

**Antimigrenózný účinok A9 - tetrahydrokanabinolu u
samíc potkana
(Voľný preklad)**

Autori:

Ram Kandasamy, Cole T. Dawson, Rebecca M. Craft, Michael M. Morgan

Publikované:

Online 28.10.2017

Originálny článok dostupný na:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5742305/>

Antimigrenózný účinok A9 - tetrahydrokanabinolu u samíc potkana

Abstrakt

Súčasné antimigrenózne liečby majú obmedzenú účinnosť a mnohé vedľajšie účinky. Hoci neoficiálne dôkazy naznačujú, že marihuana je užitočná pri migréne, táto hypotéza nebola testovaná v kontrolovanom experimente. Táto štúdia teda testovala, či podávanie A 9-tetrahydrokanabinol (THC) vyvoláva u samíc potkanov antimigrenózne účinky. Mikroinjekcia alylizotiokyanátu agonistu TRPA1 (AITC) do dura mater vyvolala bolesť podobnú migréne počas 3 hodín, merané stlačením chodu kolesa domácej kliečky. Súčasné systémové podávanie 0,32, ale nie 0,1 mg/kg THC zabránilo depresii chodu kolies vyvolanej AITC. Avšak dávka 0,32 mg/kg bola neúčinná pri podaní 90 minút po AITC. Podávanie vyššej dávky THC (1,0 mg/kg) stlačilo chod kolesa bez ohľadu na to, či potkanom bola podaná injekcia AITC alebo nie. Správa CB 1, ale nie CB 2 antagonistu receptora zoslabil antimigrenózný účinok THC. Tieto údaje naznačujú, že: 1) THC znižuje bolesť podobnú migréne, keď sa podáva v správnej dávke (0,32 mg/kg) a čase (bezprostredne po AITC); 2) Antimigrenózný účinok THC je sprostredkovaný CB 1 receptormi; a 3) Kolesový beh je účinnou metódou na hodnotenie liečby migrény, pretože iba liečba spôsobujúca antinocicepciu bez rušivých vedľajších účinkov obnoví normálnu aktivitu. Tieto zistenia podporujú neoficiálne dôkazy o použití kanabinoidov na liečbu migrény u ľudí a implikujú receptor CBI ako terapeutický cieľ pre migrénu.

Kľúčové slová: bolesť hlavy, antinocicepcia, marihuana, beh na kolese, depresívne správanie

Úvod

Migréna je charakterizovaná silnou bolesťou hlavy a zvýšenou citlivosťou na zmyslové podnety, čo vedie k depresii bežných denných aktivít. Napriek prevalencii a závažnosti primárnych porúch hlavy je liečba migrény prekvapivo obmedzená. V súčasnosti dostupné profylaktické a abortívne terapie zvládajú menej ako 50 % prípadov migrény v dôsledku nedostatočnej účinnosti alebo nepriaznivých vedľajších účinkov (napr. nevoľnosť, závraty, ospalosť) (Diener a kol., 2015 ; Stovner a kol., 2009). Okrem toho, účinné lieky, ktoré sa používajú opakovane (napr. triptány, námeľ, NSAID), môžu viesť k bolesti hlavy z nadmerného užívania liekov, čo je stav, pri ktorom sa bolesti hlavy menia z epizodického na chronický a intenzívnejší (Dodick a Freitag, 2006). Existuje teda kritická potreba identifikovať a použiť nové činidlá proti migréne.

Vzhľadom na hlásené terapeutické prínosy kanabinoidov, ako je A9 - tetrahydrokanabinol (THC) pre širokú škálu bolestivých stavov (Chiou a kol., 2013 ; Craft a kol., 2013 ; Karst a kol., 2010 ; Kraft, 2012 ; Maione a kol., 2013 ; Milstein a kol., 1975 ; Noyes a Baram, 1974 ; Noyes a kol., 1975), nie je prekvapujúce, že niektorí ľudia používajú marihuanu ako liečbu migrény (el-Mallakh, 1989). Prieskum skúmajúci dôvody samoliečby kanabisom v Nemecku, Rakúsku a Švajčiarsku odhalil, že 10,2 % respondentov ho užívalo na migrénu a bolesť hlavy (Schnelle a kol., 1999). Uvádza sa tiež, že lekárska marihuana znižuje frekvenciu migrén (Rhyne et al., 2016). Predklinický výskum naznačuje, že kanabinoidy môžu modulovať bolesť pri migréne inhibíciou aktivity vstupov A- a C-vlákná z dura mater prostredníctvom aktivácie kanabinoidných receptorov typu 1 (CB1) (Akerman et al., 2007). Hoci sú

tieto údaje sľubné, nie sme si vedomí žiadnej štúdie, ktorá by systematicky skúmala antinociceptívnu účinnosť THC na zvieracom modeli migrény.

Migrénu je ťažké študovať na laboratórnych zvieratách, pretože bolesť sa vyskytuje bez poškodenia tkaniva (Strassman a Burstein, 2013). Mechanická alodýnia slúžila ako primárne závislé meranie bolesti hlavy u laboratórnych zvierat, ale alodýnia je skôr markerom progresie migrény (Burstein a kol., 2004 ; Harris a kol., 2017 ; Louter a kol., 2013) skôr ako bolesť hlavy ako taká . a alodýnia sa klinicky hodnotí len zriedka (Mathew et al., 2004). Navyše, mechanická alodýnia môže trvať dlhšie ako bolesť hlavy a môže sa vyskytnúť počas interiktálnych období (Auggia, 2012). Na rozdiel od alodýnie je zníženie rutínnej fyzickej aktivity spôsobené migrénou diagnostickým kritériom, ktoré môže byť klinicky relevantnejšie a dá sa ľahko posúdiť na laboratórnych zvieratách. Niekoľko štúdií použilo depresiu aktivity na posúdenie bolesti vyplývajúcej z bolesti hlavy u ľudí (Mannix et al., 2016) a hlodavcov (Melo-Carrillo a Lopez-Avila, 2013). Obmedzené obdobia pozorovania v týchto štúdiách, často 60 minút alebo menej, však sťažujú kvantifikáciu trvania a rozsahu migrény. Beh s kolesom v domácej klietke je obzvlášť výhodný, pretože ide o dobrovoľné správanie, ktoré vykazuje denné rytmy, ktoré možno u potkanov nepretržite a objektívne kvantifikovať v prostredí bez stresu. Už sme predtým ukázali, že aktivácia durálnych aferentov pomocou TRPA1 agonistu alylizotiokyanátu (AITC) potláča beh kolesa v domácej klietke a tejto depresii predchádza antimigrenózna liečba sumatriptánom (Kandasamy et al., 2017b). Beh s kolesom v domácej klietke teda poskytuje objektívne, citlivé a klinicky relevantné meranie migrénovej bolesti u potkanov. Táto štúdia bude testovať hypotézu, že THC bude brániť jazdeniu kolesa s depresiou migrény spôsobom závislým od CB1 .

Materiály a metódy

2.1 Predmety

Údaje boli zozbierané od 48 dospelých samíc potkanov Sprague-Dawley chovaných na Washington State University Vancouver (Vancouver, WA, USA). Boli vybrané samice potkanov, pretože migréna je oveľa bežnejšia u žien ako u mužov (Vetvik a MacGregor, 2016). Všetky potkany mali na začiatku štúdie 50 až 70 dní a boli náhodne rozdelené do liečebných skupín. Na zníženie počtu potrebných zvierat sa použili návrhy v rámci jednotlivých predmetov, ako je uvedené v príručke pre starostlivosť o laboratórne zvieratá a ich používanie (Výbor Národnej rady pre výskum (USA) pre aktualizáciu príručky pre starostlivosť a používanie laboratórnych zvierat, 2011). Všetky postupy boli schválené Inštitucionálnym výborom pre starostlivosť o zvieratá a používanie zvierat pri Washingtonskej štátnej univerzite a boli vykonané v súlade s Medzinárodnou asociáciou pre štúdium zásad bolesti pri používaní zvierat vo výskume.

2.2 Chirurgický zákrok

Pred chirurgickým zákrokom boli potkany umiestnené v pároch v kolónii s teplotou 22 až 24 ° C v 12/12-hodinovom cykle svetlo/tma (svetlo vypnuté o 1700 h). Zvieratá sa anestetizovali pentobarbitalom (50 mg/kg, ip) a implantovala sa im vodiaca kanyla (18 gauge; 4 mm dlhá) namierená nad dura mater (AP: +1,0 mm; ML: +1,0 mm; DV: 0,8 mm, z lambda). Loctite® _super lepidlo sa použilo na vytvorenie tesného utesnenia okolo vodiacej kanyly a dentálny cement ukotvil vodiacu kanylu k dvom skrútkám v lebke. Potkany boli udržiavané pod tepelnou lampou až do prebudenia. Po chirurgickom zákroku bola každá krysa umiestnená individuálne v extra vysokej klietke (36 × 24 × 40 cm) s bežiacim kolesom. Klietka bola po zvyšok experimentu umiestnená v kabíne na tlmenie zvuku (2,1 x 2,2 m; Industrial

Acoustics Company, Inc., Bronx, NY, USA), aby sa obmedzil vplyv vonkajších stimulov. Potrava a voda boli dostupné ad libitum .

2.3 Pojazdné koleso

Obrie cvičebné koleso Kaytee Run-Around (Kaytee Products, Inc., Chilton, WI, USA) s priemerom 27,9 cm bolo zavesené na vrchu domácej klietky potkana. Dno klietky bolo pokryté celulózovou podstielkou (BioFresh™, Ferndale, WA, USA). Tenká hliníková doska (0,8 mm × 5,08 cm × 3,81 cm; K&S Precision Metals, Chicago, IL, USA) bola pripevnená k jednému lúču bežiaceho kolesa, aby sa pri každej rotácii prerušil fotolúč vystupujúci cez klietku. Lúč bol nastavený 18 cm nad podlahou klietky tak, aby lúč prerušila iba rotácia kolesa, nie bežná aktivita potkana. Počet otáčok kolesa sa sčítal počas 5 minút počas 23 hodín každý deň pomocou softvéru Multi-Varimex (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA). Zaznamenávanie začalo o 1700 h, čo je začiatok tmavej fázy svetelného cyklu, keď sú potkany najaktívnejšie. Úplný popis bežiaceho kolesa s videom je k dispozícii v našej predchádzajúcej publikácii (Kandasamy et al., 2016).

Potkanom bol umožnený neobmedzený prístup ku kolesu počas 23 hodín/deň počas 8 dní po operácii. Počet otáčok kolesa, ktoré sa vyskytli počas 23 hodín pred prvou duralovou injekciou AITC, sa použil ako základná aktivita. Potkany, ktoré v deň základnej línie vykonali menej ako 400 otáčok (Kandasamy et al., 2016), neboli zahrnuté do ďalšieho testovania (n = 5 z 53).

2.4 Drogy

Allyl izotiokyanát (AITC; Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) bol zmiešaný v minerálnom oleji v koncentrácii 10 % a injikovaný do periorbitu v objeme 10 μ l. Už skôr sa ukázalo, že mikroinjekcia 10% AITC do dura napodobňuje bolesť podobnú migréne u hlodavcov (Edelmayer a kol., 2012 ; Kandasamy a kol., 2017b). A9 -tetrahydrokanabinol (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) bol rozpustený vo vehikule (1:1:18; etanol: kremofor :fyziologický roztok) a injikovaný intraperitoneálne v dávkach 0,1, 0,32 a 1,0 mg /kg v objeme 1 ml/kg. Antagonista CB1 receptora SR141716A (1,0 mg/kg) a CB2antagonista receptora SR144528 (3,2 mg/kg) (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, USA) boli rozpustené v rovnakom vehikule ako THC a intraperitoneálne injikované v objeme 1 ml/kg. Tieto lieky sú vysoko selektívne pre svoj cieľový receptor (Rinaldi-Carmona et al., 1995 ; 1998) a je známe, že použité dávky blokujú antinociceptívne účinky systémovo podávaného THC u samíc potkanov (Craft et al., 2012).

2.5 Stanovenie estrálneho cyklu

Vzorky vaginálneho výplachu sa odoberali od všetkých žien pred durálnymi injekciami. Proestrus bol charakterizovaný prevahou (>75 %) jadrových epitelových buniek vo vzorke; estrus hustými vrstvami zrohovatených epitelálnych buniek; a diestrus rozptýlenými, jadrovými a zrohovatenými epitelovými bunkami a leukocytmi.

2.6 Experiment 1: Podávanie THC počas nástupu migrény

Cieľom tohto experimentu bolo určiť, či podávanie THC bráni AITC-indukovanej depresii chodu kolies. Po základnom testovaní v deň 8 sa potkanom injikovalo 10 ul 10 % AITC alebo minerálneho oleja na tvrdú plenu mater, pričom sa použila injekčná kanyla zavedená do vodiacej kanyly. Potkanom sa ip injikovalo buď vehikulum alebo THC (0,1, 0,32, 1,0 mg/kg) bezprostredne po podaní AITC. Všetky injekcie boli dokončené do 1650 hodín, takže potkany mohli byť vrátené do svojich domácich klieťok pred začiatkom 23-hodinového zaznamenávania so začiatkom o 17:00. Tento postup sa opakoval každý druhý deň s dávkami THC a vehikulom podávaným vo vyváženom poradí. Žiadna krysa nedostala injekciu AITC viac ako trikrát a žiadna krysa nedostala viac ako dve dávky THC. (Kandasamy a kol., 2017b). Potkany boli usmrtené 48 hodín po poslednej injekcii.

2.7 Experiment 2: Podanie THC 90 minút po nástupe migrény

Cieľom tohto experimentu bolo určiť, či podanie THC 90 minút po injekcii AITC zvráti depresiu chodu koleša. Chirurgická implantácia kanyly a základné testovanie boli identické s experimentom 1. V tomto experimente bol potkan vybraný z klieťky približne po 1500 h a bolo mu injikovaných 10 ul 10% AITC alebo minerálneho oleja na dura mater. O 90 minút neskôr bolo potkanom injikované buď vehikulum alebo THC (0,1, 0,32 mg/kg, ip). Všetky injekcie boli ukončené o 1650 h. Potkan sa vrátil do svojej domácej klieťky a beh koleša sa zaznamenával počas nasledujúcich 23 hodín počínajúc 17:00. Tento postup sa opakoval každý druhý deň s dávkami THC a vehikulom podávaným vo vyváženom poradí.

2.8 Experiment 3: Kanabinoidné receptorové sprostredkovanie antimigrenózných účinkov THC

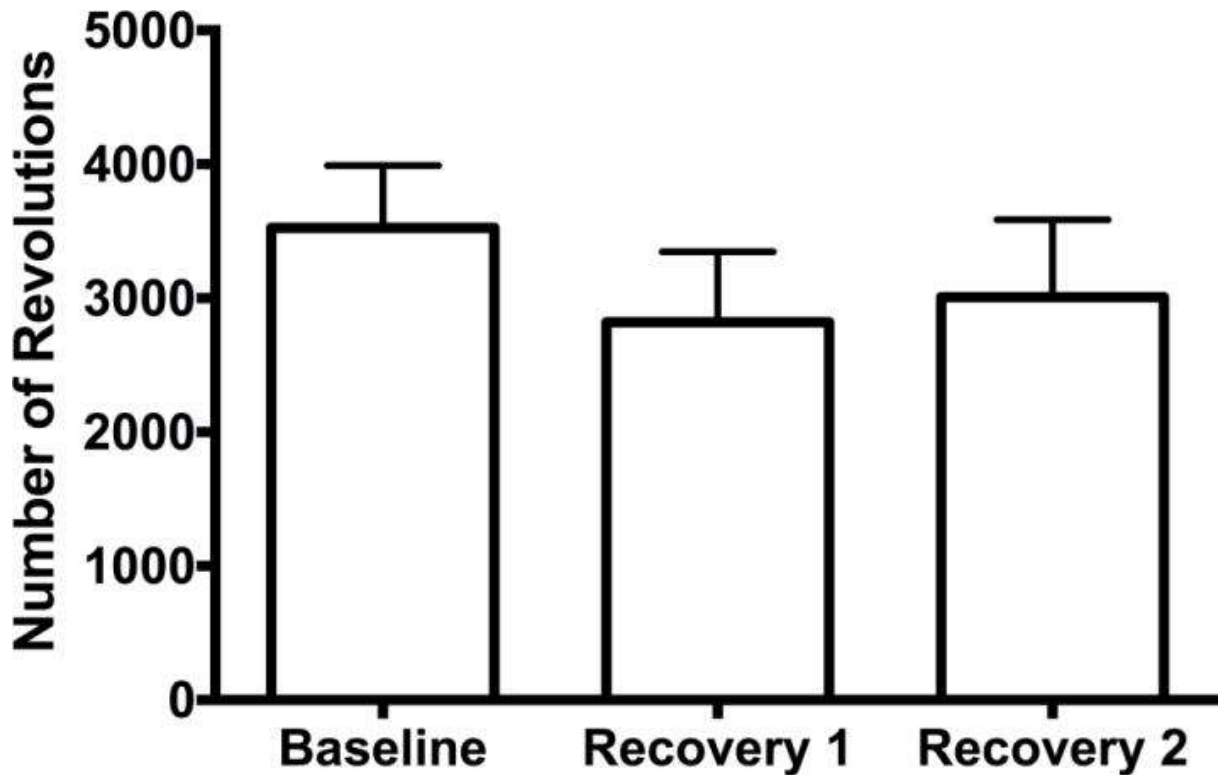
Cieľom tohto experimentu bolo určiť, či receptory CB 1 alebo CB 2 sprostredkovávajú antimigrenózne účinky THC. Chirurgická implantácia kanyly, základné testovanie a injekcie liečiva boli totožné s experimentom 1. Potkanom sa injekčne podali buď vehikulum, antagonist CB1 receptora SR141716A (1,0 mg/kg, ip) alebo CB2 .antagonista receptora SR144528 (3,2 mg/kg, ip) 30 minút pred podaním AITC alebo minerálneho oleja a potom THC (0,32 mg/kg, ip) alebo vehikula. Všetky injekcie boli ukončené o 1650 h. Potkany sa vrátili do svojich domovských klieťok a beh koleša sa zaznamenával počas nasledujúcich 23 hodín počínajúc o 17:00. Tento postup sa opakoval každý druhý deň s rôznymi antagonistami kanabinoidného receptora alebo vehikulom podávaným vo vyváženom poradí.

2.9 Analýza údajov

Experimenty sa uskutočňovali úplne objektívnym spôsobom tak, že sa počas zberu údajov o chode kolies nevstupovalo do miestnosti na ustajnenie zvierat. Priemerná hodinová nočná prevádzková frekvencia sa použila ako základná hodnota pre analýzy h-by-h. Vzhľadom na individuálne rozdiely v chode kolies sú všetky údaje o chode kolies prezentované ako percentuálna zmena od základnej hodnoty každého potkana. Všetky údaje sú vyjadrené ako priemer \pm SEM. Takmer celý priebeh prebieha počas tmavej fázy svetelného cyklu, takže sú prezentované len údaje zozbierané počas tmavej fázy, keď boli podávané lieky. Údaje sa analyzovali pomocou dvojcestnej ANOVA (dávka x hodina), po ktorej nasledovala Bonferroniho post-hoc analýza počas 3-hodinového obdobia po injekcii AITC alebo THC. Pretože každý potkan bol testovaný iba v troch zo štyroch podmienok v rámci každého experimentu, s údajmi sa zaobchádzalo konzervatívne ako s nezávislými vzorkami. Štatistická významnosť bola definovaná ako pravdepodobnosť $<0,05$.

Výsledky

Priemerná základná línia behu pre 48 potkanov počas 23 hodín bola 3004 otáčok. Stredný počet otáčok bol 1818 s rozsahom 443 až 10354. Vzhľadom na to, že sa použil dizajn v rámci jednotlivých subjektov, 38 zo 48 potkanov sa testovalo trikrát s dňom zotavenia medzi každým testom. Priemerný počet otáčok kolesa v týchto dňoch zotavenia sa nelíšil od priemernej základnej aktivity pred testovaním [Obr; (F (2,111) = 0,483, P = 0,618)].

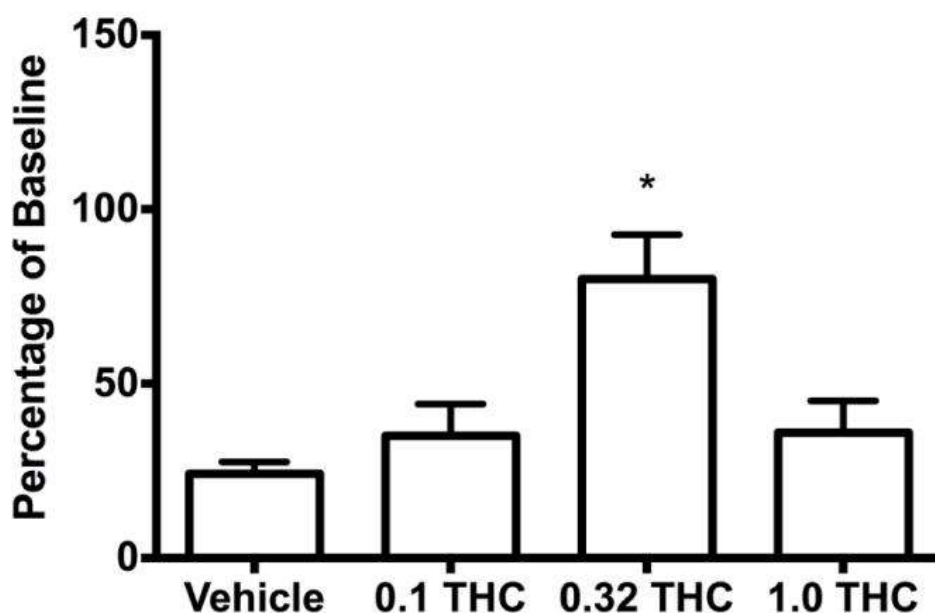
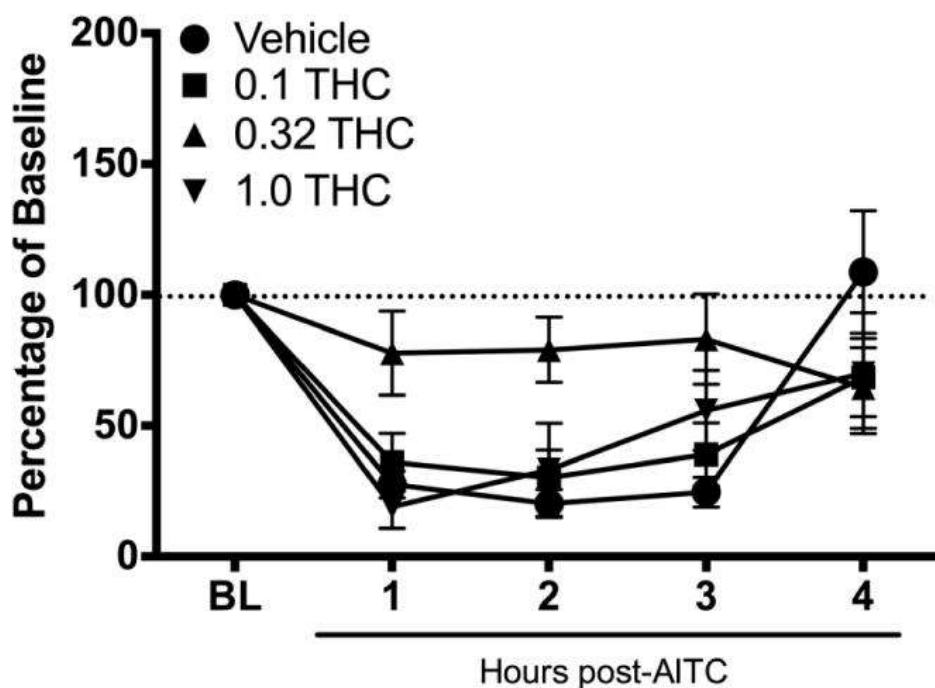


Základné úrovne behu sú v rámci skúšok konzistentné

Priemerné úrovne behu v dňoch zotavenia medzi testami sa nelíšili od základných úrovní behu. Do tejto analýzy sú zahrnuté iba potkany testované počas všetkých troch dní (n = 38/skupina).

3.1 Experiment 1: Podávanie THC počas nástupu migrény

Mikroinjekcia AITC do dura spôsobila zníženie chodu kolesa, ktoré trvalo 3 hodiny (Obr, horný panel). Súčasné podanie 0,32 mg/kg THC zabránilo AITC-indukovanej depresii chodu kolesa v porovnaní s nižšími (0,1 mg/kg) alebo vyššími (1,0 mg/kg) dávkami alebo podávaním vehikula (Obr). Analýza veľkosti chodu kolesa počas tohto 3-hodinového obdobia odhalila významný rozdiel medzi dávkami THC (F (3,40) = 7,594, P < 0,001). Post-hoc analýza odhalila, že chod kolesa bol výrazne vyšší po podaní 0,32 mg/kg THC v porovnaní so všetkými ostatnými dávkami (Bonferroniho test: vehikulum oproti 0,32 mg/kg, P < 0,001; 0,1 mg/kg oproti 0,32 mg/kg P = 0,008 , 1,0 mg/kg oproti 0,32 mg/kg, P = 0,008).

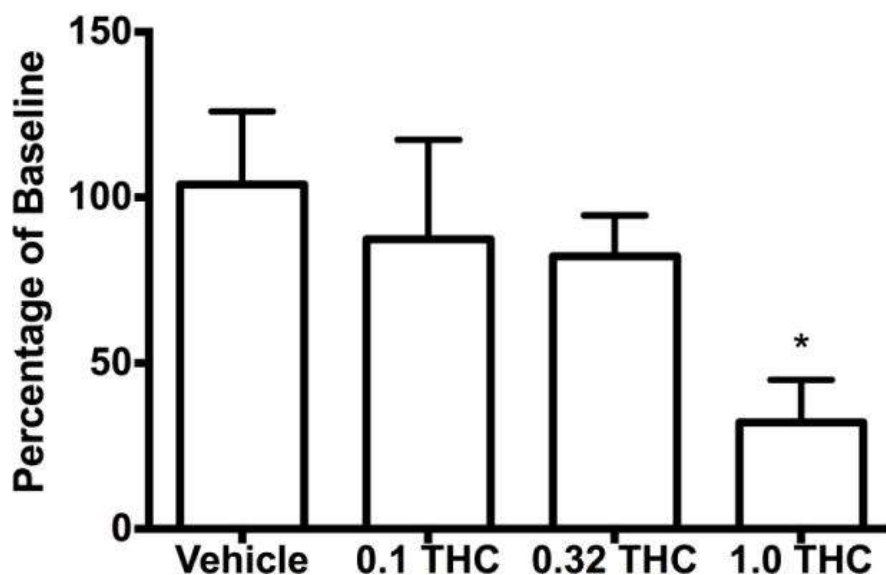
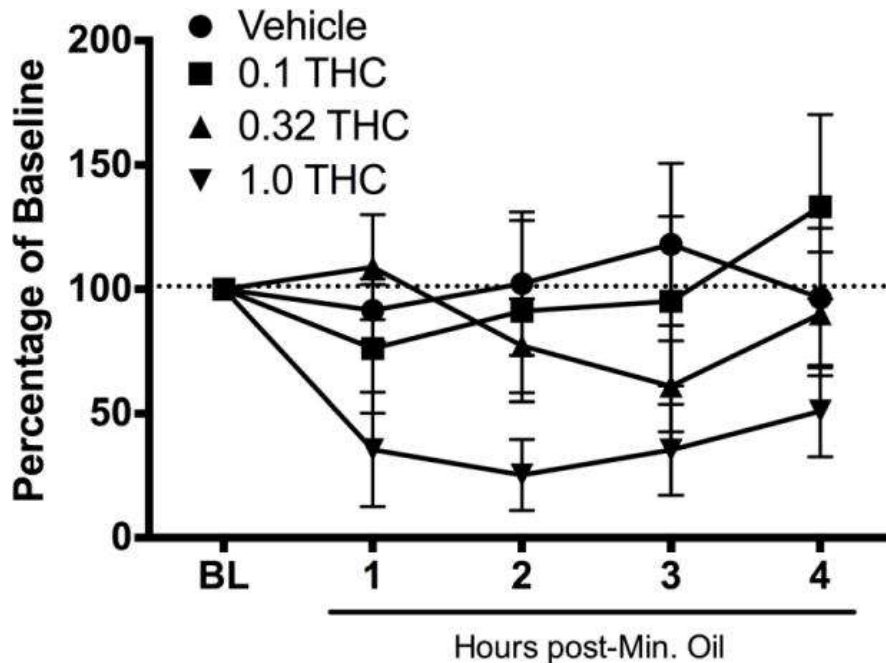


Dávka THC v závislosti od dávky bráni útlmu chodu koleša vyvolanému AITC

Hore: Časový priebeh ukazujúci, že mikroinjekcia AITC do dura mater vyvolala bolesť podobnú migréne indikovanú depresiou behu koleša, ktorá trvala 3 hodiny. Podanie 0,32 mg/kg THC bezprostredne po podaní AITC zabránilo stlačenému chodu koleša. Podávanie nižších a vyšších dávok THC (0,1 a 1,0 mg/kg) nezabránilo depresii chodu kolies vyvolanej AITC. Dole: Analýza priemernej aktivity behu koleša počas 3-hodinového trvania migrény ukazuje zvrátenie bolesti podobnej migrény pomocou 0,32 mg/kg THC (n = 10–12/skupina). * označuje významný rozdiel od zvierat liečených vehikulom (Bonferroniho test, $P < 0,05$).

Mikroinjekcia minerálneho oleja na dura ako kontrola nemala žiadny vplyv na chod koleša (Obr). Podobne bol chod koleša relatívne stabilný po podaní 0,1 a 0,32 mg/kg THC. Na rozdiel od toho bol chod koleša konzistentne nižší u potkanov, ktorým sa vstreklo 1,0 mg/kg THC. Analýza rozptylu počas

3-hodinového obdobia po podaní minerálneho oleja odhalila významný rozdiel medzi skupinami ($F(3,28) = 3,181, P = 0,039$). Post-hoc analýza odhalila, že chod kolesa bol významne nižší po podaní 1,0 mg/kg THC v porovnaní s vehikulom (Bonferroniho test: $P = 0,045$).

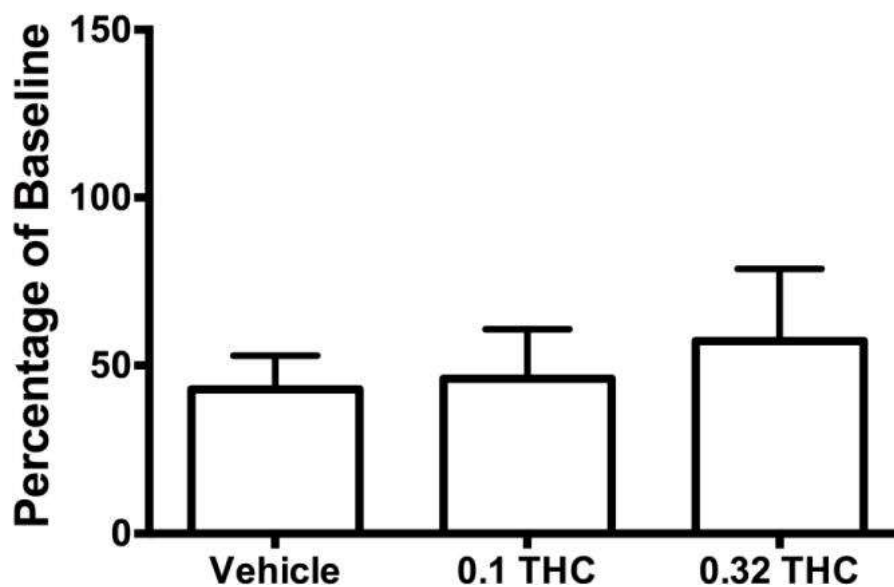
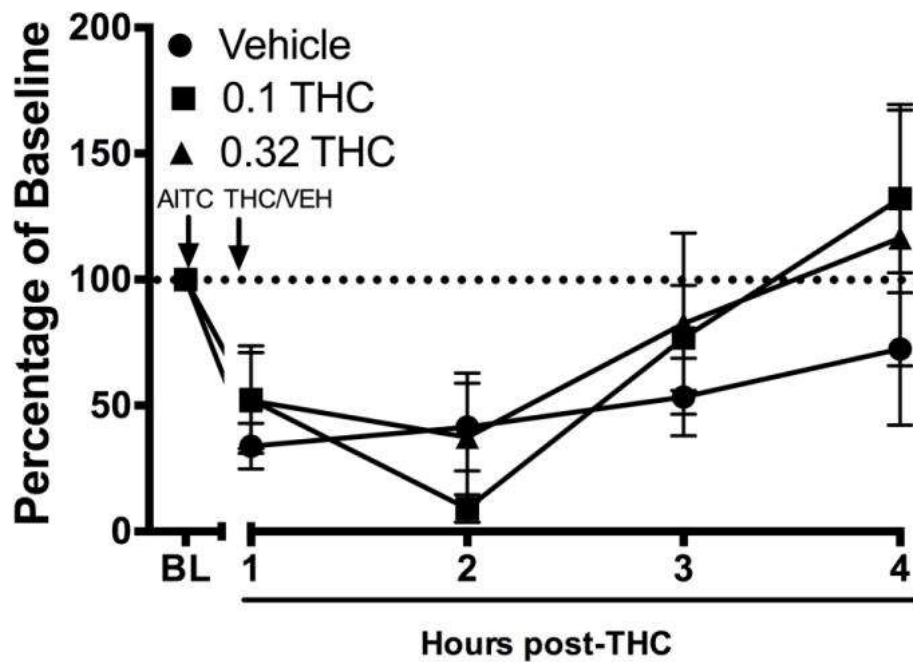


Najvyššia dávka THC tlmí beh u zvierat bez bolesti

Hore: Časový priebeh ukazujúci, že mikrovstrekovanie minerálneho oleja do dura ako kontrola pre AITC nemalo žiadny vplyv na chod kolesa. Podobne nízke (0,1 mg/kg) a stredné (0,32 mg/kg) dávky THC nemali žiadny významný vplyv na beh na kolesách u potkanov liečených minerálnym olejom, zatiaľ čo 1,0 mg/kg THC znížilo beh na približne 50 % základných hladín pre približne 4 h. Dole: Analýza priemerného chodu kolesa počas 3 hodín po mikroinjekcii minerálneho oleja do dura ukazuje, že 1 mg/kg THC významne znížilo chod kolesa v porovnaní s vozidlom ($n = 6-10$ /skupina). * naznačuje významný rozdiel od vozidla- liečených zvierat (Bonferroniho test, $P < 0,05$).

3.2 Experiment 2: Podanie THC 90 minút po nástupe migrény

Potkanom sa injikovalo vehikulum alebo THC (0,1 a 0,32 mg/kg) 90 minút po mikroinjekcii AITC, aby sa určilo, či THC zvráti depresiu chodu kolesa vyvolanú AITC. Žiadna dávka THC nezvrátila depresiu chodu kolies vyvolanú AITC (Obr). Analýza veľkosti chodu kolesa počas 3 hodín po podaní THC neodhalila žiadne významné rozdiely v chode kolesa medzi skupinami ($F(2,18) = 0,220$, $P = 0,805$).



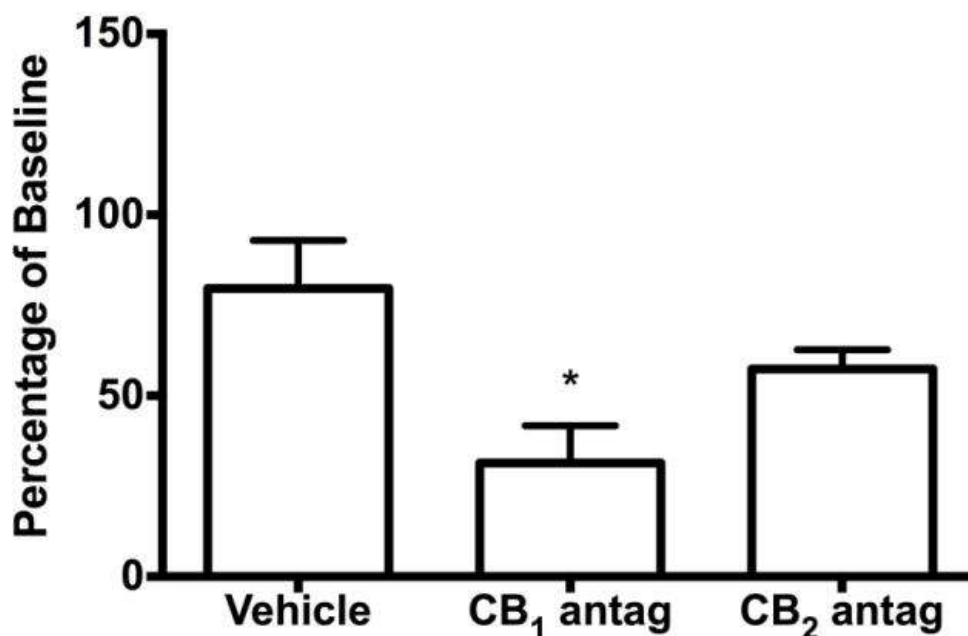
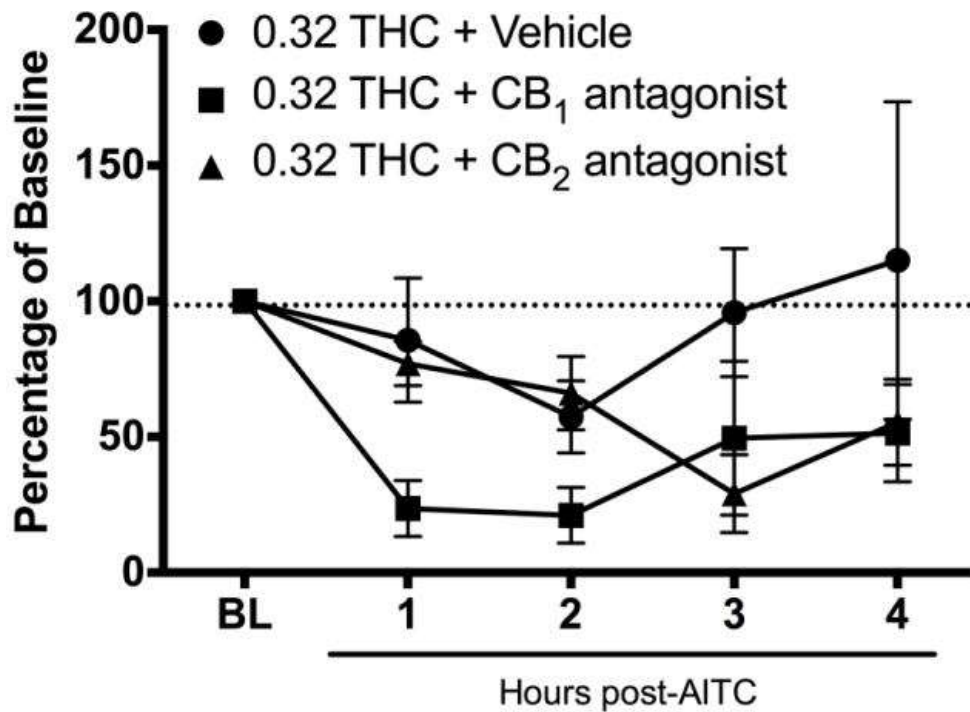
Deväťdesiat minút po liečbe THC neobnoví beh s depresiou migrény

Hore: Podanie THC (0,1 a 0,32 mg/kg) 90 minút po mikroinjekcii AITC do dura mater nezvrátilo depresiu chodu kolesa vyvolanú AITC. Dole: Údaje spriemerované počas 3-hodinového obdobia po podaní AITC neodhalili žiadne významné rozdiely medzi skupinami ($n = 7$ /skupina).

3.3 Experiment 3: Kanabinoidné receptorové sprostredkovanie antimigrenózných účinkov THC

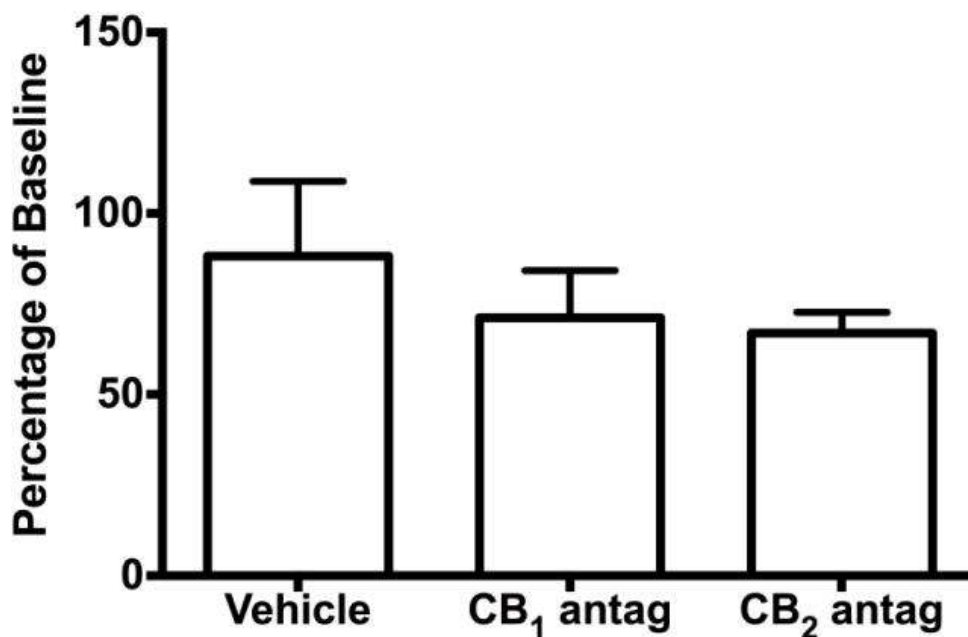
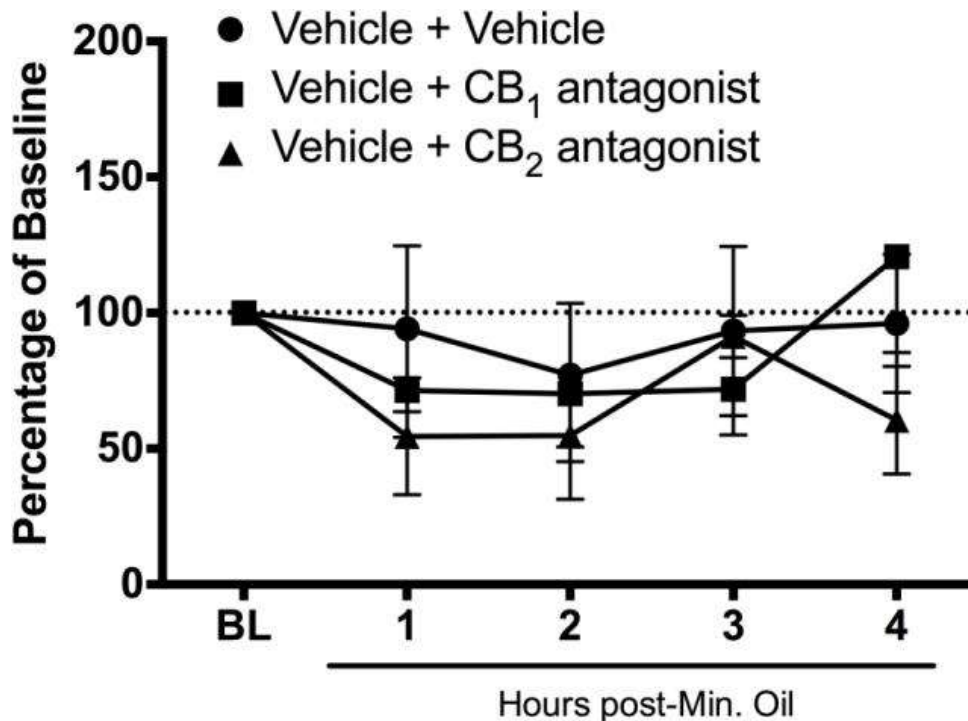
Aby sa určilo, ktorý kanabinoidný receptor prispieva k antimigrenóznemu účinku 0,32 mg/kg THC, potkany sa ošetrili vehikulumom, antagonistom receptora CB1 alebo CB2 30 minút pred injekciami AITC a

THC . Antimigrenózný účinok THC bol oslabený u zvierat liečených antagonistom receptora CB1 v porovnaní so zvieratami liečenými vehikulom alebo antagonistom receptora CB2 (Obr). Analýza veľkosti chodu kolesa počas tohto 3-hodinového obdobia odhalila významný rozdiel v chode kolesa medzi skupinami [Obr($F(2,17) = 5,384, P = 0,015$)]. Post-hoc analýza odhalila, že tento rozdiel bol spôsobený podstatne menším počtom behu na kolese u potkanov liečených antagonistom receptora CB1 v porovnaní s potkanmi liečenými vehikulom, ktorým bolo podávané THC (Bonferroniho test, $P = 0,013$). Zvieratá liečené antagonistom CB2 receptora sa nelíšili od potkanov liečených vehikulom (Bonferroniho test, $P = 0,402$). Podávanie samotných antagonistov kanabinoidných receptorov nemalo žiadny vplyv na beh kolies u zvierat liečených minerálnym olejom na tvrdú plenu. Obr; ($F(2,15) = 0,602, P = 0,561$).



Podávanie antagonistu CBI receptora blokuje antimigrenózne účinky THC

Hore: Časový priebeh ukazujúci, že podávanie antagonistu receptora CB₁ (SR141716A), ale nie antagonistu receptora CB₂ (SR144528) 30 minút pred injekciami AITC a THC (0,32 mg/kg), blokovalo antimigrenózne účinky THC. Dole: Pri analýze migrény vyvolanej AITC v priebehu 3 hodín je evidentné výrazné zníženie behu na kolese u potkanov, ktorým bol injekčne podaný antagonist receptora CB₁, v porovnaní s potkanmi liečenými vehikulom. Všetkým potkanom sa injekčne podali AITC a THC (n = 6–7/skupina). * označuje významný rozdiel od zvierat liečených vehikulom (Bonferroniho test, P < 0,05).



Podávanie antagonistov kanabinoidných receptorov nemá žiadny vplyv na chod koleasa bez podávania AITC a THC

Hore : Časový priebeh chodu koleša po podaní vehikula a antagonistu receptora CB1 alebo CB2 30 minút pred kontrolnou injekciou minerálneho oleja do dura mater. Dole: Podávanie antagonistov CB receptora nemalo žiadny významný vplyv na beh kolies u potkanov bez migrény vyvolanej AITC. Priemerný chod koleša bol analyzovaný počas 3 hodín po podaní minerálneho oleja na tvrdú plenu (n = 6/skupina).

Diskusia

Súčasný údaje ukazujú, že podávanie THC bráni depresii behu koleša v domácej klietke spôsobenej bolesťou podobnou migréne spôsobom závislým od času a dávky. Aktivácia duralových aferentov indukovaná AITC spôsobila zníženie chodu koleša, ktoré pretrvávalo približne tri hodiny, ako sme už ukázali (Kandasamy et al., 2017b). Podanie 0,32 mg/kg THC bezprostredne po nástupe bolesti hlavy zabránilo depresii chodu koleša vyvolanej AITC. Tento antimigrenózný účinok chýbal, ak sa THC podávalo 90 minút po mikroinjekcii AITC, alebo ak sa podávali nižšie alebo vyššie dávky THC. Podávanie antagonistu receptora CB1, ale nie antagonistu receptora CB2 blokovalo antimigrenózný účinok THC.

Predklinické štúdie ukazujú, že THC je účinné pri znižovaní viacerých typov bolesti, vrátane bolesti spôsobenej akútnymi škodlivými stimulmi (Tseng a Craft, 2001), chronickým zápalom (Craft et al., 2013), kyselinou mliečnou (Kwilasz a Negus, 2012), a neuropatiou (Harris et al., 2016). THC tiež potláča rýchlosť šírenia, amplitúdu a trvanie depresie šírenia kôry, kľúčovej zložky patofyziológie migrény (Kazemi a kol., 2012). Napriek týmto rôznorodým účinkom, ktoré boli predtým hlásené, ide o prvú predklinickú štúdiu, ktorá ukazuje, že THC znižuje bolesť podobnú migréne u bdelého zvieratá. Naše údaje naznačujú, že THC znižuje bolesť pri migréne, ak sa podáva v správnej dávke (0,32 mg/kg) a čase (bezprostredne po AITC).

Neoficiálne dôkazy naznačujú, že lekárska marihuana môže byť účinná aj pri prerušení záchvatov migrény po ich začatí (Rhyne et al., 2016). Naše údaje nepreukázali abortívny účinok THC na migrénu, aspoň keď sa THC podáva 90 minút po podaní AITC. Podobne podávanie sumatriptanu proti migréne nemalo žiadny vplyv na AITC-indukovanú depresiu behu koleša, keď sa podávalo 90 minút po AITC (Kandasamy et al., 2017b). Tieto zistenia sú v súlade s dobre známymi obmedzeniami sumatriptánu na prerušenie migrény u ľudí, ak sa podáva po nástupe migrény (Diener et al., 2008). Jeden rozdiel medzi našou štúdiou a neoficiálnymi správami od pacientov s migrénou je v tom, že sme sa zamerali konkrétne na THC, zatiaľ čo marihuana obsahuje viac ako 100 rôznych kanabinoidov, ako aj nekanabinoidných zložiek (Atakan, 2012). Je teda možné, že zložky iné ako THC môžu zvrátiť migrénovú bolesť, ktorá pokročila do štádia, ktoré nie je ovplyvnené samotným THC. Je tiež možné, že abortívne účinky THC u ľudí s migrénou sú sprostredkované mechanizmami, ktoré predchádzajú priamej aktivácii duralných aferentov (napr. kortikálna šíriaca sa depresia) používanej v tejto štúdii.

Naše zistenie, že receptor CB1 sprostredkovoáva antimigrenózne účinky THC, potvrdzuje predchádzajúce štúdie naznačujúce úlohu receptora CB1 pri migréne. Aktivácia receptorov CB1 vo ventrolaterálnej periakvaduktálnej šedi zoslabuje aktiváciu trigeminovaskulárnych aferentov vyvolanú škodlivou stimuláciou dura mater (Akerman et al., 2013 ; Knight a Goadsby, 2001). Ľudské údaje naznačujú, že genetické mutácie, ktoré obmedzujú expresiu CB1 receptora, zvyšujú riziko migrény (Juhasz et al., 2009). Tieto zistenia naznačujú, že receptor CB1 môže byť užitočným terapeutickým cieľom pri liečbe migrény.

Receptory CB₁ môžu inhibovať migrénu centrálnym mechanizmom alebo priamou inhibíciou durálnych aferentov . Receptory CB₁ sú prítomné na vláknach v trigeminálnom trakte a trigeminálnom jadre caudalis (Tsou et al., 1998). Aktivácia týchto receptorov prostredníctvom THC pravdepodobne inhibuje uvoľňovanie neuropeptidov spojených s migrénou, ako je napríklad peptid súvisiaci s génom kalcitonínu (CGRP). Agonisty CB₁ receptora tiež inhibujú dilatáciu durálnych krvných ciev indukovanú elektrickou stimuláciou alebo podávaním CGRP, kapsaicínu alebo oxidu dusnatého (Akerman et al., 2004). Kanabinoidy môžu tiež interagovať so serotonínom, neurotransmitterom zapojeným do migrény, aby modulovali bolesť pri migréne (Akerman et al., 2013 ;Bartsch a kol., 2004 ; Haj-Dahmane a Shen, 2009 ; Voth a Schwartz, 1997). Vzhľadom na komplexné mechanizmy účinku, ktoré sú základom účinkov kanabinoidov (Greco a Tassorelli, 2015) a komplexné mechanizmy, ktoré sú základom migrény (Goadsby et al., 2017), môže THC modulovať bolesť pri migréne prostredníctvom viacerých mechanizmov.

Hlavným obmedzením použitia kanabinoidných analgetík sú centrálnie sprostredkované vedľajšie účinky, ako je sedácia. Toto obmedzenie bolo evidentné v tejto štúdii v tom, že podávanie 1 mg/kg THC nezabránilo poklesu aktivity vyvolanému AITC. Naše údaje ukazujú, že tomuto problému sa dá vyhnúť použitím nízkej dávky (0,32 mg/kg) THC. Ďalšou stratégiou môže byť vývoj selektívnych agonistov CB₁ receptora , ktoré neprechádzajú hematoencefalickou bariérou. Rozšírené účinky kanabinoidov naznačujú, že periférne pôsobiace zlúčeniny môžu poskytnúť úľavu od bolesti pri migréne bez vedľajších účinkov sprostredkovaných centrálnou aktiváciou CB₁ receptora . Dôležitým cieľom budúceho výskumu je identifikovať miesta pôsobenia pre analgetické účinky kanabinoidov.

Migréna je trikrát častejšia u žien ako u mužov (Vetvik a MacGregor, 2016); avšak väčšina predklinických štúdií s migrénou využívala mužov. Prioritou teda zostáva nájdenie účinných antimigrenózných terapií pre ženy a použitie žien v predklinických štúdiách. Predchádzajúce štúdie ukázali, že samice potkanov sú citlivejšie na antinociceptívne účinky THC ako samce potkanov proti akútnej (Tseng a Craft, 2001) a chronickej zápalovej bolesti (Craft et al., 2013). Vzhľadom na vysokú prevalenciu migrény u žien môžu byť kanabinoidy obzvlášť účinnou terapiou pre ženy.

Bolo navrhnuté, že vyšší výskyt migrény u žien môže byť spôsobený zmenami hladín hormónov počas menštruačného cyklu. Trojklanný systém je senzibilizovaný, keď sú potkany v neskorom proestri (Martin et al., 2007). V tejto štúdii sledovanie estrálneho štádia odhalilo v čase testovania len veľmi málo samíc v proestri (2 z 21 potkanov v experimente 2). Je možné, že depresia chodu koleša vyvolaná AITC mohla byť väčšia, ak bolo v proestri viac samíc. Okrem toho môžu existovať výkyvy súvisiace s estrálnym cyklom v citlivosti žien na antinociceptívne účinky THC (Craft a Leitl, 2008). Je potrebná rozsiahla štúdia skúmajúca moduláciu estrálneho štádia migrény a antimigrenózneho účinku THC.

Táto štúdia podporuje naše predchádzajúce zistenie, že depresia behu kolies v domácej klietke je objektívnou metódou na posúdenie trvania a rozsahu bolesti podobnej migréne (Kandasamy et al., 2017b). Hodnotenie behu koleša v domácej klietke je obzvlášť užitočné pri hodnotení liečby liekmi, pretože cieľom je obnovenie funkcie, čo si vyžaduje, aby účinný liek znižoval bolesť bez vyvolávania rušivých vedľajších účinkov. Napríklad vysoké dávky morfénu blokujú mechanickú alodýniu vyvolanú

zápalovou bolesťou, ale neobnovujú depresívny chod kolesa z dôvodu rušivých vedľajších účinkov (Kandasamy et al., 2017a ; 2017c). Súčasnú údaje tiež ukazujú, že najvyššia dávka THC (1,0 mg/kg) neobnoví beh kolies s depresiou migrény a v skutočnosti utlmí beh bez bolesti u potkanov. Iné testy správania potláčajúceho bolestí, ako je intrakraniálna autostimulácia, ukazujú podobnú depresiú správania po podaní vysokých dávok THC (tj 1,0 mg/kg) (Leitl a Negus, 2015).

Na záver sme demonštrovali, že THC, keď sa podáva v správnej dávke a čase, zabraňuje bolestiam podobným migréne, ako sa meria behom kolesa v domácej klietke. Dôležitým zistením je, že hoci vyššie dávky THC pravdepodobne znižujú bolesť podobnú migréne, rušivé vedľajšie účinky bránia obnoveniu normálnej aktivity. Ďalej demonštrujeme, že antimigrénové účinky THC sú sprostredkované receptorom CB1. Táto štúdia vytvára pevný základ pre behaviorálnu analýzu kanabinoïdov, ako je THC, ako liečbu migrény u ľudí. Sú potrebné ďalšie kontrolované štúdie na ľuďoch aj zvieratách, aby sa úplnejšie charakterizovali účinky THC a iných kanabinoïdov proti migréne.

Referencie

Aguggia M. Allodynia and migraine. *Neurol Sci.* 2012;33(Suppl 1):S9–11. doi: 10.1007/s10072-012-1034-9. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. Cannabinoid (CB1) receptor activation inhibits trigeminovascular neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;320:64–71. doi: 10.1124/jpet.106.106971. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Akerman S, Holland PR, Lasalandra MP, Goadsby PJ. Endocannabinoids in the brainstem modulate dural trigeminovascular nociceptive traffic via CB1 and “triptan” receptors: implications in migraine. *J Neurosci.* 2013;33:14869–14877. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0943-13.2013. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Akerman S, Kaube H, Goadsby PJ. Anandamide is able to inhibit trigeminal neurons using an in vivo model of trigeminovascular-mediated nociception. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:56–63. doi: 10.1124/jpet.103.059808. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Atakan Z. Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2012;2:241–254. doi: 10.1177/2045125312457586. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Bartsch T, Knight YE, Goadsby PJ. Activation of 5-HT(1B/1D) receptor in the periaqueductal gray inhibits nociception. *Ann Neurol.* 2004;56:371–381. doi: 10.1002/ana.20193. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Burstein R, Collins B, Jakubowski M. Defeating migraine pain with triptans: a race against the development of cutaneous allodynia. *Ann Neurol.* 2004;55:19–26. doi: 10.1002/ana.10786. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Chiou LC, Hu SSJ, Ho YC. Targeting the cannabinoid system for pain relief? *Acta Anaesthesiol Taiwan.* 2013;51:161–170. doi: 10.1016/j.aat.2013.10.004. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Craft RM, Kandasamy R, Davis SM. Sex differences in anti-allodynic, anti-hyperalgesic and anti-edema effects of $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol in the rat. *Pain.* 2013;154:1709–1717. doi: 10.1016/j.pain.2013.05.017. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Craft RM, Leidl MD. Gonadal hormone modulation of the behavioral effects of Delta9-tetrahydrocannabinol in male and female rats. *European Journal of Pharmacology*. 2008;578:37–42. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.09.004. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Craft RM, Wakley AA, Tsutsui KT, Laggart JD. Sex differences in cannabinoid 1 vs. cannabinoid 2 receptor-selective antagonism of antinociception produced by delta9-tetrahydrocannabinol and CP55,940 in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2012;340:787–800. doi: 10.1124/jpet.111.188540. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Diener HC, Charles A, Goadsby PJ, Holle D. New therapeutic approaches for the prevention and treatment of migraine. *The Lancet Neurology*. 2015;14:1010–1022. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00198-2. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Diener HC, Dodick DW, Goadsby PJ, Lipton RB, Almas M, Parsons B. Identification of negative predictors of pain-free response to triptans: analysis of the eletriptan database. *Cephalalgia*. 2008;28:35–40. doi: 10.1111/j.1468-2982.2007.01457.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Dodick D, Freitag F. Evidence-based understanding of medication-overuse headache: clinical implications. *Headache*. 2006;46(Suppl 4):S202–11. doi: 10.1111/j.1526-4610.2006.00604.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Edelmayer RM, Le LN, Yan J, Wei X, Nassini R, Materazzi S, Preti D, Appendino G, Geppetti P, Dodick DW, Vanderah TW, Porreca F, Dussor G. Activation of TRPA1 on dural afferents: a potential mechanism of headache pain. *Pain*. 2012;153:1949–1958. doi: 10.1016/j.pain.2012.06.012. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

el-Mallakh RS. Migraine headaches and drug abuse. *South Med J*. 1989;82:805. [PubMed] [Google Scholar]

Goadsby PJ, Holland PR, Martins-Oliveira M, Hoffmann J, Schankin C, Akerman S. Pathophysiology of Migraine: A Disorder of Sensory Processing. *Physiol Rev*. 2017;97:553–622. doi: 10.1152/physrev.00034.2015. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Greco R, Tassorelli C. Cannabinoids in Neurologic and Mental Disease. Elsevier; 2015. Endocannabinoids and migraine; pp. 173–189. [CrossRef] [Google Scholar]

Haj-Dahmane S, Shen RY. Endocannabinoids suppress excitatory synaptic transmission to dorsal raphe serotonin neurons through the activation of presynaptic CB1 receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009;331:186–196. doi: 10.1124/jpet.109.153858. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Harris HM, Carpenter JM, Black JR, Smitherman TA, Sufka KJ. The effects of repeated nitroglycerin administrations in rats; modeling migraine-related endpoints and chronification. *J Neurosci Methods*. 2017;284:63–70. doi: 10.1016/j.jneumeth.2017.04.010. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Harris HM, Sufka KJ, Gul W, ElSohly MA. Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Cisplatin-Induced Neuropathy in Mice. *Planta Med*. 2016;82:1169–1172. [PubMed] [Google Scholar]

Juhász G, Lazary J, Chase D, Pegg E, Downey D, Toth ZG, Stones K, Platt H, Mekli K, Payton A, Anderson IM, Deakin JFW, Bagdy G. Variations in the cannabinoid receptor 1 gene predispose to migraine. *Neuroscience Letters*. 2009;461:116–120. doi: 10.1016/j.neulet.2009.06.021. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Kandasamy R, Calsbeek JJ, Morgan MM. Analysis of inflammation-induced depression of home cage wheel running in rats reveals the difference between opioid antinociception and restoration of function. *Behavioural Brain Research*. 2017a;317:502–507. doi: 10.1016/j.bbr.2016.10.024. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Kandasamy R, Calsbeek JJ, Morgan MM. Home cage wheel running is an objective and clinically relevant method to assess inflammatory pain in male and female rats. *J Neurosci Methods*. 2016;263:115–122. doi: 10.1016/j.jneumeth.2016.02.013. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Kandasamy R, Lee AT, Morgan MM. Depression of home cage wheel running: a reliable and clinically relevant method to assess migraine pain in rats. *J Headache Pain*. 2017b;18:S9. doi: 10.1186/s10194-017-0721-6. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Kandasamy R, Lee AT, Morgan MM. Depression of home cage wheel running is an objective measure of spontaneous morphine withdrawal in rats with and without persistent pain. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2017c doi: 10.1016/j.pbb.2017.03.007. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Karst M, Wippermann S, Ahrens J. Role of cannabinoids in the treatment of pain and (painful) spasticity. *Drugs*. 2010;70:2409–2438. doi: 10.2165/11585260-000000000-00000. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Kazemi H, Rahgozar M, Speckmann EJ, Gorji A. Effect of cannabinoid receptor activation on spreading depression. *Iran J Basic Med Sci*. 2012;15:926–936. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

Knight YE, Goadsby PJ. The periaqueductal grey matter modulates trigeminovascular input: a role in migraine? *NSC*. 2001;106:793–800. [PubMed] [Google Scholar]

Kraft B. Is there any clinically relevant cannabinoid-induced analgesia? *Pharmacology*. 2012;89:237–246. doi: 10.1159/000337376. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Kwilasz AJ, Negus SS. Dissociable effects of the cannabinoid receptor agonists Δ^9 -tetrahydrocannabinol and CP55940 on pain-stimulated versus pain-depressed behavior in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2012;343:389–400. doi: 10.1124/jpet.112.197780. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Leitl MD, Negus SS. Pharmacological modulation of neuropathic pain-related depression of behavior: effects of morphine, ketoprofen, bupropion and [INCREMENT]9-tetrahydrocannabinol on formalin-induced depression of intracranial self-stimulation in rats. *Behavioural Pharmacology*. 2015;1 doi: 10.1097/FBP.000000000000207. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Louter MA, Bosker JE, van Oosterhout WPJ, van Zwet EW, Zitman FG, Ferrari MD, Terwindt GM. Cutaneous allodynia as a predictor of migraine chronification. *Brain*. 2013;136:3489–3496. doi: 10.1093/brain/awt251. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Maione S, Costa B, Di Marzo V. Endocannabinoids: a unique opportunity to develop multitarget analgesics. *Pain*. 2013;154(Suppl 1):S87–93. doi: 10.1016/j.pain.2013.03.023. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Mannix S, Skalicky A, Buse DC, Desai P, Sapro S, Ortmeier B, Widnell K, Hareendran A. Measuring the impact of migraine for evaluating outcomes of preventive treatments for migraine headaches. *Health*

Qual Life Outcomes. 2016;14:143. doi: 10.1186/s12955-016-0542-3. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Martin VT, Lee J, Behbehani MM. Sensitization of the trigeminal sensory system during different stages of the rat estrous cycle: implications for menstrual migraine. *Headache*. 2007;47:552–563. doi: 10.1111/j.1526-4610.2007.00714.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Mathew NT, Kailasam J, Seifert T. Clinical recognition of allodynia in migraine. *Neurology*. 2004;63:848–852. [PubMed] [Google Scholar]

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;33:1096–1105. doi: 10.1177/0333102413486320. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Milstein SL, MacCannell K, Karr G, Clark S. Marijuana-produced changes in pain tolerance. Experienced and non-experienced subjects. *Int Pharmacopsychiatry*. 1975;10:177–182. [PubMed] [Google Scholar]

National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 2011 doi: 10.17226/12910. [CrossRef] [Google Scholar]

Noyes R, Baram DA. Cannabis analgesia. *Compr Psychiatry*. 1974;15:531–535. [PubMed] [Google Scholar]

Noyes R, Brunk SF, Avery DA, Canter AC. The analgesic properties of delta-9-tetrahydrocannabinol and codeine. *Clin Pharmacol Ther*. 1975;18:84–89. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

Rhyne DN, Anderson SL, Gedde M, Borgelt LM. Effects of Medical Marijuana on Migraine Headache Frequency in an Adult Population. *Pharmacotherapy*. 2016 doi: 10.1002/phar.1673. n/a–n/a. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Alonso R, Shire D, Congy C, Soubrié P, Brelière JC, Le Fur G. Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sciences*. 1995;56:1941–1947. [PubMed] [Google Scholar]

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, Oustric D, Sarran M, Bouaboula M, Calandra B, Portier M, Shire D, Brelière JC, Le Fur GL. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;284:644–650. [PubMed] [Google Scholar]

Schnelle M, Grotenhermen F, Reif M, Gorter RW. [Results of a standardized survey on the medical use of cannabis products in the German-speaking area] *Forsch Komplementarmed*. 1999;6(Suppl 3):28–36. [PubMed] [Google Scholar]

Stovner LJ, Tronvik E, Hagen K. New drugs for migraine. *J Headache Pain*. 2009;10:395–406. doi: 10.1007/s10194-009-0156-9. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Strassman AM, Burstein R. A new animal model of headache: Ongoing pain vs stimulus-evoked hypersensitivity. *Cephalalgia*. 2013;33:1073–1074. doi: 10.1177/0333102413491029. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Tseng AH, Craft RM. Sex differences in antinociceptive and motoric effects of cannabinoids. *European Journal of Pharmacology*. 2001;430:41–47. [PubMed] [Google Scholar]

Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *NSC*. 1998;83:393–411. [PubMed] [Google Scholar]

Vetvik KG, MacGregor EA. Sex differences in the epidemiology, clinical features, and pathophysiology of migraine. *The Lancet Neurology*. 2016 doi: 10.1016/S1474-4422(16)30293-9. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Voth EA, Schwartz RH. Medicinal applications of delta-9-tetrahydrocannabinol and marijuana. *Ann Intern Med*. 1997;126:791–798. [PubMed] [Google Scholar]