K_{ATP} kanallarının fosforilasyonuna ve bunun sonucunda kanalın açılma probabilesinde artışa sebep olabilir. Ayrıca, fosfodiesteraz (PDE) tip 3 ve 5 inhibitörleri (silostazol ve sildenafil) farklı endikasyonlar için vazodilatör etkileri nedeniyle klinikte kullanılmaktadır. PDE'ler cAMP ve cGMP'yi parçalar; dolayısıyla, PDE'lerin inhibisyonu cAMP ve/veya cGMP birikimine ve K_{ATP} kanalının fosforilasyonuna yol açar (37). Bu maddelerin tümü birincil yan etki olarak baş ağrısına neden olur. Dolayısıyla, yukarıda belirtilen mekanizmaların migren patofizyolojisinde önemli olduğu düşünülmektedir. K_{ATP} kanallarının tüm bu mekanizmalarca nasıl etkilendiği Şekil 2.12'de gösterilmiştir.



Şekil 2.13. ATP kapılı potasyum kanallarının CGRP, PACAP ve NO sinyal yollarıyla ilişkisi. 101 numaralı referanstan dilimize uyarlanmıştır (CGRP: kalsitonin gen ilişkili peptid; PACAP: Pitüiter adenilat siklaz aktive edici peptid; NO: nitrik oksit; AC: adenilat siklaz; GC: guanilat siklaz; ATP: adenozin trifosfat; GTP: guanozin trifosfat; cAMP: siklik adenozin monofosfat; cGMP: siklik guanozin monofosfat, PKA; protein kinaz A; PKG: protein kinaz G; PDE5: fosfodiesteraz 5; PDE3: fosfodiesteraz 3).

K_{ATP} kanalları aynı zamanda iç mitokondriyal membranda da eksprese edilir (mitoK_{ATP}) (102). Ancak bu kanalların morfolojisi plazma membranı üzerindeki K_{ATP} kanalları kadar iyi bilinmemektedir. Bazı çalışmalar aynı plazmalemmal K_{ATP} kanalları gibi fonksiyonel Kir ve SUR alt ünitelerinden oluştuğunu söylerken, diğer çalışmalar farklı mitokondriyal elektron transport zinciri proteinlerinin birleşerek ATP bağımlı biçimde potasyum iyonlarına geçirgen bir kanal aktivitesi oluşturabileceğini söylemektedir (103, 104). Ek olarak, sitoplazma-mitokondriyal matriks açısından potasyum konsantrasyonları birbirleri ile aynıdır ve belirgin bir potasyum gradienti yoktur. Sitoplazma ve mitokondriyal matriks yaklaşık aynı potasyum konsantrasyonlarına sahipken, ekstraselüler sıvı ve sitoplazma arasında potasyum konsantrasyonları 20-30 kat farklılık göstermektedir. Bu bağlamda, plazmalemmal

K_{ATP} 'lerin açılması ve mitokondriyal K_{ATP} 'lerin açılması arasında iyon akımı açısından farklılar olup hücresel kaskadları farklı etkileyebilir (105). Farmakolojik açıdan bakıldığında, K_{ATP} kanallarıyla etkileşen maddelerin birçoğu hem plazmalemmal hem de mitokondriyal potasyum kanalları ile etkileşime girer. Belirgin istisnalar arasında sadece plazmalemmal K_{ATP} kanalını bloke ettiği düşünülen inhibitör HMR1098 sayılabilir (106). Bazı dokularda, belirli maddeler mitokondriyal potasyum kanallarını plazmalemmal izoformlara göre daha büyük bir spesifisite ile hedeflediği görülmektedir. Örneğin, K_{ATP} kanalının modülatörleri olan diazoksit (kanal açıcı) ve 5-hidroksidekanoik asit (5-HD, kanal blokörü) mitokondriyal K_{ATP} kanalına karşı çok daha seçicidir. Bu nedenle bazen "mitokondriyal potasyum kanal modülatörleri" olarak kabul edilirler (107). Mitokondriyal ATP kapılı potasyum kanallarının migren patofizyolojisindeki rolü ve tedavi hedefi olarak anlamı araştırılmamıştır. Bazı ATP kapılı potasyum kanal açıcıları ve blokörleri Şekil 2.13'te gösterilmiştir.



Şekil 2.14. K_{ATP} kanalı açıcı ve blokörlerinin kimyasal yapıları. K_{ATP} kanalının açılmasını sağlayan [pinasidil (*pinacidil*) (4660), diazoksit (*pinacidil*) (2911) ve HMR 1098 (21436283)] veya K_{ATP} kanal aktivitesini inhibe eden [glibenklamid (*glibenclamide*) (3368), tolbutamid (*tolbutamide*) (5304) ve 5-hidroksidekanoat (*5-hydroxydecanoate*) (1758)] bileşiklerin kimyasal yapıları gösterilmiştir. Yapılar ChemSpider veritabanından (<http://www.chemspider.com/>) elde edilmiştir ve parantez içindeki numaralar bileşiklerin ChemSpider ID'lerini ifade etmektedir.

2.1.8. Preklinik Migren Modelleri

Preklinik akut migren modelleri, migren için yeni tedaviler geliştirmek ve patofizyolojik mekanizmaları açıklamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu modeller, geçerli olarak kabul edilebilmeleri için insandaki migren baş ağrısındaki benzer bir etiyoloji ve fenotip sergilemeleri gerekmektedir. Ancak, henüz migrenin tüm fenotipik ve etiyolojik özelliklerini modelleyebilen bir hayvan modeli bulunmamaktadır (108). Rodentlerdeki migren modelleri Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Preklinik Migren Modelleri

Hayvan Modeli	Uygulama Yolu	İzlenen Fenotip	Tedavi Yanıtı	Kaynakça
İnflamatuvar çorba	Dural kanülasyon	<ul style="list-style-type: none"> →Mekanik hiperaljezi →Azalmış lokomasyon →Tek taraflı arka pati ve yüz grooming davranışı →Anksiyete ve depresyon benzeri davranışlar →Trigeminal ganglion ve TSK'de CGRP ilişkili gen ekspresyonlarında artış 	<ul style="list-style-type: none"> →Zolmitriptan ağrı fenotipinin oluşmasını engellemiştir. →Ketorolak nosiseptif davranış fenotipini engellemiş, tek taraflı arka pati ve yüz grooming davranışını bloke etmiştir. →Amitriptilin allodiniyi tersine çevirmiş ve anksiyete ve depresyon benzeri davranışları azaltmıştır. 	(109-112)
Nitrogliserin	İntravenöz intraperitoneal	<ul style="list-style-type: none"> →Mekanik hiperaljezi →Termal ve mekanik allodini →Fotofobi →Meningeal kan akımında artış →Azalmış lokomotor aktivite →Somurtma (<i>grimacing</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> →Propranolol, topiramet, amilorid mekanik hiperaljeziyi inhibe etmiştir. →Valproik asit etkisiz bulunmuştur. →Sumatriptan somurtma davranışını azaltmıştır. 	(113, 114)
Genetik modeller	-	→Spontan trigeminal allodini	→Valproik asit spontan trigeminal allodiniyi önlemiştir.	(115)
Transgenik modeller (FHM1, FHM2)	-	<ul style="list-style-type: none"> →Fotofobi →Tek taraflı yüz grooming davranışı →Tek taraflı göz kırpıştırma 	→Rizatriptan grooming davranışını azaltmıştır.	(116, 117)
Kortikal yayılan depolarizasyon modeli	Serebral korteks üzerine potasyum klorür uygulaması →Elektriksel stimülasyon →Pinprick uygulaması	<ul style="list-style-type: none"> →Dural afferent aktivasyonu, →Meningeal kan akımında artış ve ardından uzun süreli oligemi →Artmış grooming davranışı →Donma davranışı →Mekanik allodini 	<ul style="list-style-type: none"> →Valproik asit, propranolol, amitriptilin ve metiserjid KYD yatkınlığını bastırmıştır. →Lamotrijin de potasyum klorür ile indüklenen KYD'yi baskılamıştır. 	(118, 119)

Yapılan çalışmalarda kullanılan hayvan modelleri TSK'deki nöronal aktivasyonu temel almaktadır. Yukarıda özetlendiği gibi; meningeal damar ağı, büyük serebral arterler ve paranasal sinüsler gibi ağrıya duyarlı intrakraniyal yapıları innerve eden trigeminal sinirin oftalmik dalında nosiseptörler bulunur. Migren baş ağrıları, bu yapıları innerve eden periferik aferentlerin nosiseptif mediatörlerce uyarılmasıyla ortaya çıkar (120, 121). Bu nosiseptif mediatörlerden olan prostaglandin (PGE2), histamin, serotonin ve bradikinin içeren ve "inflamatuar çorba (*inflammatory soup*)" olarak adlandırılan bir karışım meningeal ve trigeminovasküler nosiseptörleri uyarmak için kullanılmıştır (122). İnflamatuar çorba, hayvanların sisterna magnası içine yerleştirilen bir mikrokater kullanılarak enjeksiyon yoluyla uygulanabilir. Bu enjeksiyon sonucunda, meningeal afferentler aktive olur. Ek olarak, dura mater üzerine topikal uygulamanın da geri dönüşümlü sefalik allodiniye neden olduğu gösterilmiştir (109, 110, 123). Bu yöntemin bir dezavantajı olarak, inflamatuar çorbanın kan beyin bariyerinin işlevselliğini bozabilmesidir. Bu da ağrı fenotipinin meningeal afferentlerin aktivasyonu yoluyla sinaptik kaynaklı değil, doğrudan merkezi sinir sisteminin aktivasyonundan kaynaklanmasına sebep olabilir (108).

Yaygın olarak kullanılan bir diğer model ise bir nitrik oksit donörü olan nitrogliserin ile indüklenen migren modelidir. Bu modelde intravenöz veya intraperitoneal olarak uygulanan nitrogliserinin yaklaşık 2 saat kadar süren bir allodiniye sebep olduğu gösterilmiştir (114, 124). NTG'nin, sıçan ve farelerde TSK aktivasyonu sonucu periorbital bölgede mekanik eşikleri düşürerek baş ağrısı benzeri fenotipi indüklediği gösterilmiştir (114, 125). Farelerde nitrogliserin enjeksiyonu termal ve mekanik allodiniye neden olmuş ve bu allodini sumatriptan ile tersine çevrilmiştir (114). TSK aktivasyonu elektrofizyolojik kayıtlarla nöronların ateşlenmesinde artış olarak da tespit edilebilmektedir (126, 127). Bu artan ateşleme fenotipik olarak mekanik allodini şeklinde kendini göstermektedir (114, 128, 129). Ayrıca, intraperitoneal NTG enjeksiyonu sıçanlarda anksiyete benzeri davranışlara ve ışıktan kaçınma davranışına sebep olmuştur. Böylece bu modelde, migren hastalarında görülen eş zamanlı anksiyete/depresif davranışları ve fotofobiyi taklit edilebilmektedir (129). Bu çalışmaya kadar hayvanlarda, levkromakalimin migren indükleyici etkileri tekrarlayan levkromakalim enjeksiyonu ile kronik migren modeli üzerinde gerçekleştirilmiştir. Henüz tek bir levkromakalim enjeksiyonunun hayvanlarda

mekanik allodini, anksiyete benzeri davranış ve fotofobi dahil olmak üzere akut migren benzeri bir fenotipe yol açıp açmadığı henüz bilinmemektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Tüm hayvan deneyleri ARRIVE yönergelerine uygun olarak yapılmış ve Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylandı (onay no: 2022/05-11). Çalışmamızda erkek Wistar sıçanlar (250-350 g) kullanıldı. Wistar sıçanlar Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarından (Ankara, Türkiye), Hayvanlar, 21 ± 1 °C ve %45-60 nem ayarlarında barındırıldı. Sıçanlar üçerli gruplar halinde, 12/12 saatlik aydınlık/karanlık ışık ayarında (aydınlık periyot 07.00-19.00) sıcaklık ve nem kontrollü bir barınakta ad libitum yem ve su ile barındırıldı. Sıçanlar herhangi bir deneysel prosedüre tabi tutulmadan önce en az 1 hafta süreyle aklimatize edildi.

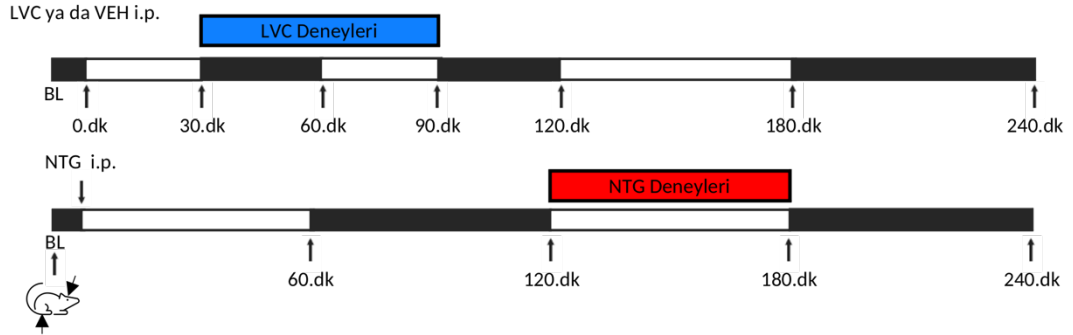
3.2. Deney Protokolü ve Grupları

Çalışmamızda, levkromakalim (LVC) saf etanolde (0,5 mL etanolde 1 mg LVC) çözülmüş ve ardından izotonik salinde seyreltilerek 1 ml'lik salin içerisinde %5 etanolde (v/v) 0,1 mg LVC içeren nihai çözelti elde edildi. Nitrogliserin (NTG) etanol bazlı bir çözelti olarak satın alındı ve benzer şekilde izotonik salin içinde seyreltilerek 1 mL salin içerisinde %10 etanolde (v/v) 1 mg NTG içeren nihai bir çözelti elde edildi. Her iki madde de tüm deneylerde intraperitoneal yolla uygulandı. NTG ile indüklenen akut migren modeli için, önceki çalışmalarda kapsamlı bir şekilde doğrulanmış olan 10 mg/kg'lık doz seçildi (114, 130-132). Çalışmamızda LVC ile indüklenen akut migren modelini oluşturmak için, daha önce LVC ile indüklenen kronik migren modelinde kullanılan 1 mg/kg'lık doz uygulandı (133). Kontrol (CTRL) grupları için salin içerisinde etanol solüsyonu vehikül olarak kullanıldı. Akut migren modelleri nitrogliserin (NTG - salin içinde %10 etanol içinde 10 mg/kg) veya levkromakalim (LVC – salin içinde %5 etanol içinde 1 mg/kg) tek seferde uygulanarak oluşturuldu. Ön deneyler, salin çözeltilerindeki iki etanol konsantrasyonunun (%5 ve %10) von Frey testi ve ışıktan kaçınma deneyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermediğini gösterdi. Böylece, bu sonuçlar tek bir kontrol grubu altında birleştirildi.

3-4 aylık Wistar sıçanlar rastgele 3 farklı gruba ayrıldı: kontrol grubu (*control* - CTRL), nitrogliserin (*nitroglycerin* - NTG) ve levkromakalim (*levkromakalim* - LVC).

Migren atağının prelinik bir korelasyonu olarak, periorbital ve arka pati mekanik allodinisi ölçüldü. Daha sonra, ayrıca Wistar sıçanlara vehikül, NTG veya

LVC enjekte edildi ve düşük mekanik eşğin tespit edildiği zaman dilimi içinde bu Wistar sıçanlar anksiyete benzeri davranış ve ışıktan kaçınma açısından değerlendirildi. Vehikül enjekte edilen sıçanlar, kendilerine karşılık gelen müdahale gruplarıyla denk zaman dilimlerinde test edildi (Salin içerisinde %10 etanol enjekte edilen sıçanlarda enjeksiyonun iki ilâ üçüncü saatleri arasında ve salin içerisinde %5 etanol enjekte edilen sıçanlarda enjeksiyondan sonraki 30. dakika ile 90. dakika arasında test edildi). İn vivo elektrofizyoloji deneyleri için Wistar sıçanlara vehikül, NTG veya LVC enjeksiyonları yapıldı ve KYD parametreleri ilgili zaman dilimlerinde değerlendirildi (Şekil 3.1). Western blot deneyleri, vehikül enjeksiyonundan, KYD indüklenmesinden ve LVC uygulanmasından 3 saat sonra gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Deney protokolü ve zaman çizelgesi. CTRL (salin içinde %5 veya %10 etanol) ve LVC (1 mg/kg) gruplarının mekanik eşikleri başlangıç (BL), 30, 60, 90, 120, 180 ve 240. dakika zaman noktalarında test edildi. NTG (10 mg/kg) grubu başlangıç, 60., 120., 180. ve 240. dakikalarda test edildi. Eşik değerlerin en düşük olduğu zaman dilimleri "baş ağrısı fazı" olarak kabul edildi ve diğer tüm deneysel prosedürler bu zaman dilimine denk getirildi (LVC için 30-90 dk ve NTG için 120-180 dk ; VEH: vehikül, LVC: levkromakalim, NTG: nitrogliserin).

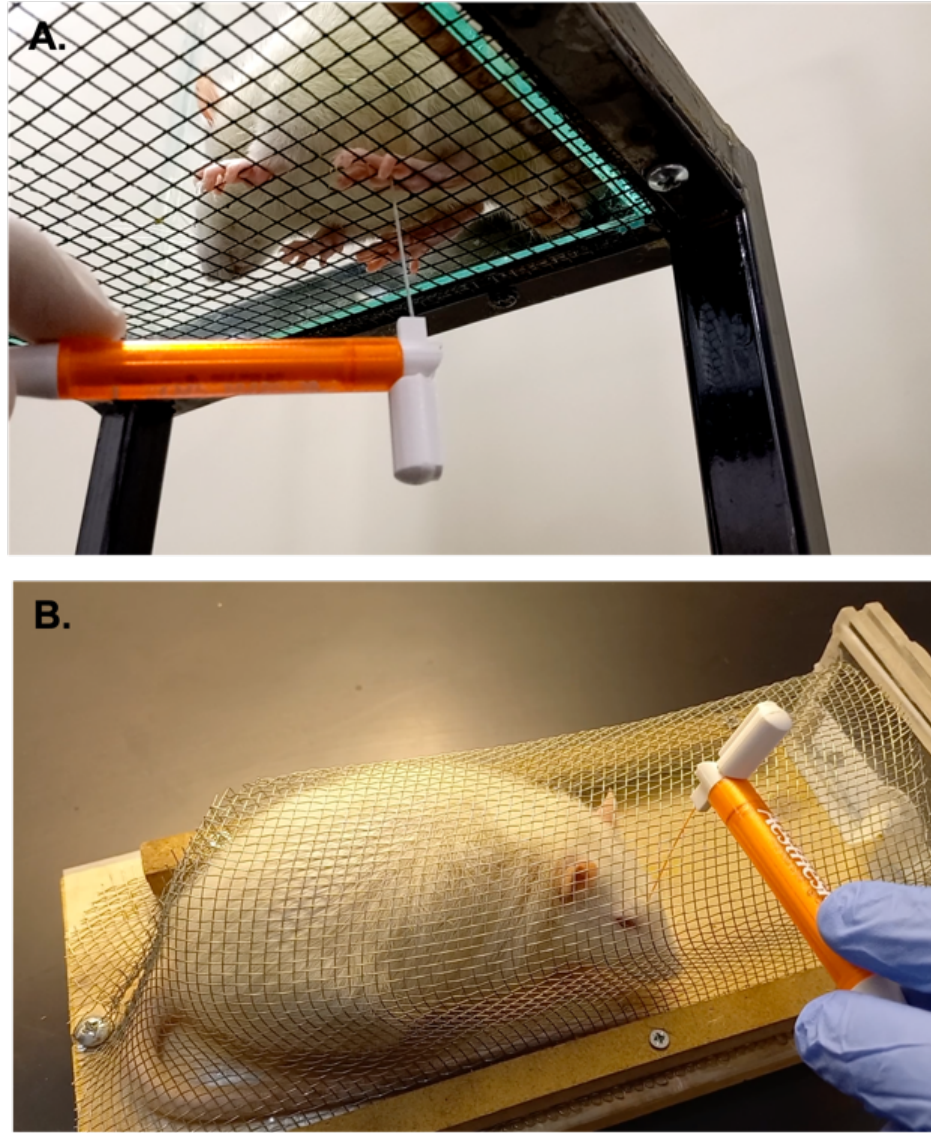
3.3. Davranış Deneyleri

Çalışmamızda migren benzeri fenotipi değerlendirmek için von Frey filamanı testi, yükseltilmiş artı testi, karanlık-aydınlık kutu testi, açık alan arena testi kullanıldı. Von Frey filamanı testinde mekanik eşiklerin düşük olduğu zaman dilimi “baş ağrısı” fazı olarak kabul edildi ve diğer davranış deneyleri bu zaman diliminde NTG veya LVC enjekte edilmiş ayrı sıçan gruplarında uygulandı. Tüm davranış deneyleri sıçanlar davranış laboratuvarına alınıp 1 saat aklimatize edildikten sonra başlatıldı. Tüm davranış deneylerinin kamera ile görüntüleri kaydedildi. Yükseltilmiş artı testi ve açık alan arena testindeki parametrelerin ölçümü görüntü işleme programı ANY-maze (Stoelting Europe, Dublin, İrlanda) ile değerlendirildi. Karanlık-aydınlık kutu testinin sonuçları ise kayıtlı görüntülerden elle hesaplandı.

3.3.1. Von Frey Filamanı Testi

Periorbital ve arka pati mekanik allodinisi von Frey filamentleri ile "up-and-down" yöntemiyle değerlendirildi (134). Periorbital mekanik eşikleri test etmek için dikdörtgen yüzeyi asetat kaplı tahta parçası olan, tabanının çapı 7 cm, boyu 25 cm olan 0,5 cm'lik kare delikli sert fileden oluşan yarım silindir şeklinde bir aparat kullanıldı (Şekil 3.2). Sıçanlar periorbital deneyler başlamadan önce bu aparata 3 gün 5 dakikalık periyotlarla alıştırdı. Deney günü sıçanlar bu aparata zor kullanılmadan yerleştirildi, keşfetme ve dönme davranışlarının bitmesi beklendi. Periorbital mekanik eşik testi için her iki gözün orta-rostral kısmına 2 g'dan başlayan von Frey monofilamentleri uygulandı. Baş geriye çekme, baş sallama, vokalizasyon, ipsilateral baş kaşıma ve tüm vücut geri çekilmeleri pozitif yanıt olarak kabul edildi.

Arka pati eşik testi için ise sıçanlar masadan 20 cm yükseklikte ayakları bulunan, bu yükseklikteki alt zemini 0,5 cm'lik kare delikli sert fileden yapılmış olan ve üzerinde yüksekliği, eni ve boyu sırasıyla 22 cm x 15,5 cm x 19,5 cm olan üstü açık cam kısımdan oluşan bir test aparatına yerleştirildi (Şekil 3.2). Keşif davranışı sona erdikten sonra teste başlandı. Von Frey monofilamentleri 4 g'dan başlanarak arka patinin orta plantar kısmına uygulandı. Pati çekme, pati yalama ve vokalizasyonlar pozitif yanıtlar olarak kabul edildi. %50 geri çekme eşiklerinin hesaplanması https://bioapps.shinyapps.io/von_frey_app/ adresindeki ücretsiz çevrimiçi hesap makinesi kullanılarak yapıldı.



Şekil 3.2. Arka pati ve periorbital mekanik allodini test aparatları. **A)** Sıçanlar, arka pati aparatına yukarıdan bırakılarak yerleştirildi. Deney protokolü keşfetme davranışı bittikten sonra başlatıldı. **B)** Periorbital aparat, sıçanın içeride restriksiyona sebep olmayacak şekilde durabilmesine imkân tanıyacak şekilde dizayn edildi (7x25x10 cm). Hayvanlar şekilde görüldüğü gibi aparata kendiliklerinden girdikten sonra von Frey filamanları periorbital bölgeye dik biçimde uygulandı.

3.3.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

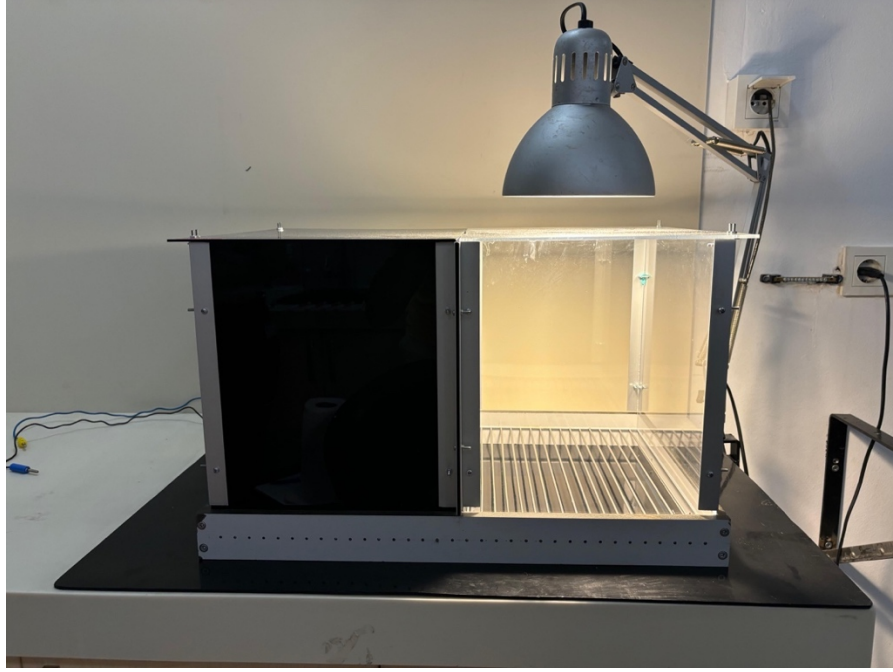
Ağrı ilişkili anksiyete benzeri davranışın değerlendirilmesi için yükseltiľmiř artı labirent testi kullanıldı (135). Sıçanlar dört dik koldan (40 cm×15 cm) oluşan artı şeklindeki labirentin merkezine yerleştirildi. Kollardan ikisi açık, ikisi ise duvarlarla (45 cm) evrili olarak tasarlandı. Açık kollarda geçirilen süre 5 dakika boyunca analiz edildi.



şekil 3.3. Yükseltiľmiř artı testi platformu. Sıçanlar merkeze yüzleri açık kola bakacak şekilde yerleştirildi ve açık kolu keşfetme süreleri 5 dakika boyunca kaydedildi.

3.3.3. Karanlık-Aydınlık Kutu Testi

Işıktan kaçma davranışı, biri aydınlık (3000 lx) ve diğeri tamamen karanlık olan iki bitişik bölmeden oluşan bir aparatla test edildi. Bölmelerin her birinin yüksekliği 30 cm, eni 26 cm, boyu 30 cm olarak tasarlandı. Test sırasında, sıçanlar her iki bölmeyi de keşfetmeye bırakıldı. Aydınlık bölümde geçirilen süre ve karanlıktan aydınlığa geçişlerin sayısı 15 dakika boyunca ölçüldü.



Şekil 3.4. Karanlık-aydınlık kutu testi. Sıçanlar kutunun aydınlık tarafına bırakıldı. 15 dakika boyunca karanlık ve aydınlık tarafları keşif süreleri kaydedildi. Aydınlık tarafı keşif süreleri ve karanlık taraftan aydınlık tarafa geçiş sayıları fotofobinin bir ölçüsü olarak kullanıldı.

3.3.4. Açık Alan Arena Testi

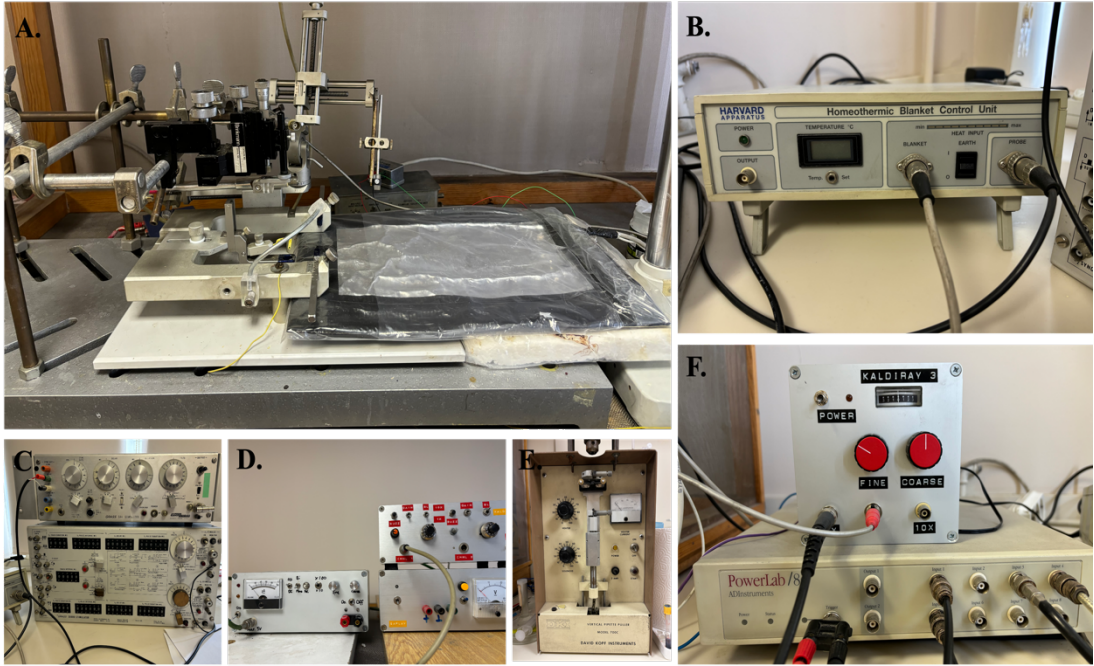
Işıktan bağımsız anksiyete açık alan arena labirenti ile değerlendirildi (136). Test aparatı tabanı siyah tahta malzemeden imal edilmiş üstü açık, kenarları şeffaf bir cam küp olarak tasarlandı (45x45x45 cm). Sıçanlar aparatın merkezine yerleştirildi ve serbestçe aparatı keşfetmelerine izin verildi. Merkez bölgede geçirilen kümülatif süre ve merkez bölgeye geçiş sayısı 30 dakika boyunca kaydedildi. Merkez bölgede geçirilen süre aynı zamanda ışıktan bağımsız anksiyete benzeri davranışın bir ölçüsü olarak kabul edildi (137).



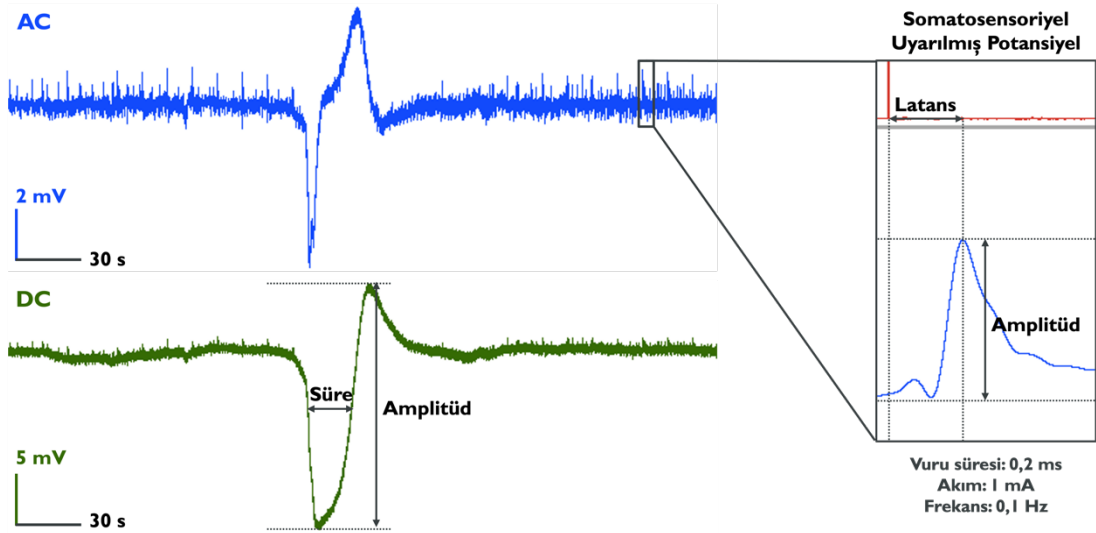
Şekil 3.5. Açık alan arena testi. Sıçanlar arenanın tam ortasına bırakıldı. Sıçanların merkez alanda geçirdikleri süre ve merkez alana geçiş sayıları anksiyete benzeri davranışı ölçmek için kullanıldı.

3.5. İn vivo Elektrofizyoloji

Elektrofizyolojik kayıtlar Şekil 3.6'da gösterilen elektronik sistem ve aparatlar ile kaydedildi. Sıçanlar intraperitoneal 1,2 g/kg üretan enjeksiyonu ile anestezi edildi. Anestezi derinliği pati çekme refleksi ve kornea refleksinin yokluğu ile teyit edildi. Sıçanlar daha sonra stereotaksik çerçeveye yerleştirildi ve vücut sıcaklıkları termoregülatör battaniye ile sabit tutuldu. Rostro-kaudal ekseninde baş üstünden yapılan sagittal bir kesi ile bregma ve lambda ortaya kondu. Sağ primer somatosensoriyel kortekse (AP 0.0; ML \pm 3.8) ve ipsilateral primer görsel kortekse (AP -6.0; ML -3.8) erişmek için 2 "burr hole" drill yardımıyla açıldı. Dura, "pinprick" kaynaklı KYD'leri önlemek için özellikle sağlam bırakıldı. KYD'yi kimyasal olarak indüklemek için üçüncü bir burr hole kullanıldı. Toprak elektrodu olarak hayvanın boynuna saplı altın kaplı bir iğne elektrot kullanıldı. Dura mater üzerinden AC ve DC kayıtları hipertonic salin içeren Ag/AgCl cam mikroelektrotlarla elde edildi. Sol median sinir her 10 saniyede bir uyarıldı (1 mA uyarıcı akımı; 0,2 ms atım süresi) ve sağ somatosensoriyel korteksten somatosensoriyel uyarılmış potansiyeller (SSEP) kaydedildi. Dural EEG sinyalleri bu sistemle kaydedildi ve bir "headstage" (Batiray, YSED, Türkiye) ve bir yükseltici (Kaldıray EX-2C, YSED) ile amplifiye edildi. Veriler, bir veri toplama sistemi (PowerLab 8/SP, ADInstruments, Avustralya) ile dijitize edildi. Veri kayıtları ve analizi LabChart yazılımı (AD Instruments, Avustralya) kullanılarak yapıldı. 20 dakikalık bazal kayıttan sonra, KYD eşiği 5 dakikalık aralıklarla artan konsantrasyonlarda KCl (25 mM, 50 mM, 75 mM, 125 mM, 150 mM, 175 mM, 250 mM, 500 mM) ile ıslatılmış bir pamuk yerleştirilerek kimyasal olarak hesaplandı (138). Ardından, seri KYD'leri indüklemek için, 1 M KCl ile ıslatılmış bir pamuk KYD "burr hole" deliğinin üzerine yerleştirildi ve her 15 dakikada bir 1 M KCl ile ıslatılarak nemli tutuldu. Bu KYD'ler amplitüd, süre, frekans ve yayılma başarısızlığı açısından değerlendirildi. Uyarılmış potansiyeller amplitüdlere ve tepe noktalarına olan latanslarına göre ölçüldü. Bazal EEG'nin güç spektrumları da hesaplandı. Örnek KYD traseleri (hem AC hem DC kayıtlar), örnek SSEP trasesi ve bu traselerden ölçülen parametreler şekil 3.7'de gösterildi.



Şekil 3.6. Elektrofizyoloji deney ekipmanları. **A)** Stereotaksik çerçeve. **B)** Rektal termometre ile çalışan termal battaniye. **C)** Stimülatör. **D)** Stimulus izolasyon ünitesi (solda), amfi (sağ üstte) ve güç kaynağı (sağ altta). **E)** Pipet çekici. **F)** Amfi (üstte) ve analog-dijital sinyal dönüştürücü (altta).



Şekil 3.7. Örnek KYD ve SSEP traseleri ve bu traselerden ölçülen parametreler. Üst paneldeki mavi renkli trase AC kayıt trasesidir. Bu traseden en iyi SSEP gibi hızlı (>1 Hz) sinyaller okunabilir. O nedenle SSEP'ler bu traseden ayıklandı, latans ve amplitüdüleri hem KYD öncesinde hem de KYD sonrasında ölçüldü. Buna karşın aşağıdaki yeşil renkli trase DC kayıt trasesidir. DC kayıt sistemi 0,5 Hz'den düşük sinyalleri de kaydedebildiği için çok yavaş bir sinyal olan KYD analizi amaçlı kullanıldı.

3.6 Protein Düzeyi Ölçümü

3.6.1. Doku Toplanması

Kortikal c-fos ekspresyonunun gösterilmesi için sıçanlar intraperitoneal üretran (1,4 g/kg) enjeksiyonu ile anestezi edildikten sonra dekapite edildi. Beyinler hızlıca çıkartıldı ve soğutulmuş beyin-omurilik sıvısına kondu. Bir dakika boyunca soğutulan beynin hemisferleri ayrıldı, her iki taraftan da diensefalon uzaklaştırıldı. Tüm korteks izole edildikten sonra parietal kortkse denk düşen korteks kısmında 2 mm kalınlığında kesit alındı ve bu kesitler homojenize edilmek üzere proteaz ve fosfataz içeren solüsyona kondu.

3.6.2. Protein İzolasyonu

Ticari olarak edinilen, proteaz ve fosfataz inhibitörü içeren RIPA tamponu (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948A) 1 gram dokuya 3 mL olacak şekilde eklendi. RIPA tamponu eklenen doku örnekleri doku homojenizatörü (Sonoplus mini 20, Bandelin,Almanya) ile homojenize edildi. Homojenizasyonu takiben doku örnekleri 30 dk boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Homojenatlar 30 dakikalık buz inkübasyonundan sonra +4C'de 10000 g de 20 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen şeffaf süpernatant, protein düzeyi ölçümleri için kullanılmak üzere alikotlanmış ve -80C'de muhafaza edildi.

3.6.3. Protein Konsantrasyon Ölçümü

Protein konsantrasyon ölçümü ticari bir kit olan Elabscience® Total Protein (TP) Colorimetric Assay Kit (Katalog No: E-BC-K168-M, Elabscience, Elabscience, USA) kullanılarak yapıldı. Standart olarak sığır serum albümini (BSA) 0-1 mg/mL konsantrasyonları arasında hazırlandı. Üreticinin belirlediği protokole göre kuyucuk başına 200 µL çalışma solüsyonu hazırlandı. Her kuyucuğa 200 µL çalışma solüsyonu eklendikten sonra 1:25 dilüe edilmiş protein örnekleri 20 µL miktarında eklendi. Kolorimetrik ölçümler için kullanılan plaka 96 kuyucuktan oluşmaktadır. Plaka 20 saniye karıştırıldıktan sonra 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra, plakadaki protein örneklerinin miktarı 562 nm dalga boyunda spektrofotometre (MultiScanGO, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile tayin edildi. Standartlara göre çizilen eğriden örneklerde bulunan protein konsantrasyonu hesaplandı.

3.6.4. Western Blot

Kortikal protein örnekleri 50 µg/10 µL konsantrasyonunda olacak şekilde %10 akrilamid jele (TGX FastCast Acrylamide Solution, Bio-Rad, ABD) yüklendi, 90 dakika boyunca 90 V'de yürütüldü ve Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi (Bio-Rad, ABD) aracılığıyla 7 dakika boyunca 1,3 mA'de PDVF'ye aktarıldı. Daha sonra membranlar %5 süt tozu solüsyonu ile oda sıcaklığında 2 saat süreyle bloke edildi (Bio-Rad, ABD). Sonrasında, membranlar primer antikorlarla (c-fos: ABE457, Millipore, ABD, 1:2000 dilüsyonda; β-aktin: Bioss, ABD, 1:1000 dilüsyonda) ile 4 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Üç tur TBS-T yıkamasından sonra membranlar 1:2000 dilüsyonda sekonder antikor (AP307P, Millipore, ABD) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Membranlar Western Kemilüminesan HRP Substratı (Immobilon, #WBKLS, Merck) ile karanlıkta 5 dakika muamele edildi. Membranlar daha sonra Syngene G:BOX Chemi XRQ ile görselleştirilmiş ve ImageJ (NIH, ABD) ile analiz edildi. Protein miktarının normalizasyonu için β-aktin seviyeleri kullanıldı. Protein seviyelerindeki göreceli değişim normalize edilmiş oran (c-fos/β-aktin) olarak gösterildi.

3.7. Kan Beyin Bariyeri Permeabilite Değerlendirmesi

Akut NTG ve LVC enjeksiyonlarının sıçanların kan beyin bariyeri permeabilitesi üzerine etkisi, santral sinir sistemine geçmiş olan Evans mavisinin (EM) spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile değerlendirildi. EM moleküler ağırlığının yüksek oluşundan dolayı intakt kan beyin bariyerinden geçemez. Bunun dışında EM, albümin ile kompleks oluşturabilmektedir. Kortekse ekstravaze olan bu kompleksin kimyasal olarak dokudan ekstrakte edilip ölçülmesiyle kan beyin bariyeri permeabilitesi değerlendirildi (139). EM salin içinde %2 (w/v) olarak hazırlandı. Hayvanlar uretan (1,4 g/kg) ile anestezi edildi ve EM (3 mL/kg) enjekte edildi. Tüm enjeksiyonlar, hayvanların mekanik eşiklerinin en düşük olduğu 1 saat boyunca EB boyasına maruz kalacakları şekilde zamanlandı. İşlem sırasında vücut sıcaklıkları termoregülatör bir battaniye ile sabit tutuldu. Daha sonra hayvanlar transkardiyal olarak serum fizyolojik ile perfüze edildi. Frontoparietal ve oksipital korteksler toplandı. Beyinlerin yaş ağırlıkları ölçüldü ve her 1 g doku için 1 mL %50 (salin içinde w/v) trikloroasetik asit eklendi. Örnekler daha sonra homojenize edildi ve 10000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar toplanmış ve etanol ile dört kat seyreltildi. Standartlar da çeşitli konsantrasyonlarda etanol içinde EM boyası olarak hazırlandı. Absorbanslar 620 nm'de spektrofotometre (MultiScanGO, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile ölçüldü.

3.8. İstatistiksel Analiz

Veri analizinde GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Boston, ABD) programı kullanıldı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak belirtildi. Deney gruplarında hipotez testlerinden önce normalite testleri yapılarak normal dağılım yönünden incelendi. Gruplardan en az biri normal dağılıma uymuyorsa non-parametrik testler, tüm gruplar normal dağıldığında ise parametrik testler kullanıldı. Parametrik veriler için, karşılaştırılacak iki veya üç grup olduğunda sırasıyla student's t testi veya ANOVA (tek yönlü veya iki yönlü) ve ardından uygun *post hoc* testi kullanıldı. Parametrik olmayan veriler için Mann Whitney U, Kruskal Wallis ve Friedmann testleri kullanıldı. Post hoc testler ANOVA'nın F değerleri anlamlı olmadığında yapılmadı. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

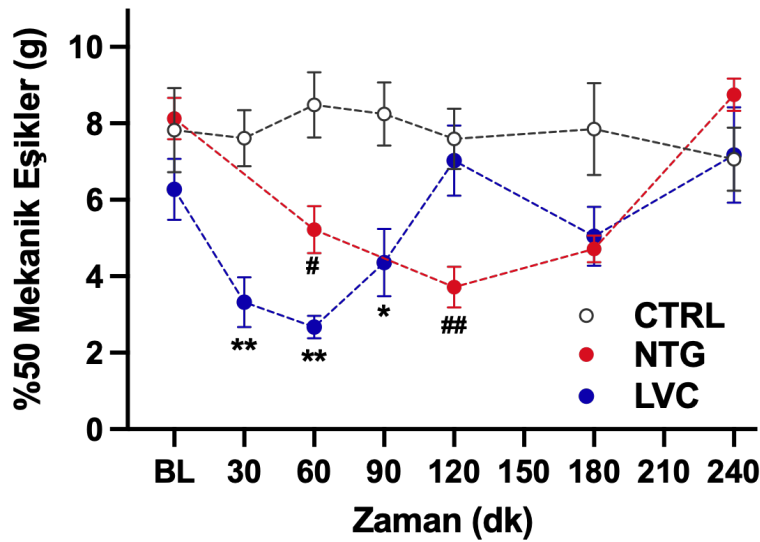
4. BULGULAR

4.1. Nitrogliserin veya Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modellerinde Periorbital ve Arka Pati Mekanik Eşikleri

Vehikül kaynaklı olabilecek muhtemel mekanik eşik değışikliklerini dışlamak için salin içerisinde %10 etanol enjeksiyonunun etkilerini inceledik. Hem periorbital hem de arka pati ölçümlerinde hiçbir ölçüm anında herhangi bir eşik değışikliği gözlemedik.

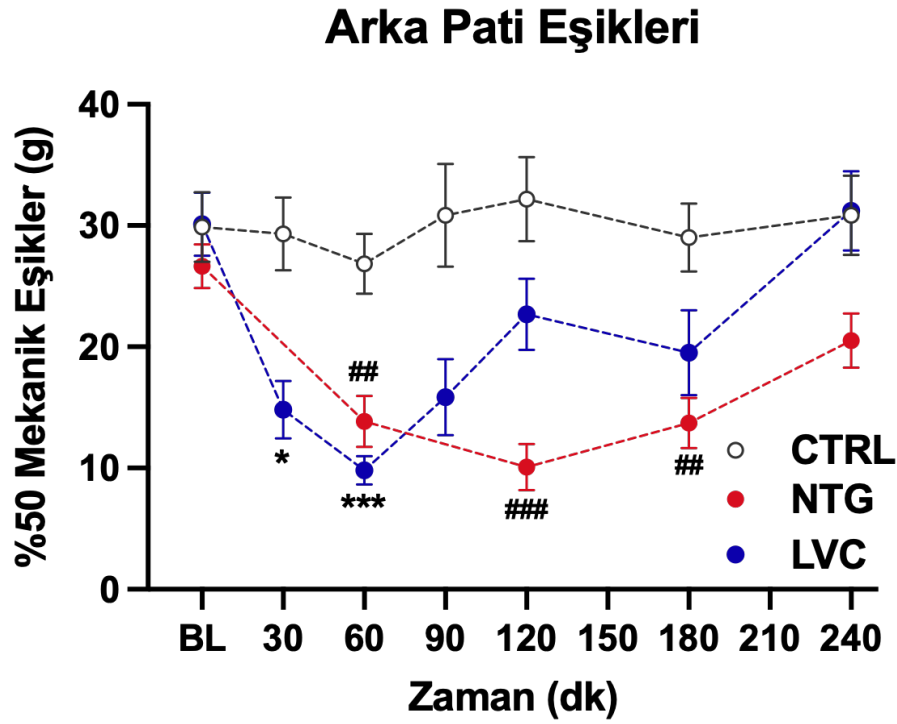
Öncelikle, akut LVC ve NTG enjeksiyonu ile indüklenen periorbital mekanik eşik düşüşlerini karşılaştırdık [F (2, 25) = 5,972; p<0,01; Şekil 4.1]. İntraperitoneal LVC enjeksiyonunu takiben, 30. dakikada periorbital belirgin bir azalma gözlemedik (p<0,01). Eşikler ilgili CTRL değerlerine kıyasla yaklaşık 60. dakikada minimuma düştü (p<0,01) ve yaklaşık 120 dakika sonra kontrol seviyelerine ulaştı. NTG grubunun 60. ve 120. dakikalarda periorbital eşikleri anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla p<0,05 ve p<0,01) ve 240. dakikada başlangıç seviyesine döndü.

Periorbital Eşikler



Şekil 4.1. CTRL, NTG ve LVC gruplarında zamana göre periorbital eşiklerdeki değışim. LVC ve NTG enjeksiyonları periorbital bölgede mekanik eşiklerde önemli ölçüde azalmaya neden oldu. LVC enjeksiyonu 30. dakikada eşiklerde hızlı bir düşüşe sebep oldu ve mekanik eşikler 60. dakikada minimum değerine ulaştı. LVC ile indüklenen mekanik allodini 120. dakikada sona erdi. Buna karşın, NTG enjeksiyonu sonrası mekanik eşikler 120. dakikada minimum değerine ulaştı ve 240. dakikaya kadar düzelmedi. (CTRL: kontrol, NTG: nitrogliserin, LVC: levkromakalim, *p < 0.05 LVC vs CTRL; ** p < 0.01 LVC vs. CTRL; *** p < 0.001 LVC vs. CTRL; # p < 0.05 NTG vs. CTRL; ## p < 0.01 NTG vs. CTRL; ### p < 0.001 NTG vs. CTRL).

Benzer şekilde, LVC ve NTG enjeksiyonu arka pati mekanik eşiklerinde geçici bir azalmaya sebep oldu [$F(2,34)=11,85$; $p<0,0001$, Şekil 4.2]. LVC enjeksiyonundan sonra, 30. ve 60. dakikalarda eşiklerde anlamlı bir düşüş gözlemledik. 60. dakikada, ilgili CTRL değerlerine kıyasla en düşük arka pati eşikleri tespit edildi ($p<0,0001$). Eşikler yaklaşık 120 dakika sonra periorbital LVC eşikleri ile tutarlı olarak düzeldi. NTG enjeksiyonu ayrıca 60, 120 ve 180 dakikalık zaman noktalarında arka pati mekanik eşiklerini azalttı (her üç zaman noktası için sırasıyla $p<0,01$; $p<0,0001$; $p<0,01$). NTG grubu için maksimum düzelme 240. dakikada elde edildi ve bu zaman noktasında NTG ve CTRL grupları arasında istatistiksel anlamlılık saptanmadı ($p>0,05$).

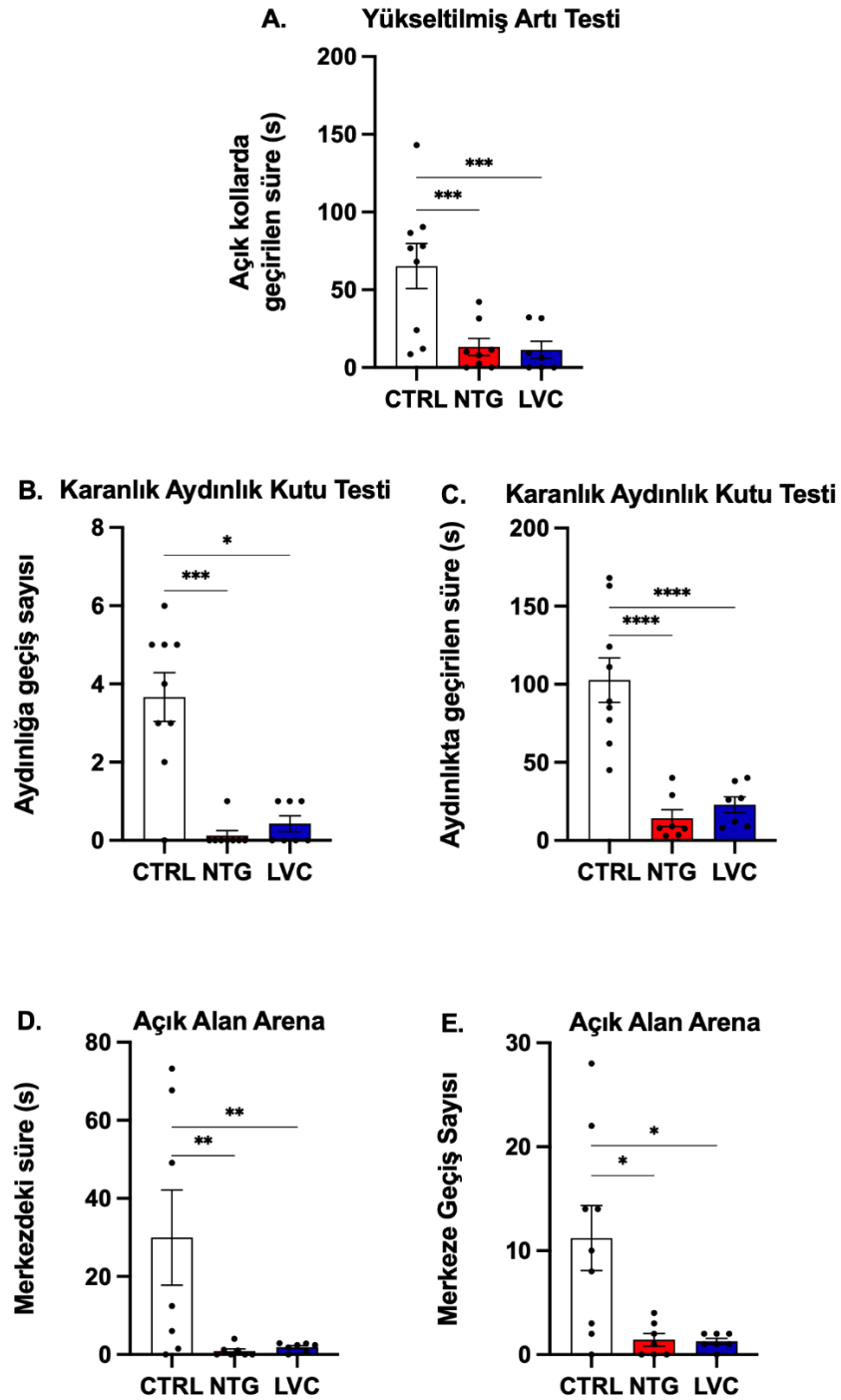


Şekil 4.2. CTRL, NTG ve LVC gruplarında zamana göre arka pati eşiklerindeki değişim. LVC ve NTG enjeksiyonları arka patide de periorbital bölgeye benzer şekilde mekanik eşikleri azalttı. LVC enjeksiyonunu takiben 30. dakikada eşikler hızlı bir şekilde düşerek 60. dakikada en allodinik değerine ulaştı. LVC ile indüklenen mekanik allodini 120. dakikada sona erdi. NTG enjeksiyonu sonrası mekanik eşikler 60.dakikada düşmeye başladı, 120. dakikada minimum değerine ulaştı ve 240. dakikada düzeldi. (CTRL: kontrol, NTG: nitrogliserin, LVC: levkromakalim, * $p < 0.05$ LVC vs CTRL; ** $p < 0.01$ LVC vs. CTRL; *** $p < 0.001$ LVC vs. CTRL; # $p < 0.05$ NTG vs. CTRL; ## $p < 0.01$ NTG vs. CTRL; ### $p < 0.001$ NTG vs. CTRL).

4.2. Nitrogliserin veya Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modellerinde Ağrı İlişkili Anksiyete ve Işıktan Kaçma Davranışı

LVC'nin baş ağrısı benzeri bir fenotipe eşlik eden diğer davranışlarını ortaya koymak için anksiyete benzeri davranışları ve ışıktan kaçma davranışı değerlendirildi. Davranış testi bataryası her hayvan için yaklaşık 1 saat sürdüğünden, davranış deneyleri için periorbital eşiklerin minimum olduğu noktalar seçildi. LVC grubu için deneyler enjeksiyondan sonraki 30. dakikada başlayacak şekilde zamanlandı. NTG grubu için, testler NTG enjeksiyonunun 2. saatinde başlatıldı.

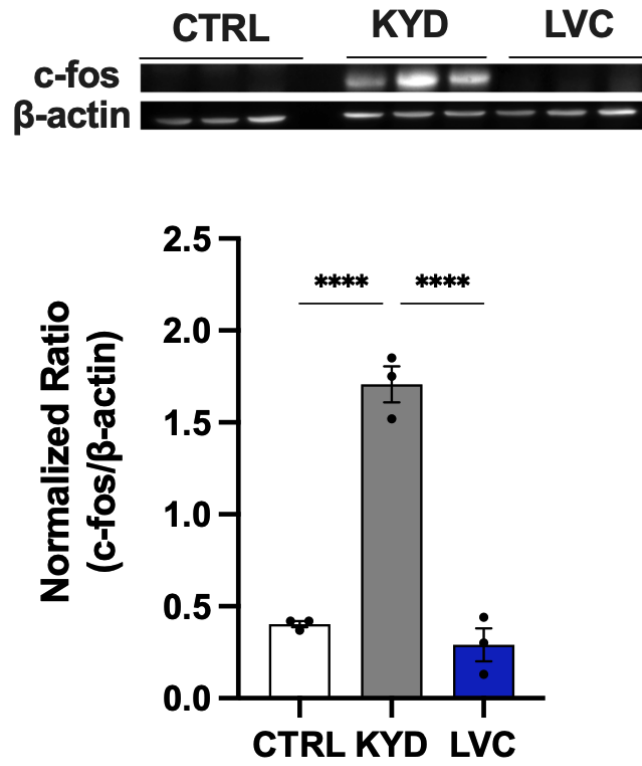
Yükseltilmiş artı testinde, NTG ve LVC gruplarındaki sıçanlar, platformun açık kollarında anlamlı derecede daha az zaman geçirdi [$F(2,12.21) = 10,51$; $p < 0,01$; Şekil 4.3A]. Karanlık-aydınlık kutu testinde, LVC veya NTG enjeksiyonundan sonra karanlık bölümden aydınlık bölüme geçiş sayısı önemli ölçüde azaldı (Kruskal-Wallis $H 14,27$; $p < 0,0001$; Şekil 4.3B). Benzer şekilde, LVC veya NTG enjekte edildiğinde sıçanlar aydınlık bölüme daha kısa süre geçirdi (Kruskal-Wallis istatistikleri $16,53$; $p < 0,0001$; Şekil 4.3C). Son olarak, açık alan arena testinde, ışıktan bağımsız anksiyete benzeri davranışlar değerlendirildi. Hem LVC hem de NTG gruplarında, sıçanlar merkezde daha az zaman geçirdi [$F(6,40) = 3,85$; $p < 0,05$; Şek. 4.3D] ve merkez bölgeye giriş sayıları azaldı ($F(2, 20) = 7,378$, $p < 0,01$; Şek. 4.3E).



Şekil 4.3. CTRL, NTG ve LVC gruplarında ağrı ilişkili anksiyete benzeri davranış ve ışıktan kaçma davranışı. A) Akut LVC veya NTG uygulanan sıçanlar, yükseltmiş artı labirentin açık kollarında daha az zaman geçirdi. B) LVC veya NTG enjekte edilen sıçanlar karanlık bölmeden aydınlık bölmeye daha az geçiş yaptı ve (C) aydınlık bölmede daha az zaman geçirdi. D) LVC veya NTG enjeksiyonundan sonra hayvanlar, açık alan arena testinde merkez bölgede daha az zaman geçirdi ve (E) merkez bölgeye giriş sayıları daha azdı. (CTRL: kontrol, NTG: nitrogliserin, LVC: levkromakalim, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

4.3. Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modelinde Kortikal c-fos Ekspresyonu

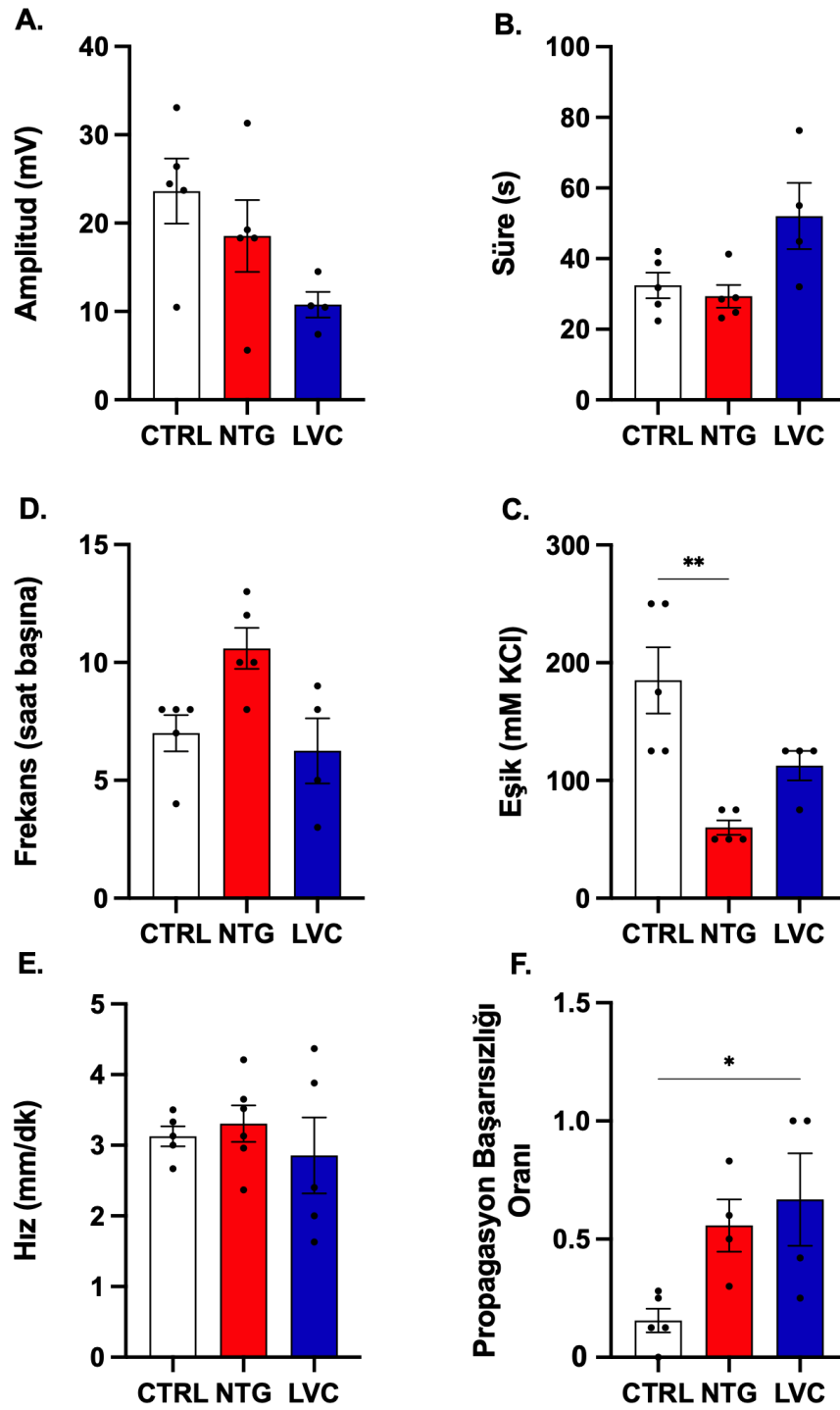
LVC'nin uyanık sıçanlarda KYD'yi indükleyip indükleyemeyeceğini doğrulamak için kortikal c-fos ekspresyon seviyeleri ölçüldü. Uyanık sıçanlarda yapılan c-fos verilerinin karşılaştırmalarında, pozitif kontroller olarak anestezi altında KYD indüklenmiş sıçanlardan parietal korteks dokusu toplandı. KYD'li korteksler uyanık CTRL grubuna kıyasla c-fos ifadesinde yaklaşık dört kat artış sergiledi ($p < 0,0001$). Uyanık sıçanlara LVC enjeksiyonu sonrası toplanan kortekslerin hiçbirinde c-fos ifadesi indüklenmedi ($F(2,6) = 103,9$; $p < 0,0001$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. CTRL, KYD ve LVC gruplarında uyanık hayvanlardan toplanmış doku örneklerinde kortikal c-fos ifadeleri. LVC, kortekste c-fos ifadesini artırmadı. KYD, kortekste c-fos ifadesinin artmasına neden oldu. LVC, kontrol grubuna kıyasla c-fos ifadesini indüklemedi. (CTRL: kontrol, KYD: kortikal yayılan depolarizasyon, LVC: levkromakalim, * $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$; **** $< 0,0001$).

4.4. Nitrogliserin veya Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modellerinde Kortikal Yayılan Depolarizasyon Parametreleri

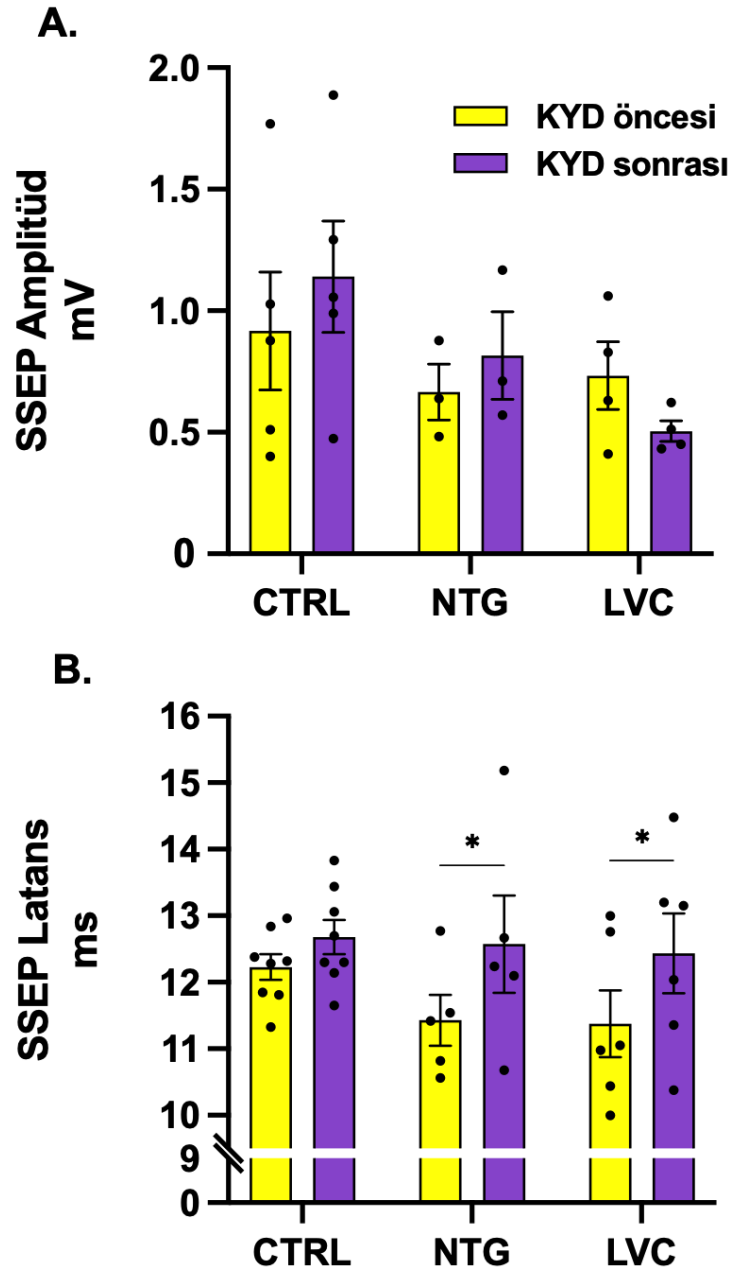
LVC'nin KYD'yi fasilite edip etmediğini değerlendirmek için eşik, amplitüd, süre, frekans ve yayılma başarısızlığı gibi KYD parametrelerini incelendi. LVC CSD eşiğini, amplitüdünü, frekansını ve süresini etkilemedi (hepsi için $p>0,05$; Şekil 4.5A-D). LVC grubu yayılma başarısızlığı oranını artırmıştır ($p<0,05$; Şekil 4.5F). Uygulanan maddelerin hiçbiri KYD hızını etkilemedi (Şekil 5E). Benzer şekilde, NTG eşik hariç yukarıda bahsedilen KYD parametrelerinin hiçbirini değiştirmede (Kruskal-Wallis H 10,35; $p<0,05$) (Şekil 4.5A-F).



Şekil 4.5. CTRL, NTG ve LVC gruplarında KYD parametreleri. LVC veya NTG enjeksiyonu KYD'nin (A) amplitüdlerini, (B) sürelerini, (D) frekansını ve (E) hızını etkilemedi. C) LVC, KYD eşiklerini değiştirmezken, NTG enjeksiyonu yapılan sıçanlarda KYD eşikleri daha düşük bulundu. F) LVC, kontrol grubuna kıyasla yayılma başarısızlığını artırdı. (CTRL: kontrol, NTG: nitrogliserin, LVC: levkromakalim, KYD: kortikal yayılan depolarizasyon, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

4.5. Nitrogliserin veya Levkromakalim ile İndüklenen Akut Migren Modellerinde Somatosensoriyel Uyarılmış Potansiyel Parametreleri

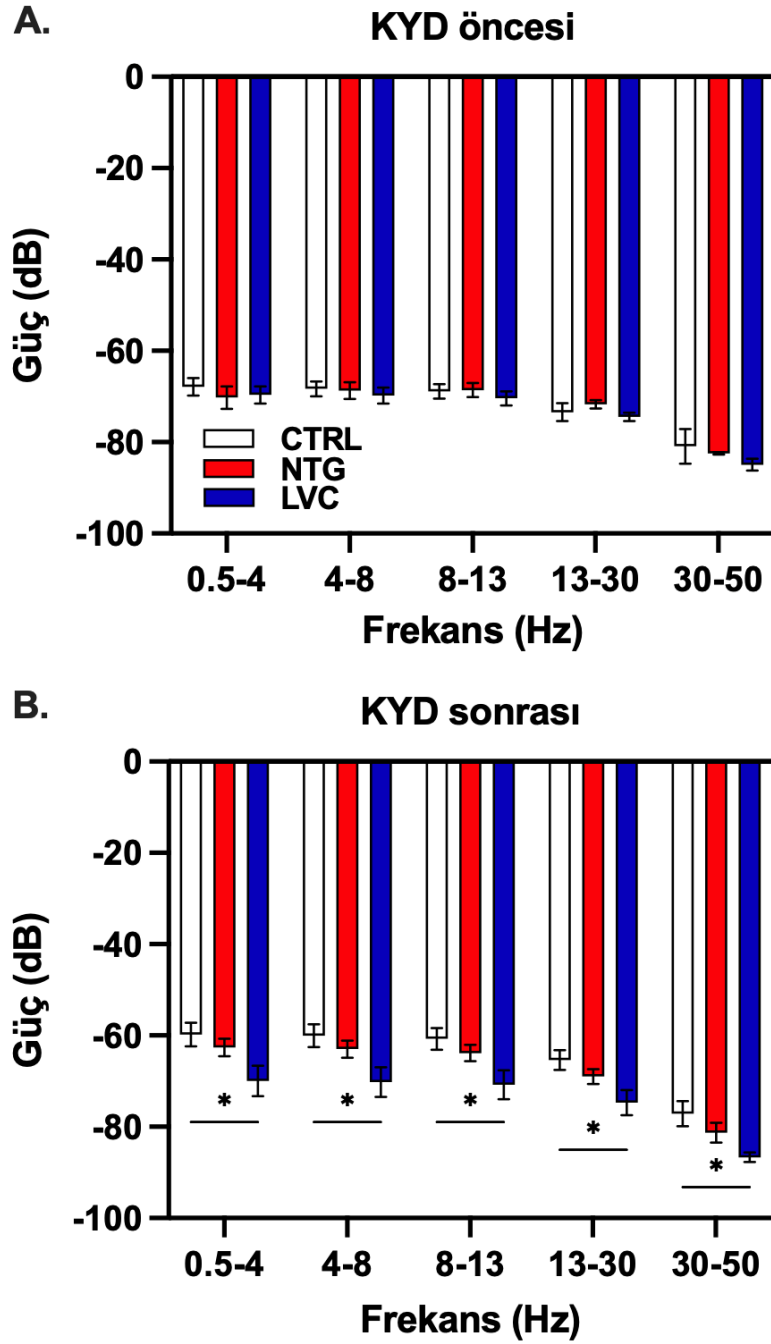
LVC'nin periferik dokulardan kortekse sinyal iletimini ve somatosensoriyel kortikal işleme üzerine olan etkileri SSEP ile ölçüldü. NTG veya LVC enjeksiyonu KYD öncesinde veya sonrasında ölçülen SSEP amplitüdlerini değiştirmede [sırasıyla $F(2, 9)=0,4238; p>0,05$ ve $F(2, 9)=3,189; p>0,05$] (Şekil 4.6A). LVC ve NTG enjekte edilen sıçanlar KYD öncesi ve sonrasında CTRL grubuna benzer latanslara sahipti [$F(2,16)=0,58; p>0,05$]. Her bir tedavi grubu kendi içinde karşılaştırıldığında, latanslar NTG ve LVC grubunda KYD sonrasında anlamlı derecede daha uzundu [$F(1, 16)=22,27; p<0,001$] (Şekil 4.6B).



Şekil 4.6. CTRL, NTG ve LVC gruplarında SSEP parametreleri. LVC veya NTG, (A) SSEP amplitütlerini ve (B) latanslarını değiştirmediler. KYD'yi takiben, LVC veya NTG ile tedavi edilen grupların SSEP latansları uzamış bulundu. (CTRL: kontrol, NTG: nitrogliserin, LVC: levkromakalim, KYD: kortikal yayılan depolarizasyon, SSEP: somatosensoriyel uyarılmış potansiyel, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

4.6. NTG veya LVC ile İndüklenen Akut Migren Modellerinde Güç Spektrum Analizi

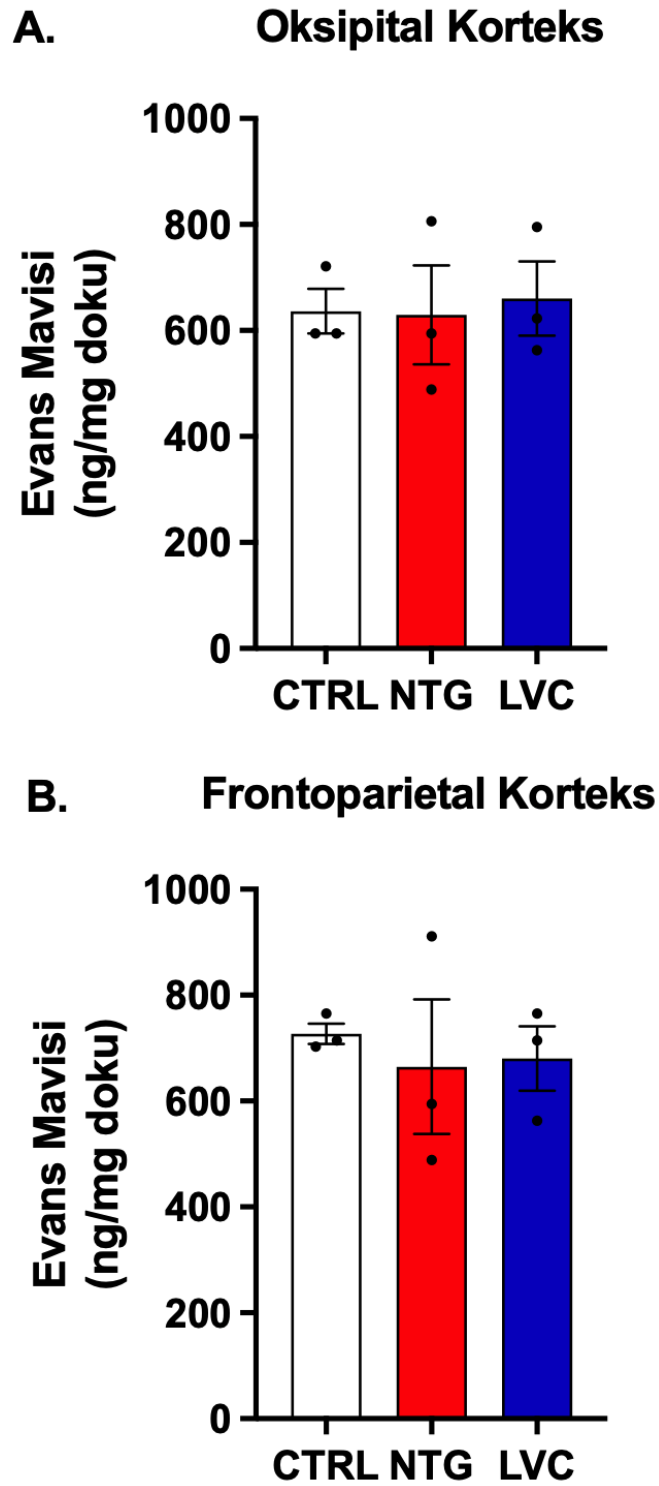
EEG kayıtları KYD öncesi ve sonrasında güç spektrumları açısından analiz edildi. KYD öncesinde, farklı deney grupları arasında fark tespit edilmedi ($F(2, 88)=2,914$; $p>0,05$) (Şekil 4.6A). Bir KYD dalgasını takiben, LVC grubu CTRL grubuna kıyasla delta, teta, alfa, beta ve gama aralığında daha zayıf bir aktivite sergiledi (Şekil 6B).



Şekil 4.7. CTRL, NTG ve LVC gruplarında güç spektrumu analizleri. LVC enjeksiyonu yapılan sıçanların KYD sonrasında güç spektrum profilleri CTRL ve NTG'den farklıydı. A) KYD öncesinde farklı deney grupları arasında güç spektrum profili benzerdi. B) KYD sonrasında LVC grubunda delta, teta, alfa, beta ve gama bantlarında aktivite yavaşlamış bulundu. (CTRL: kontrol, NTG: nitrogliserin, LVC: levkromakalim, KYD: kortikal yayılan depolarizasyon, * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; **** < 0,0001).

4.7. NTG veya LVC ile İndüklenen Akut Migren Modellerinde Kortikal Kan Beyin Bariyeri Permeabilitesi

Akut LVC veya NTG enjeksiyonunun kortikal kan-beyin bariyerini doğrudan bozup bozmadığını ve olası bir KYD kaynaklı kan beyin bariyeri bozulmasının LVC'nin indüklediği migren benzeri fenotipe eşlik edip etmediğini araştırmak için evans mavisiyle frontoparietal ve oksipital kortekslerde kan beyin bariyeri permeabilitesi değerlendirildi. LVC ve NTG enjekte edilen sıçanların frontoparietal ve oksipital kortekslerindeki evans mavisi boya konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı [sırasıyla $F(2, 6) = 0,05054$; $p > 0,05$ ve $F(2, 6) = 0,1570$; $p > 0,05$] (Şekil 4.8A, B).



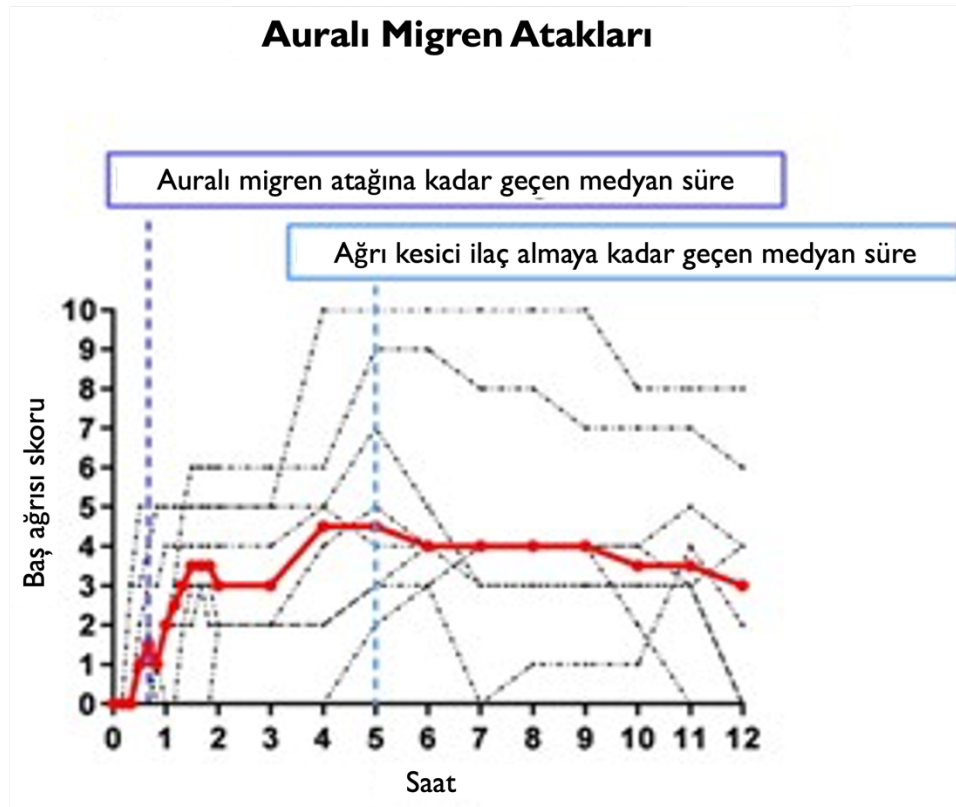
Şekil 4.8. CTRL, NTG ve LVC gruplarında kortikal kan beyin bariyeri geçirgenliği. LVC ve NTG enjeksiyonu kan-beyin bariyerini bozmadı. Ne LVC ne de NTG, oksipital ve frontoparietal kortekste damarsal geçirgenliğe yol açmadı.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda özetle şu bulgular ortaya konmuştur: Akut LVC enjeksiyonu sıçanlarda periorbital ve arka pati mekanik eşiklerini belirgin biçimde azalttı. 30 dakikalık bir etki başlangıcına sahip olan LVC, iyi bilinen NTG, silostazol ve CGRP gibi diğer sistemik migren indükleyici maddelerle karşılaştırıldığında rodentlerde en hızlı migren benzeri fenotipi indükleyebilen madde olarak göze çarpmaktadır. Buna ek olarak, LVC enjekte edilen sıçanların anksiyete benzeri davranışlar ve fotofobi gibi diğer nosisepsiyon ile ilişkili davranışlar sergilediği tespit edildi. Ayrıca, tek bir LVC enjeksiyonunun, dural elektrofizyolojik kayıtlarından ve artmış kortikal c-fos ekspresyonunun olmamasından da anlaşılacağı üzere, anestezi uygulanmış veya uyanık sıçanlarda KYD indüklediği gösterilmiştir. LVC, kimyasal olarak indüklenen KYD'nin elektrofizyolojik parametrelerini etkilememektedir ve SSEP konfigürasyonlarını değiştirmemektedir. Akut LVC ve NTG enjeksiyonunun kortikal kan beyin bariyeri geçirgenliğini de artırmadığı çalışmamızda gösterildi.

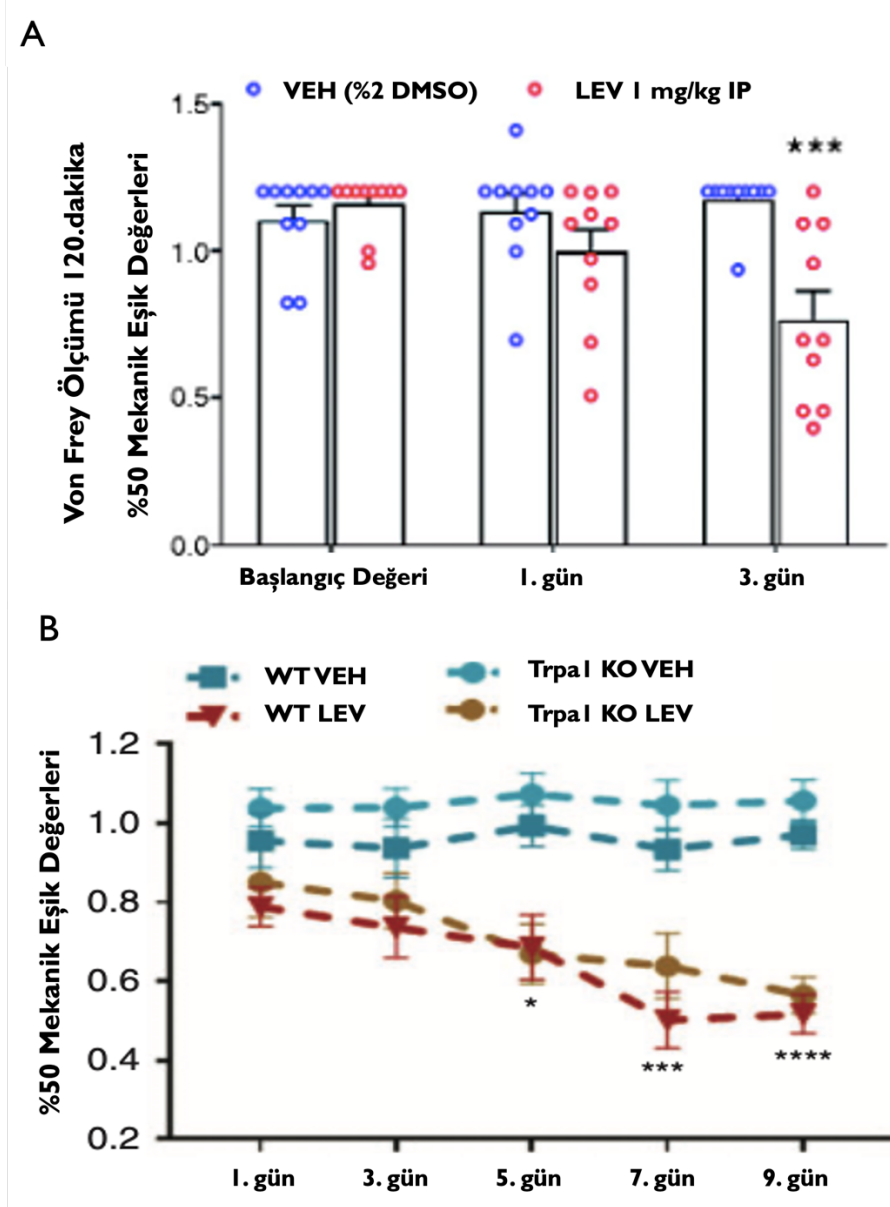
5.1. NTG veya LVC ile İndüklenen Akut Migren Modellerinin Davranışsal Karakterizasyonu

Periorbital mekanik allodini, rodentlerde migren benzeri baş ağrısının altın standart göstergesi olarak kabul edilmektedir (140). Migren hastalarında görülen sefalik ve ekstralikal sensitivitenin hayvan modellerindeki karşılığı olarak periorbital ve arka pati çekme yanıtları kullanılmaktadır (141, 142). Çalışmamızda LVC'nin periorbital ve arka pati mekanik eşiklerini düşürdüğünü gösterdik. LVC enjeksiyonunun ilk saatinde minimum seviyeye ulaşan mekanik eşiklerin 120.dakikada tamamen düzeldiğini bulduk. Bu bulgu, LVC uygulamasının bazı hastalarda 10 dakika gibi erken bir sürede migren atağını tetiklediği klinik çalışmalarla uyumludur (28) (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. İnsan çalışmalarında levkromakalim enjeksiyonundan sonra auralı migren ataklarının başlamasına kadar geçen medyan süre grafiği. Auralı migren ataklarının medyan başlangıç süresi 44 dakika olarak saptanmıştır. 28 numaralı referanstan dilimize uyarlanmıştır.

LVC ile indüklenen kronik migren modeliyle yapılan önceki çalışmalar, LVC uygulaması sonrası yanıtları test etmek için test zaman noktası olarak 2. saati benimsemiştir. Bu çalışmalarda kronik migren modelinin oluşturulması sırasında daha düşük eşiklerin tutarlı bir şekilde gözlemlenmemesinin nedeni bu olabilir (Şekil 5.2) (35, 133, 142).



Şekil 5.2. Kronik levkromakalim enjeksiyonu ile oluşturulan migren modelinde geçmiş literatüre ait von Frey ölçümleri. Eski çalışmalardan uyarlanmış bu şekillerden hem A hem B panelinde görüleceği üzere, levkromakalim enjeksiyonunun ilk gününde (ve hatta B panelinde 3. gününde) herhangi bir allodinik etki gözlemlenmemiştir. Bunun sebebi bizim çalışmamızda ortaya konduğu üzere levkromakalimin allodinik etkisinin ilk 60 dakika içinde ortaya çıkıp 120.dakikada kaybolmasıdır. 35 ve 133 numaralı referanslardan dilimize uyarlanmıştır.

Hem LVC hem de NTG gruplarında eşiklerin benzer miktarda düştüğünü gözlemledik, ancak LVC grubunda eşik düşüş süresi NTG grubuna kıyasla anlamlı olarak daha kısaydı. Böylesine hızlı bir azalma ve düzelme büyük olasılıkla işlevsel bir nörobiyolojik değişikliğe işaret etmektedir. Nöroinflamatuvar genlerin ve yeni

sentezlenen proteinlerin ekspresyonundaki bir artış altta yatan etmenler olarak göz ardı edilemez, ancak mekanik allodinideki hızlı değişimi açıklamayacağı için bunların katkısı çok düşük bir ihtimaldir. Önceki bir çalışmada, intraplantar ve intraserebroventriküler LVC uygulaması von Frey filamentlerine karşı mekanik hassasiyeti değiştirmemiştir (35). Bu bulgu, doğrudan merkezi ve lokal bir etki mekanizmasından ziyade vasküler bir mekanizmaya işaret etmektedir. LVC de dahil olmak üzere tüm migren tetikleyici maddeler vazodilatör özelliklere sahip olduğu, mekanik olarak potasyum kanallarını açtığı bilinmekte ve bunun sonucu olarak muhtemelen CGRP sinyalini de tetiklediği düşünülmektedir (133, 143). LVC'in hedefi olan K_{ATP} subunit Kir6.1-knockout farelere NTG ve LVC enjekte edildiğinde mekanik allodini görülmemiştir (136). LVC ile indüklenen mekanik allodini, kemirgenlerde spesifik olmayan bir potasyum kanal blokörü olan glibenklamid ile tersine çevrilmiştir (144). Öte yandan, glibenklamidin, migren hastalarında baş ağrısı üzerine etkisiz olduğu gösterilmiştir (145). Bu tutarsızlık, potasyum kanal morfolojisindeki türler arası farklılıklar ve/veya hayvan deneylerinde kullanılan daha yüksek ilaç dozları ile açıklanabilir (101). Levkromakalimin SUR2B alt ünitesine bağlandığı literatürdeki moleküler çalışmalar ile gösterilmiştir (146). SUR2B alt ünitesi hem trigeminal yolakta hem dural damar yatağında hem de mitokondri iç membranındaki ATP kapılı potasyum kanallarında eksprese edilir (147). Bu bağlamda düşünüldüğünde, glibenklamidin bağlanma bölgesinin (Kir 6.x) levkromakaliminkinden farklı olması bu iki alt ünitenin kanal fonksiyonunu farklı etkilemesinden dolayı glibenklamidin levkromakalimin etkisini tam olarak bloke edememesine sebep olmuş olabilir. Bu bulgular, yüksek oranda seçici, alt tipe ve alt üniteye özgü potasyum kanal blokörlerinin migren hastaları için yeni bir terapötik çözüm sağlayabileceğini akla getirmektedir.

Mekanik eşiklerdeki azalmanın yanında klinik olarak migren ataklarına yaygın biçimde eşlik eden semptomlar olan anksiyete ve fotofobiyi de sıçanlardaki karşılıkları olan anksiyete benzeri davranış ve ışıktan kaçma davranışını değerlendirdik. Akut NTG uygulamasının sıçanlarda anksiyete benzeri davranışlara ve ışıktan kaçmaya neden olduğu zaten bilinmektedir (130, 131, 148). Deneylerimizde, LVC enjekte edilen sıçanlar benzer şekilde anksiyete benzeri davranış ve ışıktan kaçma sergilemiştir. Sıçanlar doğal olarak ışıktan kaçma eğilimindedir, bu da anksiyete benzeri davranışları

ve ışığa karşı aşırı duyarlılığı deneysel olarak incelemeyi zorlaştırmaktadır. Işığın anksiyete benzeri davranışlar üzerindeki olası karıştırıcı etkilerini ortadan kaldırmak için, açık alan arena testi yapıldı ve ışıktan bağımsız anksiyete benzeri davranış ölçütleri olarak merkez bölgede geçirilen süreyi ve merkez bölgeye giriş sayısını kullanıldı (137). LVC ve NTG enjekte edilen sıçanlar merkez bölgede daha az zaman geçirdiler ve merkez bölgeye giriş sayısı da daha düşük olarak bulundu. Bu bulgular yükseltilmiş artı testimizde saptadığımız anksiyete artışı bulgularımızı doğruladı. Sonuçlarımız, LVC'nin migrenle ilişkili anksiyete ve fotofobiyi etkili bir şekilde modelleyebildiğini açıkça göstermektedir ki bu da modelimizi daha da geçerli kılmaktadır.

5.2. NTG veya LVC ile İndüklenen Akut Migren Modellerinin Elektrofizyolojik Karakterizasyonu

Kortikal yayılan depolarizasyon dalgası yaygın olarak migren aurasının prelinik korelasyonu olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda LVC'nin KYD'yi başlatıp başlatamayacağı veya KCl ile indüklenen KYD üzerinde herhangi bir kolaylaştırıcı etkisi olup olmadığını araştırıldı. Bu bağlamda LVC'nin etkileri, klinik çalışmalarda aurayı ancak nadiren olarak tetikleyebilen NTG ile karşılaştırıldı. Çalışmalarımızda ne LVC ne de NTG KYD'yi indükledi. Öte yandan, NTG KYD yatkınlığını artırırken, LVC yayılma başarısızlığı oranlarını artırdı. Yayılma başarısızlığı basitçe bir KYD dalgasının belirli bir noktanın ötesine yayılamaması olarak tanımlanabilir. Migren hastalarının aurası, göç eden semptomlarla karakterize ve yayılan bir KYD dalgasının sonucu olduğu varsayılan bir fenomendir. Klinikte migren hastalarında belirgin bir auralı migren indükleyicisi olan LVC'nin hayvanlarda KYD dalgası yayılımını azaltması, KYD ile aura bağlantısının doğruluğunu sorgulatmaktadır. Bizim sonuçlarımızla çelişir gibi görünen önceki bir çalışmada NTG'nin KYD eşiğini değiştirmediği görülmüştür (114). Ancak bizim çalışmamızda deneyler yukarıda bahsedilen çalışmada olduğu gibi ilk saat yerine mekanik eşikler minimum seviyede iken (2. saat) gerçekleştirildi. Bu nedenle, zaman noktalarındaki farklılık bu iki çalışmanın sonuçları arasındaki farklılığı açıklayabilir. Sonuçlarımız, LVC'nin hızı değiştirmeden KYD duyarlılığını anlamlı fark olmaksızın hafifçe artırdığını göstermektedir. Teorik olarak, potasyum kanal açıcıların artan hücre dışı potasyum iyonları yoluyla KYD'yi indüklediği ve/veya kolaylaştırdığı öne

sürülmektedir (28, 62). Çalışmamızda, akut LVC'nin KYD'yi indüklemeyen ve/veya kolaylaştırmadan doğrudan veya dolaylı pro-nosiseptif etki ile migren benzeri bir fenotip oluşturduğu gösterildi. Kısacası, sonuçlarımızdan akut LVC tarafından tetiklenen baş ağrısı fenotipi KYD'den bağımsız bir fenomen olduğu sonucu çıkarılabilir. Bu çıkarım, NTG'nin genellikle aura tetiklemeyen ancak migren ağrısı tetikleyebilen bir madde olarak kabul edilmesine rağmen, her iki migren tetikleyici maddenin (LVC ve NTG) KYD üzerindeki etkilerinin benzer olmasıyla da desteklenmiştir.

Çok sayıda çalışmada, migren hastalarından ölçülen somatosensoryel uyarılmış potansiyeller sağlıklı bireylerden farklı bulunmuştur. Bu da migren hastalarının kusurlu duyuşsal kapılanmaya sahip olduğuna işaret etmektedir (149). Bu çalışma, NTG, LVC ve KYD ile indüklenen migren modellerinde somatosensoryel uyarılmış potansiyelleri inceleyen ilk çalışmadır. Deneylerimiz sonucunda amplitüdlerde veya tepe noktasına kadar olan latanslarda anlamlı farklılık görülmedi. Uyarılmış potansiyel latansları, farklı kemirgen ve insan modellerinde nöronal hipereksitabilitiyi değerlendirmek için bir araç olarak kullanılmaktadır (150, 151). Daha kısa latansların, bir nöron popülasyonunun daha hızlı ve eşzamanlı ateşleme olasılığının arttığını gösterdiği düşünülmektedir. Nöronal uyarılabilirlik dinlenim membran potansiyeline, ateşleme eşğine, eksitatör inputa ve inhibitör tonusa bağlıdır. Nitekim, artmış glutamaterjik uyarımın bir kortikal hasar modelinde vizüel uyarılmış potansiyel latanslarını kısalttığı gösterilmiştir (150). Bizim çalışmamızda da KYD sonrasında LVC ve NTG gruplarında latanslarda uzama tespit edilmiştir. KYD'nin eksitatör/inhibitör dengede inhibisyona doğru bir kaymaya neden olduğu ve presinaptik glutamat salıverilme olasılığını azalttığı bilinmektedir (152). NTG ve LVC uygulanan sıçanlarda SSEP latanslarındaki bu uzamaya KYD'ye bağlı olarak artan inhibisyon ve azalan eksitasyonun neden olmuş olabileceği düşünülebilir.

Migren aurası fMRI çalışmalarında gösterildiği üzere artmış kortikal aktivite ile ilişkilidir (74, 153). Kortikal nöronal aktivite, belirli frekans bantlarındaki spesifik osilasyonlar şeklinde güç spektrum yoğunluğu ile ölçülebilir. Vinogradova ve ekibinin çalışmasında prelinik bir auralı migren modelinde güç spektrum yoğunluğunda azalma raporlanmıştır (154). Deneylerimiz, LVC'nin KYD sonrası CTRL ve NTG gruplarından farklı bir güç spektrumu yoğunluğu profiline sahip olduğunu ortaya

koymuştur. LVC enjekte edilen hayvanlarda KYD'yi takiben daha zayıf kortikal aktivite, KYD indüksiyonundan sonra düzelememeye işaret etmektedir. Bu durum, hücre içi potasyumun dinlenim membran potansiyelinin kurulmasında önemli bir rol oynadığı düşünüldüğünde, LVC'nin potasyum kanalı açıcı özellikleriyle açıklanabilir. Potasyum kanallarının daha fazla açılması iyonik dengenin yeniden tesis edilmesini engellemiş ve böylece LVC uygulanmış sıçanlarda KYD sonrası düzelleme süresini uzatmış olabilir.

5.3. NTG veya LVC ile İndüklenen Akut Migren Modellerinin Moleküler Karakterizasyonu

Elektrofizyoloji deneylerinde LVC'nin kolaylaştırıcı etkisinin görülmemesi, migren aurasının klinikte "uyanık hastaların" bir fenomeni olması nedeniyle anestezinin etkilerine bağlanabilir. Önceki çalışmalarda, anestezinin KYD'nin talamik retiküler nükleus gibi subkortikal yapılara yayılımını engelleyebileceğini gösterilmiştir (155-157). Bu bağlamda, anestezi korteks-subkorteks ilişkisini bozmuş ve LVC'nin olası etkilerini maskeleyebilir. KYD'nin kortekste çok belirgin şekilde c-fos ifadesine yol açtığı bilinmektedir (158). Anestezinin etkilerini dışlamak için, uyanık sıçanlara LVC enjekte edildi ve olası c-fos ifadesinin oluşmasına izin vermek için 3 saat sonra kortekslerini toplandı. Deneylerimizde LVC, uyanık ve serbestçe hareket eden sıçanların kortekslerinde c-fos ekspresyonunu indüklemedi. Bu sonuçlar, akut LVC enjeksiyonunun uyanık ve serbestçe hareket eden sıçanlarda bir KYD aktivitesine neden olmadığını göstermiştir.

Akut LVC veya NTG enjeksiyonunun direkt bir nöroinflamatuvar yanıtı sebep olarak doğrudan kortikal kan-beyin bariyeri permeabilitesini artırıp artırmadığı veya LVC'nin KYD aracılı biçimde muhtemel bir kan beyin bariyeri geçirgenliği artışının migren benzeri fenotipe eşlik edip etmediğini araştırmak için Evans Mavisini kullanıldı. LVC veya NTG enjekte edilen sıçanlarda EM boyasının kortekse geçemediği tespit edildi. Bu da kortekste vasküler geçirgenlikte bir artış olmadığına işaret etmektedir. LVC ile indüklenen akut migren modelinin kortikal kan-beyin bariyerinin bozulmasını içermediği sonucuna varılabilir. Verilerimiz, akut migren atakları sırasında kan beyin bariyerinin sağlam kaldığı yönündeki, insanlarda yapılan görüntüleme çalışmalarıyla uyumludur (159-161).

5.4. Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışmadaki kısıtlılıklardan biri elektrofizyolojik deneyler sırasında anestezi kullanılmasıdır. Yukarıda belirtildiği gibi, anestezinin kendisi nöronal uyarılabilirliği değiştirmekte ve beynin farklı bölümleri arasındaki iletişime müdahale etmektedir. Dolayısıyla, deneysel müdahalelerimizin etkilerini maskeleyebilir. Migren kadınlarda daha sık görülen bir hastalık olduğu için deneylerimizde dişi sıçanların kullanılmamış olması da bir başka kısıtlılıktır. Buna karşın, çalışmamızın önceki araştırmalarla karşılaştırılabilir olması adına deneylerimizde yalnızca erkek sıçanlar kullanıldı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1) Akut intraperitoneal LVC enjeksiyonu belirgin bir periorbital ve arka pati allodinisine sebep oldu. Bu allodinik zaman periyodu enjeksiyonu takiben 30.dakikada başladı, 60.dakikada allodinik maksimuma ulaşmış ve 120.dakikada tamamen kayboldu.

2) Akut intraperitoneal LVC enjekte edilen sıçanlar yükseltilmiş artı testinin kapalı kollarında daha çok zaman harcadı, karanlık-aydınlık kutu testinde karanlık tarafta daha çok zaman geçirdi ve açık alan arena testinde merkez bölgede daha az bulundu. Tüm bu bulgular, LVC uygulamasının sıçanlarda anksiyete benzeri davranışa ve ışıktan kaçınma davranışına sebep olduğunu göstermektedir.

3) Akut LVC enjeksiyonu, migren benzeri fenotip indüklediği sırada potasyum klorür ile indüklenen KYD eşiklerini değiştirmede ve KYD frekansını artırmadı. LVC uyanık hayvanlarda kortikal c-fos ifadesini de artırmadı. Bu iki bulgu da LVC'nin sıçanlarda indüklediği migren benzeri davranışların KYD'den bağımsız olduğunu işaret etmektedir.

4) Akut LVC enjeksiyonu, somatosensoryel uyarılmış potansiyellerde KYD sonrasında latanslarda uzamaya ve güç spektrumunda yavaşlamaya sebep oldu.

5) Akut LVC uygulaması kortikal kan-beyin bariyeri geçirgenliğinde artışa sebep olmadı.

İleride yapılacak çalışmalarda, dişi sıçanlarla bu çalışmanın tekrarlamasına ve etki bölgesi ve mekanizmasını daha da detaylandırmak için farklı ilaç uygulama yollarını kullanmaya odaklanmalıdır. İlaveten, 5-HT1B/1D agonistleri, 5-HT1F agonistleri ve CGRP antagonistleri gibi standart akut migren atak tedavileri kullanılarak terapötik geçerlilik de test edilmelidir (125, 127, 162). İlaveten, tüm migren indükleyici maddelerin mekanizması düşünöldüğünde hepsinin ATP kapılı potasyum kanallarını etkilediği görölmektedir. Bu nedenle, ATP kapılı potasyum kanallarının tam olarak hangi alt tipinin etkilendiği ileriki çalışmalarda ortaya konarak yeni bir ilaç hedefi tanımlanabilir. Ayrıca, levkromakalim ile indüklenen migren baş ağrısını daha iyi anlamak için büyük örneklemlilik klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Steiner TJ, Stovner LJ. Global epidemiology of migraine and its implications for public health and health policy. *Nat Rev Neurol*. 2023;19(2):109-17.
2. Kunkel RS. Clinical manifestations of migraine. *Clin Cornerstone*. 2001;4(3):18-25.
3. Lucas C. Migraine with aura. *Rev Neurol (Paris)*. 2021;177(7):779-84.
4. Viana M, Tronvik EA, Do TP, Zecca C, Hougaard A. Clinical features of visual migraine aura: a systematic review. *J Headache Pain*. 2019;20(1):64.
5. Russell MB, Olesen J. A nosographic analysis of the migraine aura in a general population. *Brain*. 1996;119 (Pt 2):355-61.
6. Viana M, Sances G, Linde M, Ghiotto N, Guaschino E, Allena M, et al. Clinical features of migraine aura: results from a prospective diary-aided study. *Cephalalgia*. 2017;37(10):979-89.
7. Yamani N, Chalmer MA, Olesen J. Migraine with brainstem aura: defining the core syndrome. *Brain*. 2019;142(12):3868-75.
8. Katsarava Z, Buse DC, Manack AN, Lipton RB. Defining the differences between episodic migraine and chronic migraine. *Curr Pain Headache Rep*. 2012;16(1):86-92.
9. Ashina M, Hansen JM, Do TP, Melo-Carrillo A, Burstein R, Moskowitz MA. Migraine and the trigeminovascular system-40 years and counting. *Lancet Neurol*. 2019;18(8):795-804.
10. Goadsby PJ, Holland PR, Martins-Oliveira M, Hoffmann J, Schankin C, Akerman S. Pathophysiology of Migraine: A Disorder of Sensory Processing. *Physiol Rev*. 2017;97(2):553-622.
11. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med*. 2002;8(2):136-42.
12. 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.
13. Welch KM, D'Andrea G, Tepley N, Barkley G, Ramadan NM. The concept of migraine as a state of central neuronal hyperexcitability. *Neurol Clin*. 1990;8(4):817-28.
14. Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, et al. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell*. 1996;87(3):543-52.
15. De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L, et al. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet*. 2003;33(2):192-6.

16. Marconi R, De Fusco M, Aridon P, Plewnia K, Rossi M, Carapelli S, et al. Familial hemiplegic migraine type 2 is linked to 0.9Mb region on chromosome 1q23. *Ann Neurol*. 2003;53(3):376-81.
17. Jen JC, Wan J, Palos TP, Howard BD, Baloh RW. Mutation in the glutamate transporter EAAT1 causes episodic ataxia, hemiplegia, and seizures. *Neurology*. 2005;65(4):529-34.
18. Zielman R, Wijnen JP, Webb A, Onderwater GLJ, Ronen I, Ferrari MD, et al. Cortical glutamate in migraine. *Brain*. 2017;140(7):1859-71.
19. Coppola G, De Pasqua V, Pierelli F, Schoenen J. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on somatosensory evoked potentials and high frequency oscillations in migraine. *Cephalalgia*. 2012;32(9):700-9.
20. Aurora SK, Wilkinson F. The brain is hyperexcitable in migraine. *Cephalalgia*. 2007;27(12):1442-53.
21. Hsiao FJ, Cheng CH, Chen WT, Lin YY. Neural correlates of somatosensory paired-pulse suppression: a MEG study using distributed source modeling and dynamic spectral power analysis. *Neuroimage*. 2013;72:133-42.
22. Coppola G, Di Lenola D, Abagnale C, Ferrandes F, Sebastianelli G, Casillo F, et al. Short-latency afferent inhibition and somato-sensory evoked potentials during the migraine cycle: surrogate markers of a cycling cholinergic thalamo-cortical drive? *J Headache Pain*. 2020;21(1):34.
23. Ashina M, Hansen JM. Pharmacological migraine provocation: a human model of migraine. *Handb Clin Neurol*. 2010;97:773-9.
24. Ashina H, Schytz HW, Ashina M. CGRP in Human Models of Migraine. *Handb Exp Pharmacol*. 2019;255:109-20.
25. Ashina H, Guo S, Vollesen ALH, Ashina M. PACAP38 in human models of primary headaches. *J Headache Pain*. 2017;18(1):110.
26. Sureda-Gibert P, Romero-Reyes M, Akerman S. Nitroglycerin as a model of migraine: Clinical and preclinical review. *Neurobiol Pain*. 2022;12:100105.
27. Birk S, Kruuse C, Petersen KA, Tfelt-Hansen P, Olesen J. The headache-inducing effect of cilostazol in human volunteers. *Cephalalgia*. 2006;26(11):1304-9.
28. Al-Karagholi MA, Ghanizada H, Nielsen CAW, Hougaard A, Ashina M. Opening of ATP sensitive potassium channels causes migraine attacks with aura. *Brain*. 2021;144(8):2322-32.
29. Raffaelli B, Do TP, Chaudhry BA, Amin FM, Ashina H, Snellman J, et al. Activation of ATP-sensitive potassium channels triggers migraine attacks independent of calcitonin gene-related peptide receptors: a randomized placebo-controlled trial. *Cephalalgia*. 2024;44(1):3331024231222916.
30. Babenko AP, Aguilar-Bryan L, Bryan J. A view of sur/KIR6.X, KATP channels. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:667-87.
31. Syed AU, Koide M, Brayden JE, Wellman GC. Tonic regulation of middle meningeal artery diameter by ATP-sensitive potassium channels. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019;39(4):670-9.

32. Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science*. 1989;245(4914):177-80.
33. Miki T, Nagashima K, Seino S. The structure and function of the ATP-sensitive K⁺ channel in insulin-secreting pancreatic beta-cells. *J Mol Endocrinol*. 1999;22(2):113-23.
34. Sung MW, Yang Z, Driggers CM, Patton BL, Mostofian B, Russo JD, et al. Vascular K(ATP) channel structural dynamics reveal regulatory mechanism by Mg-nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(44).
35. Christensen SL, Rasmussen RH, Cour S, Ernstsens C, Hansen TF, Kogelman LJ, et al. Smooth muscle ATP-sensitive potassium channels mediate migraine-relevant hypersensitivity in mouse models. *Cephalalgia*. 2022;42(2):93-107.
36. Duarte ID, dos Santos IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol*. 1992;217(2-3):225-7.
37. Ashina M. Migraine. *N Engl J Med*. 2020;383(19):1866-76.
38. Tzabazis A, Kori S, Mechanic J, Miller J, Pascual C, Manering N, et al. Oxytocin and Migraine Headache. *Headache*. 2017;57 Suppl 2:64-75.
39. Chen H, Tang X, Li J, Hu B, Yang W, Zhan M, et al. IL-17 crosses the blood-brain barrier to trigger neuroinflammation: a novel mechanism in nitroglycerin-induced chronic migraine. *J Headache Pain*. 2022;23(1):1.
40. Headache Classification Committee of the International Headache S. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia*. 2013;33(9):629-808.
41. Lipton RB, Scher AI, Kolodner K, Liberman J, Steiner TJ, Stewart WF. Migraine in the United States: epidemiology and patterns of health care use. *Neurology*. 2002;58(6):885-94.
42. Silvestro M, Tessitore A, Di Nardo F, Scotto di Clemente F, Trojsi F, Cirillo M, et al. Functional connectivity changes in complex migraine aura: beyond the visual network. *Eur J Neurol*. 2022;29(1):295-304.
43. Bolay H, Vuralli D, Goadsby PJ. Aura and Head pain: relationship and gaps in the translational models. *J Headache Pain*. 2019;20(1):94.
44. Hansen JM, Baca SM, Vanvalkenburgh P, Charles A. Distinctive anatomical and physiological features of migraine aura revealed by 18 years of recording. *Brain*. 2013;136(Pt 12):3589-95.
45. Schott GD. Exploring the visual hallucinations of migraine aura: the tacit contribution of illustration. *Brain*. 2007;130(Pt 6):1690-703.
46. Dahlem MA, Muller SC. Migraine aura dynamics after reverse retinotopic mapping of weak excitation waves in the primary visual cortex. *Biol Cybern*. 2003;88(6):419-24.
47. Steiner TJ, Stovner LJ, Jensen R, Uluduz D, Katsarava Z, Lifting The Burden: the Global Campaign against H. Migraine remains second among the world's causes

of disability, and first among young women: findings from GBD2019. *J Headache Pain*. 2020;21(1):137.

48. Collaborators GBDH. Global, regional, and national burden of migraine and tension-type headache, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2018;17(11):954-76.

49. Steiner TJ, Stovner LJ, Katsarava Z, Lainez JM, Lampl C, Lanteri-Minet M, et al. The impact of headache in Europe: principal results of the Eurolight project. *J Headache Pain*. 2014;15(1):31.

50. Lipton RB, Bigal ME, Diamond M, Freitag F, Reed ML, Stewart WF, et al. Migraine prevalence, disease burden, and the need for preventive therapy. *Neurology*. 2007;68(5):343-9.

51. Buse DC, Manack AN, Fanning KM, Serrano D, Reed ML, Turkel CC, et al. Chronic migraine prevalence, disability, and sociodemographic factors: results from the American Migraine Prevalence and Prevention Study. *Headache*. 2012;52(10):1456-70.

52. Stovner L, Hagen K, Jensen R, Katsarava Z, Lipton R, Scher A, et al. The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide. *Cephalalgia*. 2007;27(3):193-210.

53. Wober C, Wober-Bingol C, Uluduz D, Aslan TS, Uygunoglu U, Tufekci A, et al. Undifferentiated headache: broadening the approach to headache in children and adolescents, with supporting evidence from a nationwide school-based cross-sectional survey in Turkey. *J Headache Pain*. 2018;19(1):18.

54. Bigal ME, Lipton RB, Winner P, Reed ML, Diamond S, Stewart WF, et al. Migraine in adolescents: association with socioeconomic status and family history. *Neurology*. 2007;69(1):16-25.

55. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia*. 2013;33(9):629-808.

56. Demarquay G, Moisset X, Lanteri-Minet M, de Gaalon S, Donnet A, Giraud P, et al. Revised guidelines of the French Headache Society for the diagnosis and management of migraine in adults. Part 1: Diagnosis and assessment. *Rev Neurol (Paris)*. 2021;177(7):725-33.

57. Ferrari MD, Goadsby PJ, Burstein R, Kurth T, Ayata C, Charles A, et al. Migraine. *Nat Rev Dis Primers*. 2022;8(1):2.

58. Nosedá R, Burstein R. Migraine pathophysiology: anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, CSD, sensitization and modulation of pain. *Pain*. 2013;154 Suppl 1.

59. 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.

60. Goadsby PJ, Holland PR. An Update: Pathophysiology of Migraine. *Neurol Clin*. 2019;37(4):651-71.

61. Charles AC, Baca SM. Cortical spreading depression and migraine. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(11):637-44.

62. Ayata C, Lauritzen M. Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiol Rev.* 2015;95(3):953-93.
63. Dreier JP, Fabricius M, Ayata C, Sakowitz OW, Shuttleworth CW, Dohmen C, et al. Recording, analysis, and interpretation of spreading depolarizations in neurointensive care: Review and recommendations of the COSBID research group. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(5):1595-625.
64. Vuralli D, Karatas H, Yemisci M, Bolay H. Updated review on the link between cortical spreading depression and headache disorders. *Expert Rev Neurother.* 2021;21(10):1069-84.
65. Pietrobon D, Moskowitz MA. Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(6):379-93.
66. Hall A. c-FOS: Molecular biology & detection for analysis of neuronal activity. 21.09.2020.
67. Doganay Aydin H, Vuralli D, Akcali DT, Bolay H. Metoclopramide inhibits trigeminovascular activation:evidence for effective acute attack treatment in migraine. *Turk J Med Sci.* 2017;47(1):343-7.
68. Levy D. Endogenous mechanisms underlying the activation and sensitization of meningeal nociceptors: the role of immuno-vascular interactions and cortical spreading depression. *Curr Pain Headache Rep.* 2012;16(3):270-7.
69. Zhao J, Levy D. Dissociation between CSD-Evoked Metabolic Perturbations and Meningeal Afferent Activation and Sensitization: Implications for Mechanisms of Migraine Headache Onset. *J Neurosci.* 2018;38(22):5053-66.
70. Zhang X, Levy D, Kainz V, Nosedá R, Jakubowski M, Burstein R. Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression. *Ann Neurol.* 2011;69(5):855-65.
71. Zhang X, Levy D, Nosedá R, Kainz V, Jakubowski M, Burstein R. Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura. *J Neurosci.* 2010;30(26):8807-14.
72. Nosedá R, Constandil L, Bourgeois L, Chalus M, Villanueva L. Changes of meningeal excitability mediated by corticotrigeminal networks: a link for the endogenous modulation of migraine pain. *J Neurosci.* 2010;30(43):14420-9.
73. Schain AJ, Melo-Carrillo A, Borsook D, Grutzendler J, Strassman AM, Burstein R. Activation of pial and dural macrophages and dendritic cells by cortical spreading depression. *Ann Neurol.* 2018;83(3):508-21.
74. 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.
75. Arngrim N, Hougaard A, Ahmadi K, Vestergaard MB, Schytz HW, Amin FM, et al. Heterogenous migraine aura symptoms correlate with visual cortex functional magnetic resonance imaging responses. *Ann Neurol.* 2017;82(6):925-39.

76. Yokota C, Kuge Y, Hasegawa Y, Tagaya M, Abumiya T, Ejima N, et al. Unique profile of spreading depression in a primate model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22(7):835-42.
77. Bolay H. Thalamocortical network interruption: A fresh view for migraine symptoms. *Turk J Med Sci.* 2020;50(SI-2):1651-4.
78. Queiroz LP, Friedman DI, Rapoport AM, Purdy RA. Characteristics of migraine visual aura in Southern Brazil and Northern USA. *Cephalalgia.* 2011;31(16):1652-8.
79. Smith MI, Read SJ, Chan WN, Thompson M, Hunter AJ, Upton N, et al. Repetitive cortical spreading depression in a gyrencephalic feline brain: inhibition by the novel benzoylamino-benzopyran SB-220453. *Cephalalgia.* 2000;20(6):546-53.
80. Guedes RC, Amancio-Dos-Santos A, Manhaes-De-Castro R, Costa-Cruz RR. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Nutr Neurosci.* 2002;5(2):115-23.
81. Hoffmann U, Dilekoz E, Kudo C, Ayata C. Gabapentin suppresses cortical spreading depression susceptibility. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(9):1588-92.
82. Marlowe N. Somatosensory evoked potentials and headache: a further examination of the central theory. *J Psychosom Res.* 1995;39(2):119-31.
83. Zhu B, Coppola G, Shoaran M. Migraine classification using somatosensory evoked potentials. *Cephalalgia.* 2019;39(9):1143-55.
84. Christiansen I, Thomsen LL, Daugaard D, Ulrich V, Olesen J. Glyceryl trinitrate induces attacks of migraine without aura in sufferers of migraine with aura. *Cephalalgia.* 1999;19(7):660-7; discussion 26.
85. Hansen JM, Hauge AW, Olesen J, Ashina M. Calcitonin gene-related peptide triggers migraine-like attacks in patients with migraine with aura. *Cephalalgia.* 2010;30(10):1179-86.
86. Butt JH, Rostrup E, Hansen AS, Lambertsen KL, Kruuse C. Induction of migraine-like headache, but not aura, by cilostazol in patients with migraine with aura. *Brain.* 2018;141(10):2943-51.
87. Karsan N, Bose PR, Thompson C, Newman J, Goadsby PJ. Headache and non-headache symptoms provoked by nitroglycerin in migraineurs: A human pharmacological triggering study. *Cephalalgia.* 2020;40(8):828-41.
88. Schytz HW, Birk S, Wienecke T, Kruuse C, Olesen J, Ashina M. PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain.* 2009;132(Pt 1):16-25.
89. Thomsen LL, Kruuse C, Iversen HK, Olesen J. A nitric oxide donor (nitroglycerin) triggers genuine migraine attacks. *Eur J Neurol.* 1994;1(1):73-80.
90. Al-Hassany L, Boucherie DM, Creaney H, van Drie RWA, Farham F, Favaretto S, et al. Future targets for migraine treatment beyond CGRP. *J Headache Pain.* 2023;24(1):76.
91. Afridi KS, Kaube H, Goadsby JP. Glyceryl trinitrate triggers premonitory symptoms in migraineurs. *Pain.* 2004;110(3):675-80.

92. Sances G, Tassorelli C, Pucci E, Ghiotto N, Sandrini G, Nappi G. Reliability of the nitroglycerin provocative test in the diagnosis of neurovascular headaches. *Cephalalgia*. 2004;24(2):110-9.
93. Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog Biophys Mol Biol*. 2003;81(2):133-76.
94. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*. 2010;90(1):291-366.
95. Al-Karagholi MA. Involvement of Potassium Channel Signalling in Migraine Pathophysiology. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(3).
96. Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y, et al. Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. *J Physiol*. 1997;499 (Pt 3)(Pt 3):715-20.
97. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1995;268(4 Pt 1):C799-822.
98. Murphy ME, Brayden JE. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol*. 1995;486 (Pt 1)(Pt 1):47-58.
99. Aziz Q, Li Y, Anderson N, Ojake L, Tsisanova E, Tinker A. Molecular and functional characterization of the endothelial ATP-sensitive potassium channel. *J Biol Chem*. 2017;292(43):17587-97.
100. Shi Y, Chen X, Wu Z, Shi W, Yang Y, Cui N, et al. cAMP-dependent protein kinase phosphorylation produces interdomain movement in SUR2B leading to activation of the vascular KATP channel. *J Biol Chem*. 2008;283(12):7523-30.
101. Clement A, Guo S, Jansen-Olesen I, Christensen SL. ATP-Sensitive Potassium Channels in Migraine: Translational Findings and Therapeutic Potential. *Cells*. 2022;11(15).
102. Choma K, Bednarczyk P, Koszela-Piotrowska I, Kulawiak B, Kudin A, Kunz WS, et al. Single channel studies of the ATP-regulated potassium channel in brain mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. 2009;41(4):323-34.
103. Lacza Z, Snipes JA, Miller AW, Szabo C, Grover G, Busija DW. Heart mitochondria contain functional ATP-dependent K⁺ channels. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35(11):1339-47.
104. Ardehali H, Chen Z, Ko Y, Mejia-Alvarez R, Marban E. Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(32):11880-5.
105. Augustynek B, Kunz WS, Szewczyk A. Guide to the Pharmacology of Mitochondrial Potassium Channels. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;240:103-27.
106. Gogelein H, Ruetten H, Albus U, Englert HC, Busch AE. Effects of the cardioselective KATP channel blocker HMR 1098 on cardiac function in isolated perfused working rat hearts and in anesthetized rats during ischemia and reperfusion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2001;364(1):33-41.

107. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA. The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem*. 1996;271(15):8796-9.
108. Andreou AP, Summ O, Charbit AR, Romero-Reyes M, Goadsby PJ. Animal models of headache: from bedside to bench and back to bedside. *Expert Rev Neurother*. 2010;10(3):389-411.
109. Oshinsky ML, Gomomchareonsiri S. Episodic dural stimulation in awake rats: a model for recurrent headache. *Headache*. 2007;47(7):1026-36.
110. Melo-Carrillo A, Lopez-Avila A. A chronic animal model of migraine, induced by repeated meningeal nociception, characterized by a behavioral and pharmacological approach. *Cephalalgia*. 2013;33(13):1096-105.
111. Zhang M, Liu Y, Zhao M, Tang W, Wang X, Dong Z, et al. Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine. *J Headache Pain*. 2017;18(1):27.
112. Stucky NL, Gregory E, Winter MK, He YY, Hamilton ES, McCarson KE, et al. Sex differences in behavior and expression of CGRP-related genes in a rodent model of chronic migraine. *Headache*. 2011;51(5):674-92.
113. Tipton AF, Tarash I, McGuire B, Charles A, Pradhan AA. The effects of acute and preventive migraine therapies in a mouse model of chronic migraine. *Cephalalgia*. 2016;36(11):1048-56.
114. 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.
115. Oshinsky ML, Sanghvi MM, Maxwell CR, Gonzalez D, Spangenberg RJ, Cooper M, et al. Spontaneous trigeminal allodynia in rats: a model of primary headache. *Headache*. 2012;52(9):1336-49.
116. Leo L, Gherardini L, Barone V, De Fusco M, Pietrobon D, Pizzorusso T, et al. Increased susceptibility to cortical spreading depression in the mouse model of familial hemiplegic migraine type 2. *PLoS Genet*. 2011;7(6):e1002129.
117. Chanda ML, Tuttle AH, Baran I, Atlin C, Guindi D, Hathaway G, et al. Behavioral evidence for photophobia and stress-related ipsilateral head pain in transgenic *Cacna1a* mutant mice. *Pain*. 2013;154(8):1254-62.
118. 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.
119. Bogdanov V, Chauvel V, Multon S, Makarchuk M, Schoenen J. Preventive antimigraine drugs differentially affect kel-induced cortical spreading depression in rat. *Cephalalgia Int J Headache*. 2009;29:131.
120. Olesen J, Burstein R, Ashina M, Tfelt-Hansen P. Origin of pain in migraine: evidence for peripheral sensitisation. *Lancet Neurol*. 2009;8(7):679-90.
121. Bogduk N. Anatomy and physiology of headache. *Biomed Pharmacother*. 1995;49(10):435-45.
122. Munro G, Jansen-Olesen I, Olesen J. Animal models of pain and migraine in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2017;22(7):1103-11.

123. Boyer N, Dallel R, Artola A, Monconduit L. General trigeminospinal central sensitization and impaired descending pain inhibitory controls contribute to migraine progression. *Pain*. 2014;155(7):1196-205.
124. Markovics A, Kormos V, Gaszner B, Lashgarara A, Szoke E, Sandor K, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol Dis*. 2012;45(1):633-44.
125. Akerman S, Romero-Reyes M, Karsan N, Bose P, Hoffmann JR, Holland PR, et al. Therapeutic targeting of nitroglycerin-mediated trigeminovascular neuronal hypersensitivity predicts clinical outcomes of migraine abortives. *Pain*. 2021;162(5):1567-77.
126. Farkas B, Kardos P, Orosz S, Tarnawa I, Cseko C, Levay G, et al. Predictive validity of endpoints used in electrophysiological modelling of migraine in the trigeminovascular system. *Brain Res*. 2015;1625:287-300.
127. 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.
128. Burstein R, Jakubowski M, Garcia-Nicas E, Kainz V, Bajwa Z, Hargreaves R, et al. Thalamic sensitization transforms localized pain into widespread allodynia. *Ann Neurol*. 2010;68(1):81-91.
129. Farajdokht F, Babri S, Karimi P, Mohaddes G. Ghrelin attenuates hyperalgesia and light aversion-induced by nitroglycerin in male rats. *Neurosci Lett*. 2016;630:30-7.
130. Greco R, Demartini C, Zanaboni A, Casini I, De Icco R, Reggiani A, et al. Characterization of the peripheral FAAH inhibitor, URB937, in animal models of acute and chronic migraine. *Neurobiol Dis*. 2021;147:105157.
131. Gerasimova E, Yakovleva O, Enikeev D, Bogatova K, Hermann A, Giniatullin R, et al. Hyperhomocysteinemia Increases Cortical Excitability and Aggravates Mechanical Hyperalgesia and Anxiety in a Nitroglycerine-Induced Migraine Model in Rats. *Biomolecules*. 2022;12(5).
132. Wei C, Kim B, McKemy DD. Transient receptor potential melastatin 8 is required for nitroglycerin- and calcitonin gene-related peptide-induced migraine-like pain behaviors in mice. *Pain*. 2022;163(12):2380-9.
133. Christensen SL, Rasmussen RH, Ernstsén C, La Cour S, David A, Chaker J, et al. CGRP-dependent signalling pathways involved in mouse models of GTN-cilostazol- and levromakalim-induced migraine. *Cephalalgia*. 2021;41(14):1413-26.
134. Christensen SL, Hansen RB, Storm MA, Olesen J, Hansen TF, Ossipov M, et al. Von Frey testing revisited: Provision of an online algorithm for improved accuracy of 50% thresholds. *Eur J Pain*. 2020;24(4):783-90.
135. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985;14(3):149-67.
136. Eilam D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. *Behav Brain Res*. 2003;142(1-2):53-62.

137. Wang M, Mason BN, Sowers LP, Kuburas A, Rea BJ, Russo AF. Investigating Migraine-Like Behavior Using Light Aversion in Mice. *J Vis Exp*. 2021(174).
138. Gerasimova E, Burkhanova G, Chernova K, Zakharov A, Enikeev D, Khaertdinov N, et al. Hyperhomocysteinemia increases susceptibility to cortical spreading depression associated with photophobia, mechanical allodynia, and anxiety in rats. *Behavioural Brain Research*. 2021;409:113324.
139. Goldim MPS, Della Giustina A, Petronilho F. Using Evans Blue Dye to Determine Blood-Brain Barrier Integrity in Rodents. *Curr Protoc Immunol*. 2019;126(1):e83.
140. Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:284.
141. 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.
142. Harriott AM, Strother LC, Vila-Pueyo M, Holland PR. Animal models of migraine and experimental techniques used to examine trigeminal sensory processing. *J Headache Pain*. 2019;20(1):91.
143. Ashina M, Terwindt GM, Al-Karagholi MA, de Boer I, Lee MJ, Hay DL, et al. Migraine: disease characterisation, biomarkers, and precision medicine. *Lancet*. 2021;397(10283):1496-504.
144. Christensen SL, Munro G, Petersen S, Shabir A, Jansen-Olesen I, Kristensen DM, et al. ATP sensitive potassium (K(ATP)) channel inhibition: A promising new drug target for migraine. *Cephalalgia*. 2020;40(7):650-64.
145. Al-Karagholi MA, Ghanizada H, Kokoti L, Paulsen JS, Hansen JM, Ashina M. Effect of K(ATP) channel blocker glibenclamide on levromakalim-induced headache. *Cephalalgia*. 2020;40(10):1045-54.
146. Ding D, Wu JX, Duan X, Ma S, Lai L, Chen L. Structural identification of vasodilator binding sites on the SUR2 subunit. *Nat Commun*. 2022;13(1):2675.
147. Ploug KB, Amrutkar DV, Baun M, Ramachandran R, Iversen A, Lund TM, et al. K(ATP) channel openers in the trigeminovascular system. *Cephalalgia*. 2012;32(1):55-65.
148. Demartini C, Greco R, Francavilla M, Zanaboni AM, Tassorelli C. Modelling migraine-related features in the nitroglycerin animal model: Trigeminal hyperalgesia is associated with affective status and motor behavior. *Physiol Behav*. 2022;256:113956.
149. Hsiao FJ, Chen WT, Wang YF, Chen SP, Lai KL, Liu HY, et al. Somatosensory Gating Responses Are Associated with Prognosis in Patients with Migraine. *Brain Sci*. 2021;11(2).
150. Xu S, Wagner HG, Joo F, Klatzo I, Cohn R. Reduced Latency of Visually Evoked Potentials Following Cortical Injury Indicates Secondary Glutamatergic Neuronal Excitation. In: Globus MYT, Dietrich WD, editors. *The Role of Neurotransmitters in Brain Injury*. Boston, MA: Springer US; 1992. p. 323-5.

151. Buchsbaum M, Henkin RI. Serum calcium concentration and the average evoked response. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1971;30(1):10-6.
152. Sawant-Pokam PM, Suryavanshi P, Mendez JM, Dudek FE, Brennan KC. Mechanisms of Neuronal Silencing After Cortical Spreading Depression. *Cereb Cortex*. 2017;27(2):1311-25.
153. Afridi S, Kaube H, Goadsby PJ. Occipital activation in glyceryl trinitrate induced migraine with visual aura. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(8):1158-60.
154. Vinogradova LV, Suleymanova EM, Medvedeva TM. Transient loss of interhemispheric functional connectivity following unilateral cortical spreading depression in awake rats. *Cephalalgia*. 2021;41(3):353-65.
155. Tepe N, Filiz A, Dilekoz E, Akcali D, Sara Y, Charles A, et al. The thalamic reticular nucleus is activated by cortical spreading depression in freely moving rats: prevention by acute valproate administration. *Eur J Neurosci*. 2015;41(1):120-8.
156. Eikermann-Haerter K, Yuzawa I, Qin T, Wang Y, Baek K, Kim YR, et al. Enhanced subcortical spreading depression in familial hemiplegic migraine type 1 mutant mice. *J Neurosci*. 2011;31(15):5755-63.
157. Fu X, Chen M, Lu J, Li P. Cortical spreading depression induces propagating activation of the thalamus ventral posteromedial nucleus in awake mice. *J Headache Pain*. 2022;23(1):15.
158. Akcali D, Sayin A, Sara Y, Bolay H. Does single cortical spreading depression elicit pain behaviour in freely moving rats? *Cephalalgia*. 2010;30(10):1195-206.
159. Hougaard A, Amin FM, Christensen CE, Younis S, Wolfram F, Cramer SP, et al. Increased brainstem perfusion, but no blood-brain barrier disruption, during attacks of migraine with aura. *Brain*. 2017;140(6):1633-42.
160. Schankin CJ, Maniyar FH, Seo Y, Kori S, Eller M, Chou DE, et al. Ictal lack of binding to brain parenchyma suggests integrity of the blood-brain barrier for 11C-dihydroergotamine during glyceryl trinitrate-induced migraine. *Brain*. 2016;139(Pt 7):1994-2001.
161. Amin FM, Hougaard A, Cramer SP, Christensen CE, Wolfram F, Larsson HBW, et al. Intact blood-brain barrier during spontaneous attacks of migraine without aura: a 3T DCE-MRI study. *Eur J Neurol*. 2017;24(9):1116-24.
162. Wu S, Ren X, Zhu C, Wang W, Zhang K, Li Z, et al. A c-Fos activation map in nitroglycerin/levcromakalim-induced models of migraine. *J Headache Pain*. 2022;23(1):128.

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
 Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 24

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 24.05.2022 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2022/05
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2021/82 (ONAY TARİHİ: 28.12.2021)
KARAR NUMARASI	: 2022/05- 11
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 28.12.2026
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Yıldırım SARA
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Dr. Berkay ALPAY (Doktora Tezi), Prof. Dr.
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: Yıldırım SARA, Dr. Barışcan ÇİMEN
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	:
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	:
SAYISI	: 132 Adet Wistar Sıçan (4-6 Aylık)

Kurulumuzun 28.12.2021 tarihli toplantısında 2021/82 dosya kayıt numarasıyla onaylanmış olan Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Yıldırım SARA'nın araştırma yürütücüsü olduğu "*Kortikal Yayılan Depresyon ve Kortikotalamik Aks İlişkisinin Sıçan Başağrısı Modellerinde İncelenmesi*" isimli proje için verilen 12.05.2022 tarihli araştırmacı revizyonu konulu dilekçe Kurulumuzun 24.05.2022 tarihli toplantısında görüşülmüş ve uygun bulunmuşur. Gazi Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hayrünnisa Belay BELEN ve Acıbadem Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Filiz ONAT araştırmacı ekibinden çıkarılmış ve kayıtlarımıza eklenmiştir.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu ve Dijital Makbuz

Tez Başlığı: Levkromakalimin sıçanlarda akut migren benzeri fenotip indükleyici etkisi ve kortikal yayılan depolarizasyon ile ilişkisi.

Öğrencinin Adı Soyadı: Berkay Alpay

Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı: 90

ORIGINALITY REPORT			
11%	9%	7%	3%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
1	thejournalofheadacheandpain.biomedcentral.com	2%	Internet Source
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080	1%	Internet Source
3	Submitted to Hacettepe University	1%	Student Paper
4	migraine-pain.org	1%	Internet Source
5	docplayer.biz.tr	1%	Internet Source
6	openaccess.hacettepe.edu.tr	1%	Internet Source
7	acikbilim.yok.gov.tr	<1%	Internet Source
8	Submitted to Adnan Menderes Üniversitesi	<1%	Student Paper
9	ihs-headache.org	<1%	Internet Source



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Berkay Alpay
 Assignment title: Berkay Alpay Doktora
 Submission title: Berkay Alpay - Doktora Tezi
 File name: Berkay_Alpay_-_Doktora_Tezi.docx
 File size: 32.53M
 Page count: 90
 Word count: 16,685
 Character count: 111,555
 Submission date: 04-Jul-2024 03:56PM (UTC+0300)
 Submission ID: 2401662345



EK-3: Tez Çalışmasından Üretilen Makale

Alpay et al. *The Journal of Headache and Pain* (2023) 24:93
<https://doi.org/10.1186/s10194-023-01627-9>

The Journal of Headache
and Pain

RESEARCH

Open Access



Levcromakalim provokes an acute rapid-onset migraine-like phenotype without inducing cortical spreading depolarization

Berkay Alpay^{1,2}, Bariscan Cimen^{1,2}, Elif Akaydin^{1,2}, Hayrunnisa Bolay^{2,3*} and Yildirim Sara^{1,2}

Abstract

Background Migraine headache attacks and accompanying sensory augmentation can be induced by several agents including levcromakalim (LVC), that is also capable of provoking aura-like symptoms in migraineurs. We investigated whether single LVC injection causes acute migraine-like phenotype in rats and induces/modulates cortical spreading depolarization (CSD), a rodent model of migraine aura.

Methods Wistar rats were administered LVC (1 mg/kg, i.p.) and compared to control (CTRL, vehicle, i.p.) and nitroglycerin (NTG, 10 mg/kg, i.p.) groups. Von Frey filaments were used to examine the periorbital and hind paw mechanical allodynia. Dark-light box (DLB), elevated plus maze (EPM), and open field arena (OFA) were used to evaluate light sensitivity and anxiety-related behaviors. The effects of LVC on CSD parameters, somatosensory evoked potentials, and baseline dural EEG (electroencephalography) were investigated. Possible CSD-induced c-fos expression was studied with Western Blot. Blood-brain barrier integrity in cortex was examined with Evans blue assay.

Results LVC and NTG administration robustly reduced periorbital mechanical thresholds in rats and induced anxiety-like behaviors and photophobia within 30 and 120 min, respectively. LVC induced migraine-like phenotype recovered in 2 h while NTG group did not fully recover before 4 h. Both LVC and NTG did not provoke DC (direct current) shift, EEG alterations or cortical c-fos expression characteristic to CSD. LVC did not induce de novo CSD and affect KCl (potassium chloride)-induced CSD parameters except for an increase in propagation failure. However, NTG significantly increased both CSD susceptibility and propagation failure. Somatosensory evoked potential (SSEP) configurations were not altered in both LVC and NTG groups, but SSEP latencies were prolonged after CSD. Acute LVC or NTG injection did not increase cortical BBB permeability.

Conclusions Single LVC administration induced the fastest manifestation and recovery of acute migraine-like phenotype which was not mediated by CSD waves in the cerebral cortex. We suppose LVC triggered rapid-onset migraine-like symptoms are probably related to functional alterations in the trigeminal nociceptive system and K⁺ channel opening properties of LVC. Understanding the neurobiological mechanisms of this nociceptive window, may provide a novel target in migraine treatment.

Keywords Levcromakalim, Migraine, Aura, Cortical spreading depolarization, Rat model, c-fos, Allodynia

*Correspondence:

Hayrunnisa Bolay

hbolay@gazi.edu.tr

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Introduction

Migraine is a primary headache disorder hampering the quality of life of millions worldwide [1]. Migraine attacks are characterized by unilateral pulsating frontotemporal moderate to severe pain lasting 4–72 h, and associated photophobia, phonophobia, nausea and vomiting. Approximately one fourth of migraineurs may experience aura symptoms mainly manifested in the visual sensory domain, preceding or accompanying the headache phase [2].

Several pharmacological agents, such as nitroglycerin (NTG), calcitonin G-related peptide (CGRP), cilostazol, are commonly used to provoke migraine headache attacks in migraine patients and seldomly, NTG was shown to trigger migraine aura [3–6]. However, in a clinical trial of Al-Karagholi et al., levromakalim (LVC), an ATP-gated potassium channel opener, robustly triggered migraine aura-like phenomena in migraineurs with aura [7]. Therefore, LVC is unique in terms of its strong aura-inducing properties when compared to other migraine-inducing substances.

Preclinical rodent models of migraine have been commonly used to develop new therapies to tackle migraine burden and to explain pathophysiological mechanisms behind the disorder. In that regard, a well-characterized and clinically relevant migraine model is NTG-induced migraine model. NTG was shown to induce headache-like phenotype in rodents, as evidenced by mechanical threshold reduction in the periorbital region as a correlate of cephalic allodynia and activation of trigeminal nucleus caudalis (TNC) [8, 9]. TNC activation can be also detected by electrophysiological recordings as enhanced firing of the neurons [10, 11]. This increased firing manifests phenotypically as mechanical allodynia [8, 12, 13]. Besides, intraperitoneal NTG injection can induce anxiety-like behaviors and light aversion in rats, imitating concurrent anxious/depressive behavior and photophobia seen in migraineurs [13]. It is currently unknown whether single LVC injection leads to an acute migraine-like phenotype in rats, including mechanical allodynia, anxiety-like behavior, and photophobia.

Canonically, a strong depolarization wave, called cortical spreading depolarization (CSD), is thought to underlie the migraine aura phenomenon. Thus, CSD is proposed to be the neurobiological correlate of migraine aura in rodent models as well as humans [14]. NTG has been reported to induce migraine headache but not aura in migraine patients. In addition, NTG does not induce CSD or modify CSD parameters except for propagation failure [15]. It is a vital question to be established whether LVC can initiate CSD in rats and have facilitatory effects on a propagating CSD wave.

Studies have revealed the presence of a dysfunctional sensory gating in migraineurs [16]. Sensory gating dysfunction is believed to underlie the sensory augmentation in migraine patients [17]. The prior researchers have used somatosensory evoked potentials (SSEP) to investigate these deficits [18–21]. SSEPs can be quantified by their amplitudes and latencies [22, 23]. It is unclear how these SSEP parameters are altered in CSD-, NTG- or LVC-induced migraine models.

In recent years, neuroinflammation has emerged as a crucial aspect of migraine pathophysiology [24]. NTG-induced chronic migraine model has been revealed to involve neuroinflammatory processes and consequent loss of BBB integrity in TNC [25]. However, it is yet to be discovered if NTG and LVC injection induce BBB disruption in the cortex, where CSD could also contribute to this impairment.

The primary aim of this study is to investigate whether acute ip LVC administration can induce CSD and headache-like phenotype in rats. We also seek to explore if chemically induced CSD parameters are altered by LVC. Another goal of our study is to assess possible sensory processing deficits and general cortical network activity changes after a single LVC injection.

Materials and methods

Animals

Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines [26]. Male Wistar Albino rats (Kobay, Türkiye) of 12 weeks of age, weighing 250–300 g at the time of arrival, were housed in groups of three in polycarbonate cages with wood shaving bedding on a 12/12 h light/dark schedule (lights on at 07:00 h) in a climate-controlled room. Rats were given at least 1 week for acclimatization prior to any procedure. All experiments were conducted between 09.00 – 17.00. All procedures were approved by the Hacettepe University Animal Experimentation Ethics Board (approval no: 2022/05–11).

Experimental drugs and animal models of acute migraine
LVC (sc-361230A, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) was dissolved in pure ethanol (1 mg LVC in 0,5 ml ethanol) and diluted in isotonic saline so that final solution contained 0,1 mg LVC per 1 ml of 5% ethanol in saline (v/v). NTG was supplied as an ethanol-based solution and diluted in isotonic saline so that final solution contained 1 mg NTG per 1 ml of 10% ethanol in saline (v/v). Both drugs were delivered through intraperitoneal route in all experiments. NTG-induced acute migraine model with a dose of 10 mg/kg is already extensively validated by many studies [8, 27–29], therefore, we adopted the same dose for

our study. For LVC-induced acute migraine model, we administered 1 mg/kg LVC, a dose used in an LVC-induced chronic migraine model [30]. Ethanol in saline solutions were used as vehicles for the control (CTRL) groups.

Experimental design

3–4-month-old rats were randomly allocated to 3 different groups: control (CTRL), nitroglycerin (NTG), and Levromakalim (LVC). As for vehicle (VEH), both dilutions of ethanol (5% and 10%) in saline solutions were preliminarily tested in all experimental procedures and no statistical significance was found concerning the outputs of our experiments. Hence, the data of vehicle-injected rats were pooled under the same control (CTRL) group.

As a preclinical correlate of a migraine attack, we measured periorbital and hindlimb mechanical allodynia for nociceptive sensitization. Then, another set of rats were injected with vehicle, NTG or LVC and assessed for anxiety-like behavior, light aversion, and locomotion within the time frame where the lowest mechanical threshold has been detected. Vehicle-injected rats were tested at the relevant time frames of their corresponding intervention groups (10% ethanol in saline-injected rats were tested between the second and third hours of injection and 5% ethanol in saline-injected rats were tested between the 30th minute and 90th minute after the injection.). For in vivo electrophysiology experiments, rats were given vehicle, NTG or LVC injections and CSD parameters were evaluated at the relevant time frames (Fig. 1). Western blot experiments were performed with vehicle-injected,

CSD-induced, and LVC-injected rats 3 h later following the intervention.

Determination of sample size

Sample size for each group was calculated using G*power and resource equation. From preliminary experiments, we have determined an effect size of 0,7. Type I error (α error) probability and type II error (β error) was set at 0,05 and 0,8 respectively. These values yielded a total sample size of 24, 8 per experimental group. According to resource equation, total animals for a given experiment set – group number should be between 10 and 20. This calculation yielded 4–7 animals for each experimental group. For evans blue assay and western blot experiments, 3 rats per group were used. All sample sizes are indicated in the figure legends. A total of 88 animals was used during this study.

Behavioral tests

Mechanical allodynia

Periorbital and hindlimb mechanical allodynia were evaluated with von Frey filaments with “up-and-down” method [31]. Briefly, von Frey monofilaments, starting from 2.0 g, were applied to the mid-rostral portion of both eyes for periorbital mechanical threshold testing. Aversive head withdrawals, headshakes, vocalizations, ipsilateral head scratches and whole-body retractions were accepted as positive responses. For hind paw threshold testing, rats were placed into the hind paw testing chamber. Testing started after the exploratory behavior had ended. Von Frey monofilaments were applied onto the mid-plantar part of the hind paw. Paw withdrawal, paw licking, and vocalizations were accepted as positive responses. Calculation of 50% withdrawal thresholds was

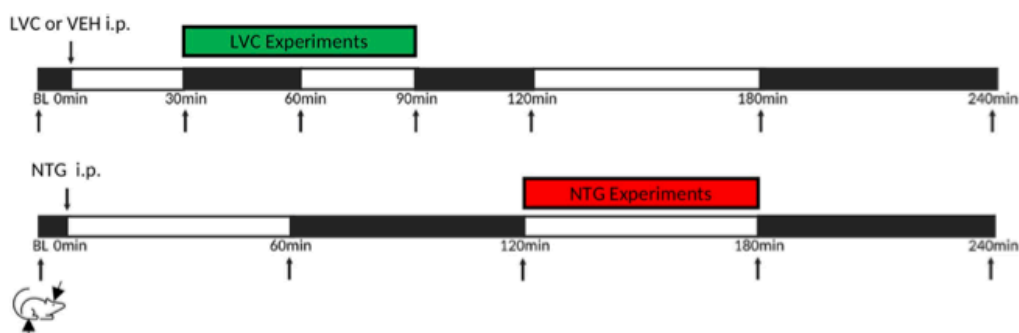


Fig. 1 Experimental Design. Mechanical thresholds of CTRL (5% or 10% ethanol in saline) and LVC (1 mg/kg) groups were tested at baseline (BL), 30th, 60th, 90th, 120th, 180th and 240th min time points. NTG (10 mg/kg) group was tested at baseline, 60th, 120th, 180th and 240th min. Timeframes with lowest thresholds were accepted as “headache phase” and all other experimental procedures were coincided to that timeframe (30–90 min for LVC and 120–180 min for NTG)

done using the free online calculator at https://bioapps.shinyapps.io/von_frey_app/.

Anxiety-like behavior

For the evaluation of the anxiety-like behavior associated with migraine headache, elevated plus maze is used [32]. Rats were placed at the center of the plus shape maze which is constructed of four perpendicular arms (40 cm × 15 cm). Two of the arms were open and two of them were surrounded by walls (45 cm). The time spent in the open arms were analyzed for 5 min.

Light-aversive behavior

Aversion to light was tested with an apparatus consisting of two adjoined compartments, one being brightly illuminated (3000 lx) and the other being nearly completely dark [33, 34]. Rats were free to explore both chambers during the test. Time spent in the light compartment and number of dark-to-light transitions were measured for 15 min.

Open field arena test

Light-independent anxiety was evaluated with open field arena maze [35]. The maze was a transparent open glass cube (45 cm × 45 cm × 45 cm). Rats were placed at the center of the maze and allowed to move freely. The cumulative time spent in the center zone and number of transitions to center zone were recorded for 30 min. Time spent in the center zone was also considered as a measure of light-independent anxiety-like behavior [36].

In vivo electrophysiology

Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of 1,2 g/kg urethane. Anesthesia depth was confirmed by the absence of toe withdrawal reflex and cornea reflex. Rats were then transferred to the stereotaxic frame and their body temperature was kept constant with a thermoregulatory blanket. A midline incision was made to expose bregma and lambda. 2 burr holes were trepanated to access right primary somatosensory cortex (AP 0.0; ML ± 3.8) and ipsilateral primary visual cortex (AP -6.0; ML -3.8). Dura was specifically left intact to avoid any pinprick induced CSDs. A third burr hole was used to chemically induce CSD. For the ground electrode a gold-plated needle electrode was inserted at the neck of the animal. AC and DC recordings over the dura mater were obtained with Ag/AgCl glass microelectrodes containing hypertonic saline. Left median nerve was stimulated every 10 s (1 mA stimulus current; 0,2 ms pulse duration)

and somatosensory evoked potentials (SSEP) were recorded from right somatosensory cortex. Dural EEG signals were recorded and amplified with a head stage (Batiray, YSED, Türkiye) and an amplifier (Kaldiray EX-2C, YSED) and digitized by a data acquisition system (PowerLab 8/SP, ADInstruments, Australia). Data recordings and analysis were done by using LabChart software (AD Instruments, Australia). After 20 min of baseline recording, CSD threshold was calculated chemically by placing a cotton ball soaked in ascending concentrations of KCl (25 mM, 50 mM, 75 mM, 125 mM, 150 mM, 175 mM, 250 mM, 500 mM) with 5-min intervals [37]. Then, to induce serial CSDs, a cotton ball soaked in 1 M KCl was placed over the CSD burr hole and kept moist by impregnation with 1 M KCl every 15 min. These CSDs were evaluated in terms of amplitude, duration, frequency, and propagation failure. Evoked potentials were quantified based on their amplitudes and their latency-to-peaks. Power spectra of the baseline EEG were also computed.

Western blot

Animals were given urethane anesthesia (1,4 g/kg) and parietal cortices were removed. Collected tissues were homogenized with RIPA lysis buffer (sc-24948A, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) as indicated by the manufacturer and lysates were stored in -80 °C until further analysis. Protein concentrations were measured with BCA Colorimetric Assay Kit (E-BC-K318-M, Elabscience, USA).

Cortical protein samples (50 µg/10 µL) were loaded onto a 10% acrylamide gel (TGX FastCast Acrylamide Solution, Bio-Rad, USA), run at 90 V for 90 min, and transferred to PDVF at 1.3 mA for 7 min via Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, USA). Thereafter, membranes were blocked with 5% non-fat dry milk solution for 2 h at room temperature (Bio-Rad, USA). Membranes were incubated with primary antibodies (c-fos: ABE457, Millipore, USA at 1:2000 dilution; β-actin: Bioss, USA at 1:1000 dilution) overnight at 4 °C. After 3 rounds of TBS-T wash, the membranes were incubated with secondary antibody (AP307P, Millipore, USA) at 1:2000 dilution for 1 h at room temperature. The membranes were treated with Western Chemiluminescent HRP Substrate (Immobilon, #WBKLS, Merck) for 5 min in the dark. Membranes were then visualized with Syngene G:BOX Chemi XRQ and analyzed with ImageJ (NIH, USA). β-actin levels were used to normalize loaded protein. The relative change in protein levels was demonstrated as normalized ratio (c-fos/β-actin).

Evans blue assay

Evans blue (EB) assay was performed as described previously [38]. Briefly, EB was prepared as %2 (w/v) in saline. Animals were anesthetized with urethane (1,4 g/kg) and injected with EB (3 ml/kg). All injections were timed so that animals were exposed to EB dye for at least 1 h when their mechanical thresholds were found to be lowest. During the procedure, their body temperature was kept constant with a thermoregulatory blanket. Subsequently, animals were transcardially perfused with saline. Frontoparietal and occipital cortices were collected. Wet weights of the brains were measured and 1 mL %50 (w/v in saline) trichloroacetic acid (TCA) was added per 1 g of tissue. Specimens were then homogenized and centrifuged for 20 min at 10,000 g. Supernatants are collected and diluted with ethanol four-fold. Standards were also prepared as EB dye in ethanol with various concentrations. Absorbances were measured at 620 nm with spectrophotometer (MultiScanGO, Thermo Fisher Scientific, USA).

Statistical analyses

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed by GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., CA, USA). For parametric data, student's *t*-test, or ANOVA (one-way or two-way) followed by the appropriate post hoc test was used when there were two or three groups to compare, respectively. For non-parametric data, Mann Whitney U, Kruskal-Wallis and Friedmann tests were used. Post hoc tests

were not performed when *F* values of ANOVA were not significant. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results

LVC and NTG induce hind paw and periorbital mechanical allodynia

To exclude possible threshold alterations by vehicle, we first studied the effects of ip %10 EtOH in saline (10 ml/kg) injection. We did not find any changes with this amount of ethanol treatment at any point of the time course in both periorbital and hind paw measurements.

Firstly, we compared the acute LVC- and NTG-induced periorbital mechanical threshold reductions over time [$F(2,17) = 5,464$; $p < 0,05$; Fig. 2A]. Following ip LVC injection, we observed significant reduction at 30 min, and thresholds dropped to minimum ($3,00 \pm 0,26$) at around 60 min as compared to the respective CTRL values ($p < 0,05$) and recovered after about 120 min. NTG group exhibited reduced periorbital thresholds at the 2nd hour ($p < 0,05$) and returned to baseline at 240 min.

Similarly, LVC and NTG treatment yielded a temporary reduction in hind paw mechanical thresholds [$F(2,21) = 10,43$; $p < 0,001$, Fig. 2B]. After LVC injection, we observed a significant decrease in thresholds at 30 and 60 min. At 60 min, the lowest hind paw thresholds (8.41 ± 1.04 g) were detected in comparison to the corresponding control values ($p < 0,05$). The thresholds

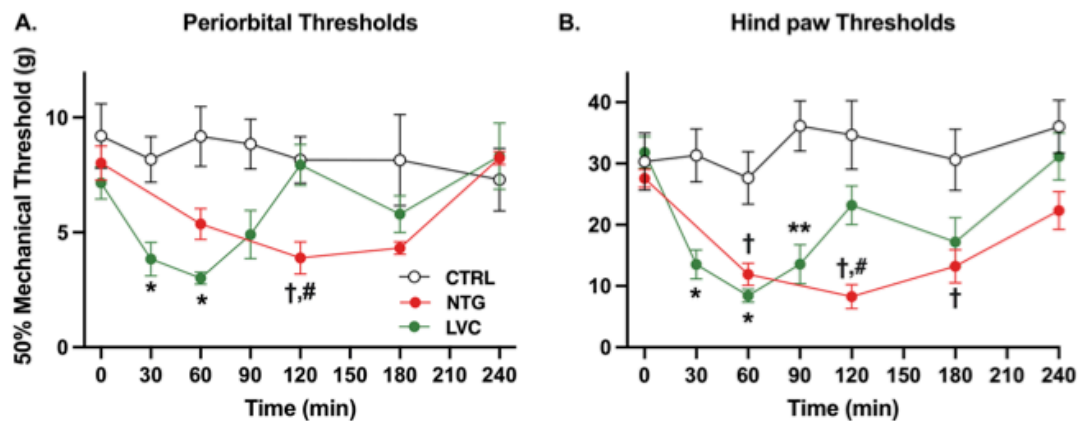


Fig. 2 Acute LVC induced fast and brief periorbital and hind paw mechanical hyperalgesia. Both LVC and NTG injection significantly reduced mechanical thresholds in both periorbital (A) and hind paw plantar areas (B) [$F(2,17) = 5,464$; $p < 0,05$]. LVC administration yielded a rapid reduction at 30 min and this hypersensitivity peaked at 60 min. LVC-induced hypersensitivity ended at 120 min. In comparison, NTG decreased thresholds in 120 min and resulted in longer term hypersensitivity that did not recover until 240 min. Data were shown as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed with two-way ANOVA and *posthoc* Tukey's test (* $p < 0,05$ LVC vs CTRL; ** $p < 0,01$ LVC vs. CTRL; † $p < 0,05$ NTG vs CTRL; # $p < 0,05$ LVC vs NTG) ($n = 6-8$ /group)

recovered after approximately 120 min, consistent with the periorbital LVC thresholds. NTG injection also reduced the hind paw mechanical thresholds at the 60, 120 and 180 min time points, [$p < 0,05$ for all three time points]. Maximal recovery for NTG group was attained at 240 min where no statistical significance was found between NTG and CTRL group ($p > 0,05$) in line with periorbital NTG threshold values.

Our results demonstrate that LVC and NTG successfully provoke periorbital and hind paw mechanical allodynia.

LVC and NTG induce pain-related behaviors

To further investigate whether LVC induces headache-like phenotype, we also evaluated cephalgia-related behaviors. Since our behavioral testing battery lasted approximately 1 h for each animal, we chose the minimum points of the periorbital thresholds for the

behavioral experiments. For NTG group, we initiated our tests at the 2nd hour of the NTG injection. For LVC group, the experiments were timed to begin at the 30th minute after the injection.

In the EPM test, rats in the NTG and LVC groups spent significantly less time in the open arms of the platform indicating the presence of anxiety-like behavior [$F(2,12.21) = 10,51$; $p < 0,01$; Fig. 3A]. In the dark–light box (DLB) test, number of entries from dark to light compartment were significantly decreased after LVC or NTG injection (Kruskal–Wallis statistics 14,27; $p < 0,0001$; Fig. 3B). Similarly, animals spent a shorter time in the light compartment when injected with either LVC or NTG (Kruskal–Wallis statistics 16,53; $p < 0,0001$; Fig. 3C). Lastly, in the open field arena (OFA) test, we assessed the anxiety-like behaviors without interference of light. In both LVC and NTG groups, rats displayed anxiety-like behavior as became evident from the reduced time spent in the center

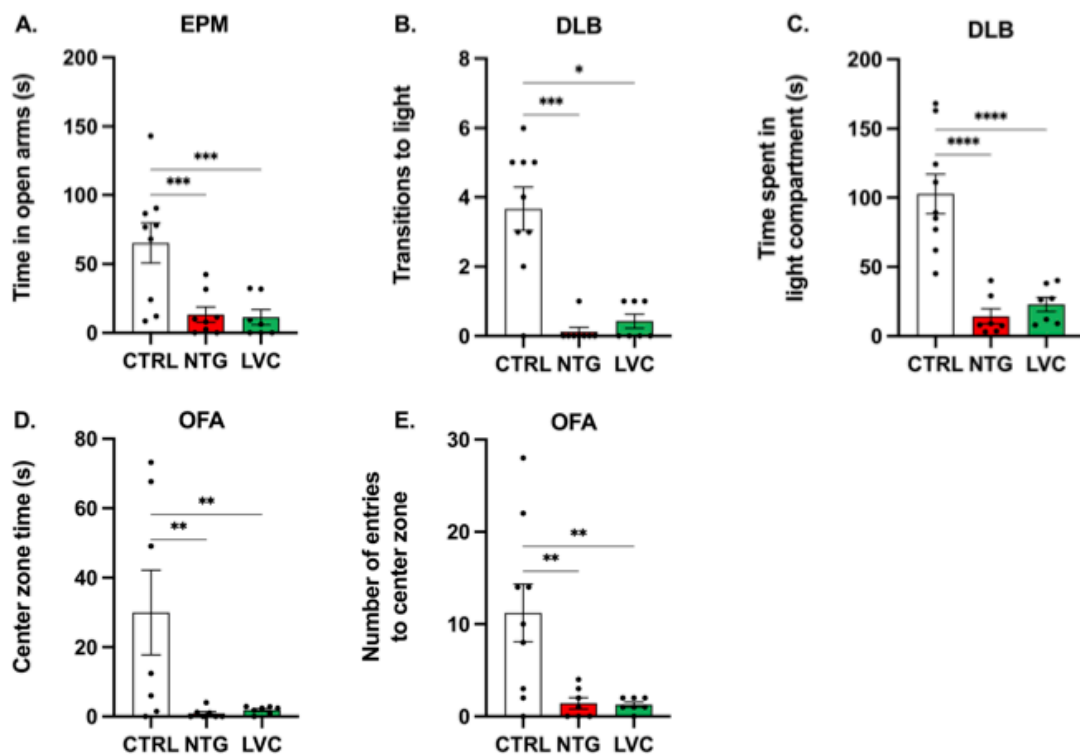


Fig. 3 Acute LVC and NTG induced migraine-associated signs such as anxiety-like behavior and photophobia. **A** Acute LVC and NTG administered rat spent less time in the open arms of the elevated plus maze. **B** These rats were also exhibited lower number of transitions from dark to light compartments and **C**. Spent less time in the light compartment during the experiments of dark–light box. **D** After LVC or NTG injection animals spent less time in the center zone and **E** displayed fewer number of entries to this zone in open field arena test (OFA). Data are shown as mean ± SEM. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and *posthoc* Tukey's test or Kruskal–Wallis test and *posthoc* Dunn's multiple comparisons test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) ($n = 7–8$ /group)

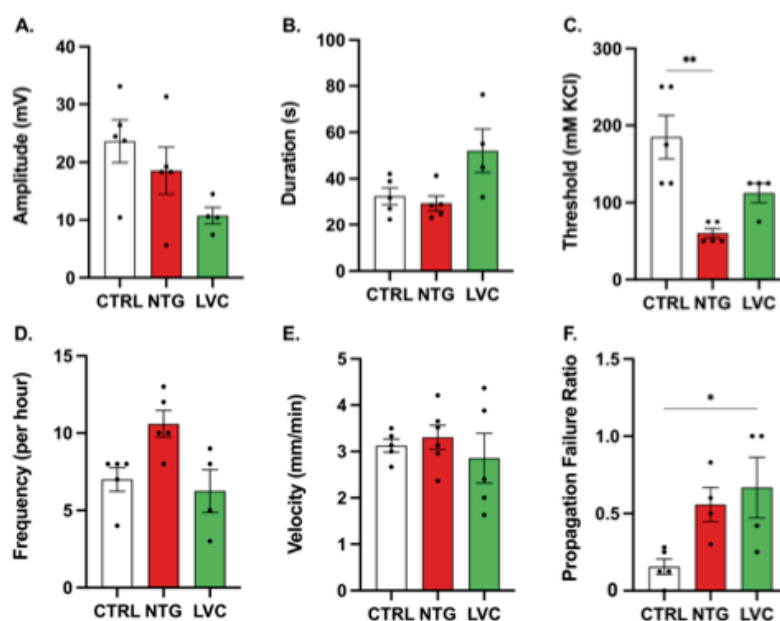


Fig. 4 LVC and NTG both decreased propagation of CSD while NTG also increased CSD susceptibility. LVC or NTG administration did not affect CSD **A** amplitudes, **B** durations, **D** frequency and **E** velocity. **C** LVC did not change CSD thresholds, whereas NTG-injected rats had lower thresholds. **F** LVC increased propagation failure as compared to CTRL group. Data were shown as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and *posthoc* Tukey's test or Kruskal Wallis test and *posthoc* Dunn's multiple comparisons test (* $<0,05$; ** $<0,01$) ($n=4-5$ /group)

zone [$F(6,40)=3.85$; $p<0,05$; Fig. 3D] and lower number of entries to the center zone ($F(2, 20)=7.378$, $p<0,01$; Fig. 3E). It can be inferred that LVC and NTG administration causes anxiety-like behavior and photophobia.

LVC does not affect KCl-induced CSD parameters except for propagation failure whereas NTG lowers KCl-induced CSD threshold

To evaluate possible facilitatory effect of LVC on CSD, we have examined CSD parameters, such as threshold, amplitude, duration, frequency, and propagation failure. LVC did not affect CSD threshold, amplitude, frequency, and duration ($p>0,05$ for all; Fig. 4A-D). LVC group showed an increased propagation failure rate ($p<0,05$; Fig. 4F). None of the agents administered had no influence on the CSD velocities (Fig. 4E). Likewise, NTG did not change any of the aforementioned CSD parameters except for the threshold (Kruskal-Wallis statistics 10,35; $p<0,05$) (Fig. 4A-F).

LVC and NTG do not change peak amplitudes and latencies of SSEPs

To clarify if LVC alters the signal transduction from periphery to cortex and somatosensory cortical processing, we have utilized somatosensory evoked potentials.

Neither NTG nor LVC injection changed amplitudes before or after CSD [$F(2, 9)=0.4238$; $p>0,05$ and $F(2, 9)=3.189$; $p>0,05$ respectively] (Fig. 5A). LVC- and NTG-injected rats had similar latencies to CTRL group before and after CSD [$F(2, 16)=0,58$; $p>0,05$]. When compared within each treatment group, latencies were significantly longer in NTG and LVC group following CSD [$F(1, 16)=22,27$; $p<0,001$] (Fig. 5B). SSEP configurations were similar before and after LVC injection in the LVC-treated group (data not shown).

LVC-injected rats exhibit altered power spectrum density profile after CSD

To assess general network activity, we have analyzed baseline EEG recordings for their power spectra. Before CSD, no difference was detected between different treatment groups ($F(2, 88)=2,914$; $p>0,05$) (Fig. 6A). Following an CSD wave, LVC group exhibited a weaker activity within the delta, theta, alpha, beta, and gamma range as compared to CTRL group (Fig. 6B).

LVC does not induce c-fos expression in rat cortex

To validate if LVC can induce CSD in awake rats, we have measured cortical c-fos expression levels. To eliminate possible surgery- and trepanation-induced

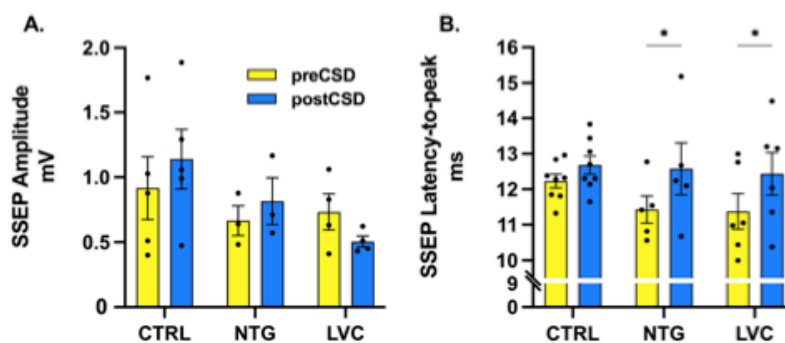


Fig. 5 LVC or NTG administration did not change maximal SSEP amplitudes and latencies-to-peak. Overall, LVC and NTG did not change **A** SSEP amplitudes and **B** latencies. Following SD, LVC and NTG-treated groups displayed prolonged SSEP latencies. Data are shown as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed with two-way ANOVA and *posthoc* Tukey's test ($* < 0,05$) ($n = 4-8$ /group)

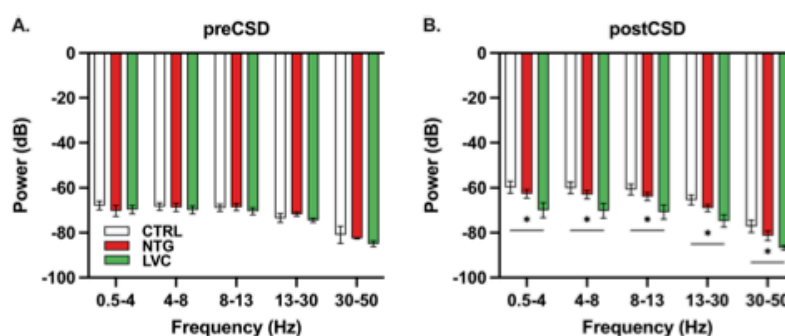


Fig. 6 LVC-injected rats had distinct power spectrum density profiles after CSD. **A** Power spectrum density profiles were similar between different treatment groups before CSD. **B** LVC group was found to have increased activity within delta, theta, alpha, beta, and gamma ranges following SD. Data are shown as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed with two-way ANOVA and *posthoc* Tukey's test ($* < 0,05$) ($n = 4-6$ /group)

c-fos expression in awake animal CSD procedures, we collected CSD-induced cortices from rats under anesthesia for positive controls. These cortices exhibited an approximately fourfold increase in *c-fos* expression when compared to awake CTRL group ($p < 0,0001$). LVC administration to freely moving awake rats did not induce *c-fos* expression in any of the cortices ($F(2,6) = 103,9$; $p < 0,0001$) (Fig. 7).

Acute LVC or NTG injection do not lead to cortical BBB impairment

To investigate pro-neuroinflammatory effects of acute LVC or NTG injection, we performed EB assay with frontoparietal and occipital cortices. No statistically significant difference was found between EB dye concentrations in the frontoparietal and occipital cortices of LVC- and NTG-injected rats [$F(2, 6) = 0,05054$; $p > 0,05$ and $F(2, 6) = 0,1570$; $p > 0,05$, respectively] (Fig. 8A, B).

Discussion

Our study yields several significant and novel findings: Acute LVC treatment can robustly reduce periorbital and hind paw mechanical thresholds in rats. To our knowledge, LVC, with a 30-min onset, is the fastest migraine-like phenotype-inducing agent in rodents when compared to other systemic migraine-inducing substances, such as well-established NTG, cilostazole and CGRP. In addition, we found LVC-injected rats exhibit other nocifensive behaviors, such as anxiety-like behaviors and photophobia. We also demonstrated a single injection of LVC does not induce CSD in neither anesthetized nor awake freely moving rats, as evident from our dural EEG recordings and lack of increased cortical *c-fos* expression, respectively. LVC does not affect the electrophysiological parameters of a chemically induced CSD and does not alter SSEP configurations. It is worth noting that acute LVC and NTG injection does not increase cortical BBB permeability.

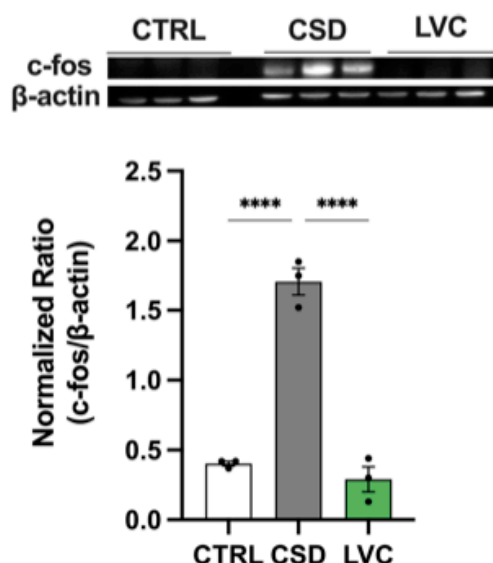


Fig. 7 LVC did not increase c-fos expression in cortex. CSD led to increased c-fos in cortex ($p < 0,05$). LVC did not induce c-fos expression with respect to CTRL group ($p > 0,05$). Data are shown as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and *posthoc* Tukey's test (* $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$; **** $< 0,00001$) ($n = 3$ /group)

Mechanical allodynia in the periorbital region is accepted to be the gold standard readout of migraine-like headache in rodents [39]. Periorbital and hind paw withdrawal responses are used to model cephalic and extracephalic hypersensitivity seen in migraineurs [40, 41]. We demonstrated that LVC reduces periorbital and hind paw mechanical thresholds. We detected lowest mechanical thresholds within the first hour of LVC injection, completely recovering at the 2nd hour. This finding is in line with the clinical studies, where LVC administration provoked migraine attack as early as 10 min in some patients [7]. Previous studies with LVC-induced chronic migraine model adopted the 2nd hour as the testing time for LVC post-treatment responses. This may be the reason why lower thresholds were not consistently observed during the establishment of chronic migraine model in these studies [30, 42, 43]. We observed a similar degree of threshold reduction in both LVC and NTG groups, however in the LVC group, decay time of threshold was significantly shorter in comparison to NTG group. Such a rapid reduction and recovery most likely point out to a functional neurobiological change. An increase in the expression of neuroinflammatory genes and newly synthesized proteins cannot be excluded as underlying factors, however their contribution is very unlikely as this would not explain the rapid change in the mechanical sensitivity. In a previous study, intraplantar and intracerebroventricular LVC administration did not change the mechanical sensitivity to von Frey filaments [43]. This finding may suggest the lack of direct central and local mechanism of action and may point out a vascular mechanism. Indeed, all migraine-inducing substances, including LVC, have vasodilatory properties and mechanistically open potassium channels,

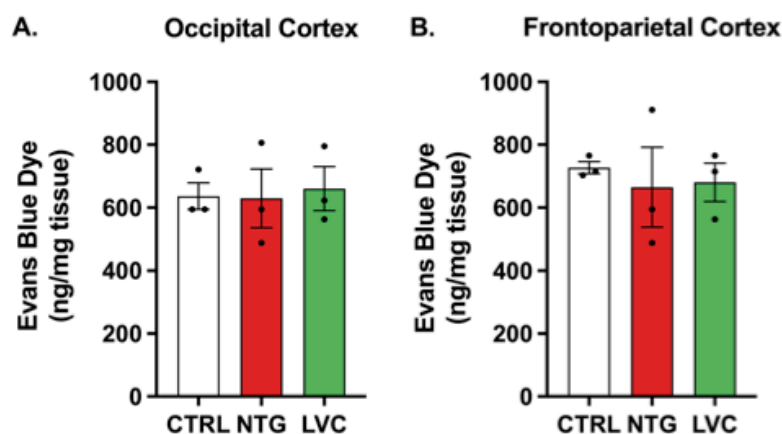


Fig. 8 LVC and NTG injection did not disrupt blood–brain barrier. Neither LVC nor NTG led to vascular permeability in occipital and frontoparietal cortex ($p > 0,05$). Data were shown as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and *posthoc* Tukey's test ($n = 3$ /group)

probably also recruit CGRP signaling [30, 44]. K_{ATP} subunit Kir6.1-knockout mice were protected from NTG- and LVC-induced mechanical allodynia [43]. In addition, LVC-induced mechanical allodynia was reversed by a nonspecific potassium channel blocker, glibenclamide in rodents [45]. On the other hand, glibenclamide failed as an anti-migraine agent in a clinical trial [46]. This discrepancy may be explained by interspecies differences in potassium channel morphology and/or higher doses used in animal experiments [47]. These findings indicate highly selective and subtype-specific potassium channel blockers may provide a novel therapeutic avenue for migraine patients.

As mechanical threshold reduction alone cannot fully explain headache-like behavior in rats, we also assessed anxiety and photophobia, well-known symptoms that commonly accompany migraine attacks [48, 49]. Acute NTG administration is already known to provoke anxiety-like behaviors and light aversion in rats [27, 28, 50]. In our experiments, LVC-injected rats have similarly exhibited anxiety-like behavior and light aversion. Rats naturally tend to avoid light, which complicates studying anxiety-like behavior and hypersensitivity towards light. To rule out possible confounding effects of light on anxiety-like behaviors, we have conducted open field arena test and used time spent in the center zone and number of entries to center zone as measures of light-independent anxiety-like behavior [36]. LVC- and NTG-injected rats spent less time in the center zone and entered the zone fewer times, which confirmed our EPM findings. Our results clearly suggest that LVC can efficiently model migraine-associated anxiety and photophobia, which further validates our model.

Migraine aura is commonly accepted as the clinical correlate of the cortical spreading depolarization phenomenon. Considering LVC can provoke aura in migraineurs with aura, we investigated if LVC could ignite CSD or had any facilitatory effect on KCl-induced CSD. Effects of LVC were compared to NTG, an agent that was found to be incapable of inducing aura in clinical studies. In our studies neither LVC nor NTG induced CSD. On the other hand, NTG increased CSD susceptibility, whereas LVC increased propagation failure rates. Propagation failure can be simply defined as the inability of a CSD wave to spread beyond a certain point. Aura of migraineurs is a phenomenon characterized by migrating symptoms and hypothesized to be the result of a propagating CSD wave. Therefore, reduction in CSD wave propagation may be attributed to the absence of aura with NTG administration clinically. Seemingly controversial to our results, in a previous study, NTG did not alter the CSD threshold [8]. However in this study we conducted our experiment at the peak of mechanical threshold reduction (2nd hour) instead of the first hour as in the aforementioned study.

Hence, the difference in the time points can expound the discrepancy between these two studies. Our results exhibited that LVC treatment slightly increased CSD susceptibility without a velocity change. K^+ channel openers are theoretically proposed to induce and/or facilitate CSD via increased extracellular K^+ ions [7, 14]. Yet, we have demonstrated that acute LVC yielded a migraine-like phenotype with direct or indirect pro-nociceptive action without inducing and/or facilitating CSD. In brief, headache phenotype provoked by acute LVC is a distinct phenomenon from CSD in our experimental model. The latter was also supported by the result that comparable effects on aura-correlate CSD was observed by both migraine-provoking agents, namely LVC and NTG, although NTG is generally considered as a migraine without aura-provoking agent.

Numerous studies have pointed out that migraine patients have defective sensory gating as demonstrated by somatosensory evoked potentials [51]. This study was the first to examine SSEPs in NTG-, LVC- and CSD-induced migraine models. Our experiments did not reveal significant changes in amplitudes or latencies-to-peak. Evoked potential latencies can be utilized as a tool to assess neuronal hyperexcitability in different rodent and human models [52, 53]. Shorter latencies are thought to signify increased likelihood of faster and simultaneous firing of a neuron population. Neuronal excitability is dependent on resting membrane potential, firing threshold, excitatory input, and inhibitory tonus. As a matter of fact, increased glutamatergic excitation was demonstrated to shorten VEP latencies in a cortical injury model [52]. We have detected a prolongation of latencies in LVC and NTG groups after CSD. CSD is known to cause a shift in the excitatory/inhibitory balance towards inhibition and decrease presynaptic glutamate release probability [54]. We speculate that the increased inhibition and decreased excitation due to CSD may have caused this prolongation of SSEP latencies in NTG- and LVC-treated rats.

Purportedly, migraine aura is associated with altered cortical activity as indicated by fMRI studies [55, 56]. Cortical neuronal activity can be measured with power spectrum density as specific oscillations within certain frequency bands. Vinogradova et al. report power spectrum density alterations in a preclinical migraine with aura model [57]. Our experiments revealed that LVC has a distinct power spectrum density profile from CTRL and NTG groups regarding the post-CSD electrocorticogram. Weaker cortical activity following CSD in LVC-treated animals suggests impaired recovery after CSD induction. This could be explained by potassium channel opener properties of LVC, considering intracellular potassium plays a crucial role in neuronal activity. Increased opening of potassium channels can impede the restoration of

ionic imbalances and thus prolong recovery period after CSD in LVC-treated rats.

Absence of expected effects of LVC in electrophysiology experiments may be attributed to the anesthesia as migraine aura is naturally an “awake” phenomenon. We have shown that anesthesia could interfere with the propagation of CSD to subcortical structures such as thalamic reticular nucleus [58–60]. Subsequently, anesthesia may have disturbed the cortex-subcortex relationship and masked possible effects of LVC. CSD is known to generate an enormous amount of c-fos expression in cortex [61]. To exclude the effects of anesthesia, we have injected LVC to awake rats and harvested their cortices after 3 h to allow possible c-fos expression to occur. As our positive control, we have collected CSD-induced cortices from anesthetized animals to avoid possible surgery-induced c-fos expression due to cortical and dural injuries. LVC did not induce c-fos expression in the cortices of awake and freely moving rats. These results showed that acute LVC injection did not induce an CSD activity in awake and freely moving rats.

To investigate whether acute LVC or NTG injection directly disrupts cortical blood–brain barrier and if a possible CSD-induced blood brain barrier disruption accompanies LVC-induced rapid migraine-like phenotype, we performed Evans Blue assay. We did not detect any increased trapping of EB dye in LVC- and NTG-injected rats, pointing out that there is no substantial increase of vascular permeability in the cortex. It can be deduced that LVC-induced acute migraine model does not involve cortical blood–brain barrier disruption. Our data is compatible with the emerging human imaging studies in that blood brain barrier remains intact during acute migraine attacks [62–64].

One of the limitations in this study is the anesthetic use during electrophysiological experiments. As stated above, anesthesia itself alters neuronal excitability and interferes with the communication between different parts of the brain. Thus, it may have masked the effects of our experimental interventions. Lack of female rats is another limitation, since migraine is a disorder with a propensity to affect females more than males. We have used only male rats in our experiments for the sake of comparability with the previous research.

We showed for the first time that systemic LVC 1) induce a fast and narrow window where migraine-like phenotype is manifested in rats, 2) do not ignite CSD within this nociceptive window, 3) do not significantly alter KCl-induced CSD properties except for increased propagation failure, 4) do not significantly modulate somatosensory evoked potentials. Further studies should focus on replicating our study with female rats and using different routes of drug administration to further elaborate on site and mechanism of action.

Furthermore, therapeutic validity should also be tested by using established acute migraine attack treatments, such as 5-HT_{1B/1D} agonists, 5-HT_{1F} agonists and/or CGRP antagonists [9, 11, 42]. Besides, clinical trials with larger samples are still needed to further grasp the levromakalim-induced migraine headache.

In conclusion, acute LVC induces migraine-like phenotype in rats within a comparable timeframe to clinical studies. And this LVC-induced acute migraine model is independent of cortical spreading depolarizations. The fastest manifestation and recovery of migraine-like symptoms in rats by systemic administration of LVC suggests functional alterations are likely induced by K⁺ channel opening properties of LVC in the trigeminal nociceptive system. The detailed research is warranted to understand mechanisms of this narrow window, which may provide novel targets and opportunity to interfere in migraine patients.

Abbreviations

LVC	Levcromakalim
NTG	Nitroglycerin
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CSD	Cortical spreading depolarization
BBB	Blood–brain barrier
CTRL	Control
OFA	Open field arena
EPM	Elevated plus maze
DLB	Dark–light box
SSEP	Somatosensory evoked potential
EB	Evans blue
SEM	Standard error of mean

Authors' contributions

BA, HB, and YS designed the study. BA, BC, and EA collected and analyzed the data. BA, BC, EA, HB, and YS drafted the manuscript. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Funding

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Project Coordination Unit, Türkiye (Grant No:THD-2022–20171) and Turkish Academy of Sciences (TÜBA).

Availability of data and materials

Data will be made available upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the review board of Hacettepe University. Animal suffering was minimized in accordance with ARRIVE guidelines.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

¹Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, Hacettepe University, Sıhhiye, Ankara, Türkiye. ²Neuroscience and Neurotechnology Excellence Joint Application and Research Center (NÖROM), Ankara, Türkiye. ³Department of Neurology and Algology, Faculty of Medicine, Gazi University, Besevler, Ankara, Türkiye.

Received: 6 June 2023 Accepted: 6 July 2023
Published online: 24 July 2023

References

- Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) (2018) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia* 38:1–211 <https://doi.org/10.1177/0333102417738202>
- Ferrari MD, Goadsby PJ, Burstein R, Kurth T, Ayata C et al (2022) Migraine. *Nat Rev Dis Primers* 8:2. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00328-4>
- Christiansen I, Thomsen LL, Daugaard D, Ulrich V, Olesen J (1999) Glyceryl trinitrate induces attacks of migraine without aura in sufferers of migraine with aura. *Cephalalgia* 19:660–7; discussion 26 <https://doi.org/10.1046/j.1468-2982.1999.019007660.x>
- Hansen JM, Hauge AW, Olesen J, Ashina M (2010) Calcitonin gene-related peptide triggers migraine-like attacks in patients with migraine with aura. *Cephalalgia* 30:1179–1186. <https://doi.org/10.1177/0333102410368444>
- Butt JH, Rostrop E, Hansen AS, Lambertsen KL, Kruuse C (2018) Induction of migraine-like headache, but not aura, by cilostazol in patients with migraine with aura. *Brain* 141:2943–2951. <https://doi.org/10.1093/brain/awy228>
- Karsan N, Bose PR, Thompson C, Newman J, Goadsby PJ (2020) Headache and non-headache symptoms provoked by nitroglycerin in migraineurs: A human pharmacological triggering study. *Cephalalgia* 40:828–841. <https://doi.org/10.1177/0333102420910114>
- Al-Karagholi MA, Ghanizada H, Nielsen CAW, Hougaard A, Ashina M (2021) Opening of ATP sensitive potassium channels causes migraine attacks with aura. *Brain* 144:2322–2332. <https://doi.org/10.1093/brain/awab136>
- Bates EA, Nikai T, Brennan KC, Fu YH, Charles AC et al (2010) Sumatriptan alleviates nitroglycerin-induced mechanical and thermal allodynia in mice. *Cephalalgia* 30:170–178. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2009.01864.x>
- Akerman S, Romero-Reyes M, Karsan N, Bose P, Hoffmann JR et al (2021) Therapeutic targeting of nitroglycerin-mediated trigeminovascular neuronal hypersensitivity predicts clinical outcomes of migraine abortives. *Pain* 162:1567–1577. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002142>
- Farkas B, Kardos P, Orosz S, Tarnawa I, Cseko C et al (2015) Predictive validity of endpoints used in electrophysiological modelling of migraine in the trigeminovascular system. *Brain Res* 1625:287–300. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.08.039>
- Akerman S, Karsan N, Bose P, Hoffmann JR, Holland PR et al (2019) Nitroglycerine triggers triptan-responsive cranial allodynia and trigeminal neuronal hypersensitivity. *Brain* 142:103–119. <https://doi.org/10.1093/brain/awy313>
- Burstein R, Jakubowski M, Garcia-Nicas E, Kainz V, Bajwa Z et al (2010) Thalamic sensitization transforms localized pain into widespread allodynia. *Ann Neurol* 68:81–91. <https://doi.org/10.1002/ana.21994>
- Farajdokht F, Babri S, Karimi P, Mohaddes G (2016) Ghrelin attenuates hyperalgesia and light aversion-induced by nitroglycerin in male rats. *Neurosci Lett* 630:30–37. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.07.026>
- Ayata C, Lauritzen M (2015) Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiol Rev* 95:953–993. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2014>
- Knapp L, Szita B, Kocsis K, Vecsei L, Toldi J (2017) Nitroglycerin enhances the propagation of cortical spreading depression: comparative studies with sumatriptan and novel kynurenic acid analogues. *Drug Des Devel Ther* 11:27–34. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S117166>
- Coppola G, De Pasqua V, Pierelli F, Schoenen J (2012) Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on somatosensory evoked potentials and high frequency oscillations in migraine. *Cephalalgia* 32:700–709. <https://doi.org/10.1177/0333102412446313>
- de Tommaso M, Ambrosini A, Brighina F, Coppola G, Perrotta A et al (2014) Altered processing of sensory stimuli in patients with migraine. *Nat Rev Neurol* 10:144–155. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2014.14>
- Hsiao FJ, Cheng CH, Chen WT, Lin YY (2013) Neural correlates of somatosensory paired-pulse suppression: a MEG study using distributed source modeling and dynamic spectral power analysis. *Neuroimage* 72:133–142. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.01.041>
- Hsiao FJ, Wang SJ, Lin YY, Fuh JL, Ko YC et al (2018) Somatosensory gating is altered and associated with migraine chronification: A magnetoencephalographic study. *Cephalalgia* 38:744–753. <https://doi.org/10.1177/0333102417712718>
- Freedman R, Waldo M, Bickford-Wimer P, Nagamoto H (1991) Elementary neuronal dysfunctions in schizophrenia. *Schizophr Res* 4:233–243. [https://doi.org/10.1016/0920-9964\(91\)90035-p](https://doi.org/10.1016/0920-9964(91)90035-p)
- Coppola G, Di Lenola D, Abagnale C, Ferrandes F, Sebastianelli G et al (2020) Short-latency afferent inhibition and somato-sensory evoked potentials during the migraine cycle: surrogate markers of a cycling cholinergic thalamo-cortical drive? *J Headache Pain* 21:34. <https://doi.org/10.1186/s10194-020-01104-7>
- Marlowe N (1995) Somatosensory evoked potentials and headache: a further examination of the central theory. *J Psychosom Res* 39:119–131. [https://doi.org/10.1016/0022-3999\(94\)00072-d](https://doi.org/10.1016/0022-3999(94)00072-d)
- Zhu B, Coppola G, Shoaran M (2019) Migraine classification using somatosensory evoked potentials. *Cephalalgia* 39:1143–1155. <https://doi.org/10.1177/0333102419839975>
- Kursun O, Yemisci M, van den Maagdenberg A, Karatas H (2021) Migraine and neuroinflammation: the inflammasome perspective. *J Headache Pain* 22:55. <https://doi.org/10.1186/s10194-021-01271-1>
- Chen H, Tang X, Li J, Hu B, Yang W et al (2022) IL-17 crosses the blood-brain barrier to trigger neuroinflammation: a novel mechanism in nitroglycerin-induced chronic migraine. *J Headache Pain* 23:1. <https://doi.org/10.1186/s10194-021-01374-9>
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG, Group NCR-RGW (2010) Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160:1577–1579. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x>
- Greco R, Demartini C, Zanaboni A, Casini I, De Icco R, et al. 2021. Characterization of the peripheral FAAH inhibitor, URB937, in animal models of acute and chronic migraine. *Neurobiol Dis* 147:105157 <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105157>
- Gerasimova E, Yakovleva O, Enikeev D, Bogatova K, Hermann A, et al. 2022. Hyperhomocysteinemia Increases Cortical Excitability and Aggravates Mechanical Hyperalgesia and Anxiety in a Nitroglycerine-Induced Migraine Model in Rats. *Biomolecules* 12:<https://doi.org/10.3390/biom12050735>
- Wei C, Kim B, McKemy DD (2022) Transient receptor potential melastatin 8 is required for nitroglycerin- and calcitonin gene-related peptide-induced migraine-like pain behaviors in mice. *Pain*. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002635>
- Christensen SL, Rasmussen RH, Ernsten C, La Cour S, David A et al (2021) CGRP-dependent signalling pathways involved in mouse models of GTN- cilostazol- and levromakalim-induced migraine. *Cephalalgia* 41:1413–1426. <https://doi.org/10.1177/03331024211038884>
- Christensen SL, Hansen RB, Storm MA, Olesen J, Hansen TF et al (2020) Von Frey testing revisited: Provision of an online algorithm for improved accuracy of 50% thresholds. *Eur J Pain* 24:783–790. <https://doi.org/10.1002/ejp.1528>
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open/closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Askari-Zahabi K, Abbasnejad M, Kooshki R, Raoof M, Esmaili-Mahani S et al (2022) The role of basolateral amygdala orexin 1 receptors on the modulation of pain and psychosocial deficits in nitroglycerin-induced migraine model in adult male rats. *Korean J Pain* 35:22–32. <https://doi.org/10.3344/kjp.2022.35.1.22>
- Farajdokht F, Babri S, Karimi P, Alipour MR, Bughchechi R, Mohaddes G (2017) Chronic ghrelin treatment reduced photophobia and anxiety-like behaviors in nitroglycerin-induced migraine: role of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide. *Eur J Neurosci* 45:763–772. <https://doi.org/10.1111/ejn.13486>
- Eilam D (2003) Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. *Behav Brain Res* 142:53–62. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(02\)00382-0](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(02)00382-0)
- Wang M, Mason BN, Sowers LP, Kuburas A, Rea BJ, Russo AF (2021) Investigating Migraine-Like Behavior Using Light Aversion in Mice. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/62839>
- Gerasimova E, Burkhanova G, Chernova K, Zakharov A, Enikeev D, Khaertdinov N, Giniatullin R, Sitdikova G (2021) Hyperhomocysteinemia

- increases susceptibility to cortical spreading depression associated with photophobia, mechanical allodynia, and anxiety in rats. *Behavioural Brain Research* 409:113324. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113324>
38. Goldim MPS, Della Giustina A, Petronilho F. 2019. Using Evans Blue Dye to Determine Blood-Brain Barrier Integrity in Rodents. *Curr Protoc Immunol* 126:e83. <https://doi.org/10.1002/cpim.83>
 39. Deus JR, Dvorakova LS, Vetter I (2017) Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci* 10:284. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284>
 40. De Logu F, Landini L, Janal MN, Li Puma S, De Cesaris F et al (2019) Migraine-provoking substances evoke periorbital allodynia in mice. *J Headache Pain* 20:18. <https://doi.org/10.1186/s10194-019-0968-1>
 41. Harriott AM, Strother LC, Vila-Pueyo M, Holland PR (2019) Animal models of migraine and experimental techniques used to examine trigeminal sensory processing. *J Headache Pain* 20:91. <https://doi.org/10.1186/s10194-019-1043-7>
 42. Wu S, Ren X, Zhu C, Wang W, Zhang K et al (2022) A c-Fos activation map in nitroglycerin/levcromakalim-induced models of migraine. *J Headache Pain* 23:128. <https://doi.org/10.1186/s10194-022-01496-8>
 43. Christensen SL, Rasmussen RH, Cour S, Ernstsens C, Hansen TF et al (2022) Smooth muscle ATP-sensitive potassium channels mediate migraine-relevant hypersensitivity in mouse models. *Cephalalgia* 42:93–107. <https://doi.org/10.1177/03331024211053570>
 44. Ashina M, Terwindt GM, Al-Karaghali MA, de Boer I, Lee MJ et al (2021) Migraine: disease characterisation, biomarkers, and precision medicine. *Lancet* 397:1496–1504. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32162-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32162-0)
 45. Christensen SL, Munro G, Petersen S, Shabir A, Jansen-Olesen I et al (2020) ATP sensitive potassium (K(ATP)) channel inhibition: A promising new drug target for migraine. *Cephalalgia* 40:650–664. <https://doi.org/10.1177/0333102420925513>
 46. Al-Karaghali MA, Ghanizada H, Kokoti L, Paulsen JS, Hansen JM, Ashina M (2020) Effect of K(ATP) channel blocker glibenclamide on levcromakalim-induced headache. *Cephalalgia* 40:1045–1054. <https://doi.org/10.1177/0333102420949863>
 47. Clement A, Guo S, Jansen-Olesen I, Christensen SL. 2022. ATP-Sensitive Potassium Channels in Migraine: Translational Findings and Therapeutic Potential. *Cells* 11:<https://doi.org/10.3390/cells11152406>
 48. Ligthart L, Gerrits MM, Boomsma DI, Penninx BW (2013) Anxiety and depression are associated with migraine and pain in general: an investigation of the interrelationships. *J Pain* 14:363–370. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2012.12.006>
 49. Headache Classification Committee of the International Headache S. 2013. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 33:629–808:<https://doi.org/10.1177/0333102413485658>
 50. Demartini C, Greco R, Francavilla M, Zanaboni AM, Tassorelli C. 2022. Modelling migraine-related features in the nitroglycerin animal model: Trigeminal hyperalgesia is associated with affective status and motor behavior. *Physiol Behav* 256:113956:<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.113956>
 51. Hsiao FJ, Chen WT, Wang YF, Chen SP, Lai KL, et al. 2021. Somatosensory Gating Responses Are Associated with Prognosis in Patients with Migraine. *Brain Sci* 11:<https://doi.org/10.3390/brainsci11020166>
 52. Xu S, Wagner HG, Joo F, Klatzo I, Cohn R (1992) Reduced Latency of Visually Evoked Potentials Following Cortical Injury Indicates Secondary Glutamatergic Neuronal Excitation. In: Globus MYT, Dietrich WD (eds) *The Role of Neurotransmitters in Brain Injury*. Springer, Boston. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3452-5_49
 53. Buchsbaum M, Henkin RI (1971) Serum calcium concentration and the average evoked response. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 30:10–16. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(71\)90198-2](https://doi.org/10.1016/0013-4694(71)90198-2)
 54. Sawant-Pokam PM, Suryavanshi P, Mendez JM, Dudek FE, Brennan KC (2017) Mechanisms of Neuronal Silencing After Cortical Spreading Depression. *Cereb Cortex* 27:1311–1325. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv328>
 55. Afridi S, Kaube H, Goadsby PJ (2005) Occipital activation in glyceryl trinitrate induced migraine with visual aura. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:1158–1160. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.050633>
 56. Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D et al (2001) Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4687–4692. <https://doi.org/10.1073/pnas.071582498>
 57. Vinogradova LV, Suleymanova EM, Medvedeva TM (2021) Transient loss of interhemispheric functional connectivity following unilateral cortical spreading depression in awake rats. *Cephalalgia* 41:353–365. <https://doi.org/10.1177/0333102420970172>
 58. Tepe N, Filiz A, Dilekoz E, Akcali D, Sara Y et al (2015) The thalamic reticular nucleus is activated by cortical spreading depression in freely moving rats: prevention by acute valproate administration. *Eur J Neurosci* 41:120–128. <https://doi.org/10.1111/ejn.12753>
 59. Eikermann-Haerter K, Yuzawa I, Qin T, Wang Y, Baek K, Kim YR, Hoffmann U, Dilekoz E, Waerber C, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Moskowitz MA, Ayata C (2011) Enhanced subcortical spreading depression in familial hemiplegic migraine type 1 mutant mice. *J Neurosci* 31(15):5755–63. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5346-10.2011>
 60. Fu X, Chen M, Lu J, Li P (2022) Cortical spreading depression induces propagating activation of the thalamus ventral posteromedial nucleus in awake mice. *J Headache Pain* 23:15. <https://doi.org/10.1186/s10194-021-01370-z>
 61. Akcali D, Sayin A, Sara Y, Bolay H (2010) Does single cortical spreading depression elicit pain behaviour in freely moving rats? *Cephalalgia* 30:1195–1206. <https://doi.org/10.1177/0333102409360828>
 62. Hougaard A, Amin FM, Christensen CE, Younis S, Wolfam F et al (2017) Increased brainstem perfusion, but no blood-brain barrier disruption, during attacks of migraine with aura. *Brain* 140:1633–1642. <https://doi.org/10.1093/brain/aww089>
 63. Schankin CJ, Maniyar FH, Seo Y, Kori S, Eller M et al (2016) Ictal lack of binding to brain parenchyma suggests integrity of the blood-brain barrier for 11C-dihydroergotamine during glyceryl trinitrate-induced migraine. *Brain* 139:1994–2001. <https://doi.org/10.1093/brain/aww096>
 64. Amin FM, Hougaard A, Cramer SP, Christensen CE, Wolfam F et al (2017) Intact blood-brain barrier during spontaneous attacks of migraine without aura: a 3T DCE-MRI study. *Eur J Neurol* 24:1116–1124. <https://doi.org/10.1111/ene.13341>

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



9. ÖZGEÇMİŞ

Berkay Alpay