

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI
ALGOLOJİ BİLİM DALI

KRONİK BAŞAĞRISI MODELİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. PELİN ÇİZMECİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. C. AVNİ BABACAN

ANKARA 2008

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
II.1. Başağrısı ve trigeminovasküler sistem ilişkisi.....	3
II.2. Başağrısı ile ilişkili santral sensitizasyon	8
II.3. Kronik başağrısı	10
II.4. Deneysel modellerde başağrısı ve TNC’de c-fos ekspresyonu.....	11
III. GEREÇ VE YÖNTEM	15
III.1. Denekler	15
III.2. Cerrahi, başağrısı modelinin oluşturulması	16
III.3. Davranışsal testler.....	19
III.3.A. Sıçanların düzeneklere yerleştirilmesi.....	20
III.3.B. Von Frey filamentleri ile değerlendirilen mekanik allodini	21
III.3.C. Fırça ile değerlendirilen mekanik allodini	23
III.3.D. Termal eşik değerleri	24
III.4. Perfüzyon ve dokuların hazırlanması	25

III.5. C-fos immünohistokimyasal çalışma	26
III.6. İstatistiksel değerlendirme	27
IV. BULGULAR	28
IV. 1. Von Frey filamentleri ile değerlendirilen mekanik allodini	28
IV. 2. Termal eşik değerleri	30
IV. 3. Fırça ile değerlendirilen mekanik allodini	32
IV. 4. TNC kesitlerindeki c-fos sayımları	34
V. TARTIŞMA	37
VI. ÖZET	45
VII. SUMMARY	46
VIII. KAYNAKLAR	47
IX. EK: Etik Kurul Onayı	

KISALTMALAR

5 HT	: 5-hidroksitriptamin
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoxazolepropionik asit
AP-1	: Aktivatör protein-1
CGRP	: Kalsitonin gen ilişkili peptid
CSD	: Kortikal yayılan depresyon
fMRI	: Fonksiyonel Magnetik Rezonans Görüntüleme
GABA	: Gama aminobütirik asit
NK	: Nörokinin
NMDA	: N-metil-d-aspartat
NO	: Nitrik oksit
PAG	: Periaquaduktal gri madde
PBS	: Phosphate buffered saline
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
SP	: Substans P
TNC	: Trigeminal nükleus kaudalis
VPM	: Ventral posteromedial nükleus

I. GİRİŞ

Kronik baş ağrısı, toplumun büyük bir kısmını etkileyen ve erişkinlerde ağrıya eşlik eden bulgular nedeniyle yaşam kalitesini azaltan, iş gücünde azalmaya ve ekonomik kayıplara neden olan önemli hastalıklardan biridir. Migren, kronik baş ağrıları arasında paroksizmal nitelikte, genetik yatkınlığı olan kişilerde daha sık görülen nörovasküler bir hastalıktır. Toplumun yaklaşık % 15-20'sini etkilemektedir. Migren olguları özellikle aurasız migren kronikleşebilmekte ve günlük baş ağrılarına dönüşebilmektedirler (47).

Migrenin etyopatogenezi yapılan pek çok çalışmaya rağmen tam olarak aydınlatılamamıştır. Beyinde ağrıya duyarlı yapılardan kaynaklanan inflamasyon, gerilme, vasküler dilatasyon, kas kasılmaları ve beyin sapındaki değişiklikler migren baş ağrısının oluşumunda rol oynamaktadır. Trigeminovasküler sistemin aktivasyonu migren baş ağrısının esasını teşkil eder. Trigeminal sinir, oftalmik dalı aracılığı ile pia, araknoid ve duramaterdeki damarları, intrakranial damarların proksimalini innerve etmektedir. Trigeminal sinirin periferik aksonlarının aktivasyonu, trigeminal ganglion ve santral uzantıları aracılığı ile ağrı duyusunu beyin sapındaki trigeminal nükleus kaudalis'e (TNC) iletir. Periferik trigeminal liflerin aktivasyonu bir yandan da antidromik olarak içerdiği kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP), substance P, Nörokinin A gibi nöropeptidlerin perivasküler alana salınması ile vazodilatasyona, kan akımı artışı ve protein ekstrevasyona yol açarak nörojenik inflamasyona neden olmaktadır (49). Bu vazodilatasyon ve ödem, perivasküler trigeminal aksonların daha fazla uyarılmasına ve buna bağlı olarak da daha fazla ağrıya yol açar (24).

Kronikleşmenin başlamasıyla baş ağrısının özellikleri de değişmeye başlar. Baş ağrıları sıklaştıkça şiddetinin yanında, eşlik eden fotofobi, fonofobi, bulantı, kusma gibi belirtilerin de şiddeti ve sıklığı azalmaktadır. Trigeminal sinirin sıklıkla oftalmik dalında allodininin saptanması kronikleşme sırasında ağrının nöropatik karakter alabileceğini de göstermektedir (56).

Trigeminovasküler sistem aktivasyonunun baş ağrısındaki rolü bilinmesine rağmen kronik baş ağrısında trigeminovasküler sistem aktivasyonunu ile ilgili literatürdeki deneysel model sayısı sınırlıdır (46). Bu çalışmada sıçanlarda farklı bir kronik baş ağrısı modeli oluşturmayı amaçladık. Trigeminal sinirin oftalmik dalı olan nazosilier sinir ligasyonu uygulanarak oluşturulan kronik baş ağrısı modelinde, deneklerin davranış değişiklikleri von Frey filamentleri, fırça ve termal cevap olarak değerlendirilirken; doku kesitlerinde de TNC c-fos ekspresyonu incelendi.

II. GENEL BİLGİLER

II.1. BAŞAĞRISI VE TRİGEMİNOVASKÜLER SİSTEM İLİŞKİSİ

Baş ağrıları toplumda en sık görülen ağrı sendromları arasında yer almaktadır. Baş ağrısı ve eşlik eden bulgular, yaşam kalitesini azaltmakta, erişkinlerde ciddi düzeyde iş gücünde azalmaya ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Baş ağrısı, intrakranial ve ekstrakranial ağrıya duyarlı yapıların çeşitli nedenlerle uyarılmaları sonucu ortaya çıkmaktadır (43).

Baş bölgesindeki ağrıya duyarlı yapılar:

- 1) Ekstrakranial yapılar: Saçlı deri, deri altı yağ dokusu ve arterleri, baş ve boyunda bulunan kaslar, periost, göz, kulak, burun, sinüsler, dişler, 5, 9, 10. kafa çiftleri ve ilk üç servikal spinal sinirin ekstrakranial kısımları
- 2) İntrakranial yapılar: İntrakranial arterlerin proksimal kısımları (Willis poligonu çevresi), meningeal arterler, venöz sinüsler, büyük venler, kaide durası, tentorium serebelli, falks serebri, 5, 9, 10. kafa çiftleri ve ilk üç servikal sinirin spinal kısımlarıdır.

Buradan anlaşılacağı gibi dura ve pıanın büyük bölümü, kemik yapı, ependim ve koroid pleksuslar ağrıya duyarlı değildirler.

Trigeminovasküler sistem aktivasyonunun başağrısındaki rolü bilinmektedir. Trigeminal sinir, oftalmik dalı aracılığı ile pia, araknoid ve duramaterdeki damarları, intrakranial damarların proksimalini innerve etmektedir. Meninksler ve büyük damarlar, trigeminal aksonların ve nosiseptörlerin perivasküler lokalizasyonu nedeniyle ağrıya duyarlıdır. Küçük çaplı trigeminal aksonların bir kısmı dallara ayrılarak hem orta serebral arteri hem de dural damarları innerve etmektedir.

Trigeminal sinirin periferik aksonlarının aktivasyonu, trigeminal ganglion ve santral uzantıları aracılığı ile ağrı duyusunu beyin sapındaki 2. nöronlarını oluşturan C2'den bulbusa uzanan TNC'e iletir. Periferik trigeminal liflerin aktivasyonu bir yandan da antidromik olarak içerdiği CGRP, substance P, Nörokinin A gibi nöropeptidlerin perivasküler alana salınması ile vazodilatasyona, kan akımı artışı ve protein ekstrasvazasyonuna yol açarak nörojenik inflamasyona neden olmaktadır (49). Bu vazodilatasyon ve ödem, perivasküler trigeminal aksonların daha fazla uyarılmasına ve daha fazla ağrıya yol açar (24). Ağrı duyusu TNC'den çıkarak beyin sapında orta hatta çaprazlaşıp trigeminal lemniskusu oluşturarak, talamusun VPM nükleusunda sonlanır ve primer somatosensöriyel korteks ve singulat kortekse ulaşır. Ağrıya eşlik eden affektif ve emosyonel semptomlardan parabrakial nükleus, talamusun intralaminer nükleusu, amigdala ve insüler korteksi içine alan farklı bir yolağın aktivasyonu sorumludur.

Ağrının TNC'den rostral beyin bölgelerine iletilmesi sırasında beyin sapındaki superior salivator nükleus uyarılmakta, pterigopalatin ve otik ganglion aracılığı ile NO ve VIP salınımı, parasempatik aktivasyon ve vazodilatasyon gelişmektedir (2, 5, 6). Üst servikal köklerden gelen duyu lifleri TNC'deki duyu lifleri ile interferans yapmakta ve

işlevsel konverjans nedeniyle nosiseptif uyarılar boyuna veya yüz ve kafadaki trigeminal reseptif alana yansıyabilmektedirler. Küme baş ağrısı ve paroksizmal hemikrania gibi trigemino-otonomik baş ağrılarında yoğun biçimde ifade edilen refleks parasempatik aktivasyonun, migrende de aktive olduğuna dair deneysel ve klinik bilgiler bulunmaktadır.

Trigeminovasküler nosiseptif uyarıların modülasyonunda locus seruleus ve dorsal raphe çekirdekleri gibi beyin sapı çekirdekleri, hipotalamus ve korteksi de içeren çeşitli beyin yapıları rol oynamaktadır. Bu çekirdekler beyin kan akımını ve kortikal nöronal uyarılabilirliği etkileyebilmektedir. Migren atakları sırasında PET ve fMRI ile yapılan görüntülemelerde beyin sapı aktivasyonunun belirgin olduğu gösterilmiştir (63).

Migren, paroksizmal nitelikte, genetik yatkınlığı olan kişilerde daha sık görülen nörovasküler bir hastalıktır. Migren, toplumun yaklaşık % 15-20'sini etkilemektedir (47). Türkiye'deki prevalansı kadınlarda %22, erkeklerde ise %11 olarak saptanmıştır. Migren tanısı, baş ağrısı özellikleri ve beraberinde bulunan diğer belirtilerin retrospektif değerlendirilmesi ile konulur. Fiziksel muayene ve laboratuvar incelemeleri genellikle normaldir.

Migren, genetik yatkınlığı olan kişilerde endojen ve/veya ekzojen faktörlerle tetiklenen nörovasküler olaylar zinciri sonucu ortaya çıkmaktadır (60, 66). Bu olaylar zinciri sırasında trigeminovasküler sistemin aktivasyonu migren baş ağrısının esasını teşkil eder. Son yıllarda elde edilen bilgiler ışığında, migren patofizyolojisinde vasküler teoriden uzaklaşmış integre nörovasküler teori benimsenmiştir. Vasküler teori, kranial damarlardaki vazospazm ve vazodilatasyon ile migren semptomlarının ortaya çıktığını öne sürerken;

nörovasküler teori migren baş ağrısında nöronal aktivasyona ikincil olarak vasküler değişikliklerin görüldüğünü öne sürmektedir (45). Nöronal olaylar sonucunda ağrıya duyarlı yapılardaki kan damarları dilate olmakta, bu da daha fazla trigeminal sinir aktivasyonu, CGRP, SP gibi nöropeptid salınımı ve ağrıya yol açmaktadır. Bu tür bir yaklaşım, yeni tedavi seçeneklerini, trigeminal sinirden nöropeptid salınımını önleyecek yeni anti-migren ilaçlarının geliştirilmesini sağlamıştır. Uzun süre periferik trigeminal aktivasyonun bir göstergesi olarak kabul edilen ataklar sırasında yüksek CGRP düzeyi, daha hassas yöntemlerle yapılan yeni çalışmalarda teyit edilememiştir. Periferik kanda CGRP artışının gösterilememesi, lokal trigeminovasküler aktivasyon olasılığını düşündürmektedir.

Migren atakları sırasında PET ve fMRI çalışmalarıyla beyin sapı yapılarının aktive olduğu gösterilmiş, buna dayanarak beyin sapının migreni oluşturan bölge olabileceği öne sürülmüştür. Beyin sapı aminojik çekirdekleri serebral kan akımını düzenlemekte ve kortikal nöronal uyarılabilirliği etkileyebilmektedir, trigeminovasküler sistemi dolaylı veya doğrudan etkilemesiyle de ağrıyı ortaya çıkarabileceği düşünülmektedir. Ancak başka bazı ağrılı durumlarda da aynı beyin sapı bölgesinde aktivasyonun gözlenmesi, söz konusu bölgenin migrene ne kadar spesifik olduğunun sorgulanmasına yol açmıştır. Görüntüleme yöntemleri ile saptanan beyin sapı aktivasyonu daha çok ağrının modülasyonu ile ilişkili gibi görünmektedir.

Migren atağı baş ağrısı ile birlikte 4 farklı evreden oluşmaktadır. Bu evreler baş ağrısından günler ya da saatler önce ortaya çıkan prodrom evresi, auralı migren atağı ise

ağrıdan dakikalar önce görülen aura dönemi, baş ağrısı ve sonrasında görülen iyileşme dönemidir.

Migren hastalarının yaklaşık % 8-77'sinde prodromal semptomlar görülmektedir. Semptomlar değişkenlik gösterebilir ve baş ağrısından saatler ya da günler öncesinde ortaya çıkabilir. Yorgunluk, aşırı uyku hali, depresyon, iştahsızlık, konsantrasyon güçlüğü, huzursuzluk, hiperaktivite, aşırı susama, sık idrara çıkma, diyare, konstipasyon, ışığa ve sese hassasiyet gibi prodromal belirtiler görülebilir. Prodromal belirtilerin limbik sistem, hipotalamus ve beyin sapından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Aura, çoğunlukla baş ağrısından önce ortaya çıkan, geçici fokal nörolojik defisittir. Genellikle 5-20 dakika içinde ortaya çıkar ve çoğunlukla 1 saatten kısa sürer. En sık görsel aura olmakla beraber duyuşsal, motor ya da konuşma auraları veya beyin sapı bozuklukları görülebilir.

Baş ağrısı, % 60 oranında tek taraflıdır. Başlangıçta sıklıkla frontotemporal ve retroorbital bölgededir. Genellikle zonklayıcı nitelikte, orta-ağır şiddettedir; fiziksel aktivite ile artış gösterir (68). Atak süresi ortalama 4-24 saat olmasına rağmen 72 saate kadar uzayabilir (28). Sıklıkla bulantı, kusma ağrıya eşlik eder. Baş ağrısı ile birlikte ışık ve sese karşı hassasiyet görülür.

Düzelme evresi hastaların çoğunda uzun sürelidir. Duygu durum bozuklukları, güçsüzlük, yorgunluk, iştahsızlık sıklıkla görülür (68). Bu belirtilerin sebebi tam olarak bilinmemektedir.

II. 2. BAŞAĞRISI İLE İLİŞKİLİ SANTRAL SENSİTİZASYON

Migrene eşlik eden hiperaljezi ve allodini uzamış ağrılı uyaran sonrasında intrakranial damarların genişlemesi ve trigeminal sinirin spinal nükleuslarında sensitizasyon ile ortaya çıkar (24).

Migrende santral sensitizasyon, sıklıkla hastaların yüz ve saçlı derisinin mekanik ve termal uyarısı sonrasında allodini görülmesine neden olmaktadır (11, 20, 27, 32, 33 36, 62). Allodini dura ve deriden gelen duyuşal uyarılar ile medüller arka kök nosiseptif trigeminovasküler nöronların sensitizasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır (10). Buna bağılı olarak zararsız uyarılar migren sırasında sensitize olduklarında trigeminovasküler nöronlarda dramatik aktiviteye yol açarken, migrenin görülmediğı durumlarda yani sensitize değıllerken çok az cevap görülmekte ya da hiç cevap oluşmamaktadır. Bu hipersensitivite tıraş olma, saç tarama, soğuk hava, gözlük, kontakt lens, küpe veya kolye takarken belirginleşebilir.

Santral sensitizasyonun, travma sonrası ağrı hipersensitivitesindeki rolü ilk kez sıçan spinal kordunda gösterilmiştir (65). Daha sonra çeşitli insan ve hayvan modellerinde de benzer çalışmalar yapılmıştır (29, 35, 37, 48, 57). Santral sensitizasyonda, spinal kordun arka kökündeki nosiseptif nöronlarda uyarılabilirlik, sinaptik güç artar ve reseptif alan inflamasyon veya travmanın boyutundan daha fazla yer kaplar (42, 64). Buna bağılı olarak santral sensitizasyonda klinik olarak ağrı eşiklerinde azalma ile birlikte ağrı bölgesinin dışında aşırı ağrı cevabı görülmektedir.

Santral sensitizasyon, medüller arka kök derin laminalarındaki trigeminovasküler nöronlarda da oluşmaktadır. Migren başağrısının patogeneğinde de bu sensitize nöronlar rol

oynamaktadırlar (12). Sıçan durasına inflamatuvar ajanların uygulanması trigeminovasküler yolağı aktive etmektedir ve bunun sonucunda intrakranial dura ve periorbital bölgeden gelen uyarıları alan medullar arka kök nöronlarının uzun süreli sensitizasyonu oluşur. Bu nöronal sensitizasyon sonucunda duranın mekanik, cildin mekanik ve termal uyarıya cevabının eşiği düşmekte ve uyarılabilen alanlar genişlemektedir (10). Anestezi altındaki hayvanlarda santral sensitizasyon oluştuğunda kan basıncı ve kalp hızında artış görülmektedir (14).

Sıçanlarda gözleendiği gibi insanlarda da migrende, medüller arka kök nöronlarında oluşan sensitizasyona bağlı olarak periorbital bölgede allodininin görülmesi beklenebilir. Kantitatif sensoriyal testler kullanılarak, migren atağı başlangıcından sonra 1 ile 2 saat içinde hastaların ağrı ile aynı tarafta yüzlerinde % 79 oranında mekanik ve termal allodini geliştiği gösterilmiştir (9). Yüzde karşı tarafta ve her iki kolda 4 saat içinde allodini görülebilmektedir (11). Hayvan çalışmalarına göre medüller arka kök sensitizasyonu ile periorbital reseptif alanda allodini görülürken, muhtemelen talamusta üçüncü sıra nosiseptif nöronların sensitizasyonu ile allodininin görüldüğü alanın arttığı düşünülebilir.

Sensitizasyonla ilgili yapılan çalışmalarda sıçanlarda sensitizasyon sonrası “grooming” adı verilen davranışın arttığı gösterilmiştir (17, 61). Ağrıya verilen bir yanıt olarak ortaya çıkan bu davranış, sıçanların ellerini yalayarak ağrıyan bölgelerine sürmeleri şeklindedir. Sensitizasyon geliştiğinde bu hareket tekrarlayan şekilde ortaya çıkmaktadır.

II.3. KRONİK GÜNLÜK BAŞAĞRISI

Migren olguları, özellikle aurasız migren kronikleşebilir ve günlük baş ağrılarına dönüşebilirler. Kronik günlük başağrısı tanımı kronik migren, kronik gerilim tipi başağrısı ve ilaç aşırı tüketimi başağrısını kapsamaktadır. Toplumda yaklaşık % 4 oranında görülmektedir. Kronik günlük başağrısının yaklaşık % 75 kadarı migren, % 10'u gerilim tipi başağrısından gelişmektedir (56).

Kronik migrenlilerin çoğunda onlu yirmili yaşlarda başlayan genellikle aurasız epizodik migren atakları bulunmaktadır (40, 55). Kronikleşmenin başlamasıyla başağrısının özellikleri de değişmeye başlar. Baş ağrıları sıklaştıkça şiddetinin yanında, eşlik eden fotofobi, fonofobi, bulantı ve kusma gibi belirtilerin de şiddeti ve sıklığı azalmaktadır (39, 41).

Kronik migren gelişimi için olası risk faktörleri arasında başağrısı sıklığının fazla olması, kadın cinsiyet, şişmanlık (vücut kitle indeksinin > 30 olması), uyku apne sendromu, stres, fazla kafein tüketimi, ilaç aşırı kullanımı, depresyon, kafa travması, daha önceden var olan migren hikayesi ve eğitim düzeyinin düşüklüğü bulunmaktadır (56).

Kronikleşme sürecinde periferik ve santral sensitizasyonun artmasının, ağrı modülasyonunun azalmasının ve sinaptik reorganizasyonun önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Trigeminal sinirin sıklıkla oftalmik dalında allodininin saptanması kronikleşme sırasında ağrının nöropatik karakter alabileceğini de göstermektedir (56). Bu süreçte santral mekanizmalardaki değişiklikler de önemlidir. Beyin sapında rostroventral medulla, periakuaduktal gri madde (PAG) gibi nosiseptif ve antinosiseptif nöronları içeren

modulator yapılarda, dengenin nosisepsiyon yönünde bozulduğu düşünülmektedir. Bu durumda fiziksel ve psikolojik stres de nosisepsiyonun artmasına yol açabilmektedirler (60, 66). Ayrıca trigeminal nosiseptif nöronlarda sensitizasyon sonucu allodini ve tetik noktalar ortaya çıkmaktadır (65). Allodini sıklıkla tek taraflı başağrısı olanlarda başağrısı ile aynı tarafta görülmektedir. Tedavi sonrası bu semptomlar ortadan kalkmaktadır (56).

Akut başağrısının birçok deneysel modeli olmasına karşın, kronik başağrısında pek fazla model bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar içinde kronik başağrısı modeli olarak sadece Oshinsky ve arkadaşlarının uyanık sıçanlarda, epizodik dural stimülasyon ile oluşturdukları model bulunmaktadır (46). Bu durum da kronik başağrısının ayrıntılı çalışılması ve farklı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde kısıtlılığa neden olmaktadır.

II.4. DENEYSEL BAŞAĞRISI MODELLERİ VE TRİGEMİNAL NÜKLEUS KAUDALİS'TE C-FOS EKSPRESYONU

Hayvan modelleri, primer başağrısı nörobiyolojisinin anlaşılmasında önemli bir role sahiptir. Modellerde, insan çalışmalarına göre deneysel değişkenlerin kontrolü daha kolay olmasına rağmen, direkt sendrom değil yaklaşık şikayetler incelenmektedir. Hayvan modellerinde klinik sendromun hipotetik bir resmi oluşturulur ve klinik, fonksiyonel görüntüleme çalışmaları ile test edilir (1).

Markowitz ve arkadaşları (38) trigeminal afferentlerin elektriksel veya kimyasal uyarısı sonucu oluşan nörojenik inflamasyon ve periferdeki nosiseptörlerin aktivasyonu ile

durada ve konjunktivada plazma protein ekstravaazasyonu görülürken beyinde görülmediği tespit etmişlerdir.

Primer nörovasküler baş ağrılarında kranial venöz nöropeptidlerin çalışılması trigeminal aktivasyonun ispat edilmesinde önemlidir (21). Hem insanlarda hem de hayvan modellerinde, trigeminal ganglion aktivasyonu ile substans P ve CGRP düzeyleri artmaktadır (26). Superior sagittal sinüsün uyarılması ile CGRP düzeyi artarken substans P'nin artmadığı gösterilmiştir, ayrıca sıçanlarda trigeminal ganglion stimülasyonu ile CGRP'in arttığı tespit edilmiştir (13, 26, 69).

Gine domuzlarının oftalmik sinirlerinin nazosilier dalından alınan kayıtlarla, duranın innervasyonunu sağlayan primer afferentlerin düşük pH'dan, inflamatuvar ajanlardan, kapsaisinden ve yüksek veya düşük ısıdan etkilendiği gösterilmiştir (8). Daha sonra periferik sensitizasyon için sıçan durasına inflamatuvar mediatörler uygulanarak duranın mekanik uyarılara eşiğinin düşürülmesi sağlanmıştır (58). İntrakranial duranın kimyasal sensitizasyonu sonucu da, trigeminal nöronların hem dura hem de yüzdeki paylaşılan reseptif alanları nedeniyle fasial uyarıya cevap artmaktadır (10).

C-fos geni bir uyarana karşı ilk yanıt veren onkogenlerden biridir. C-fos geni erken cevap geni olarak da adlandırılır. Bir uyarı sonrasında 5 dakika içinde başlayan 15-20 dakika devam eden aktive mRNA ekspresyonu olur. Ekspresyon maksimum düzeyine 30-45. dakikada ulaşır (16, 44).

AP-1 adlı promotor bölgenin uyarılması ile c-fos geni aktive olur ve bu uyarılma ile matriks metalloproteinazları, büyüme faktörleri, sitokinler gibi geç proteinlerin sentezi

sağlanır (25). Bu genler hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozisle ilişkili genlerdir. C-fos proteini santral sinir sisteminde nöronlarda ve glia hücrelerinde normalde düşük seviyelerde bulunmaktadır (44). C-fos ekspresyonu ise nöronal aktivitenin göstergesi olarak kullanılmaktadır (19, 30, 34, 44, 54).

Ağrıya spesifik olarak noziseptif uyarılarla TNC'de c-fos ekspresyonunun oluştuğu gösterilmiştir (7). Trigeminoasküler sistemin aktivasyonu ile TNC'de bulunan ikinci sıra nöronlarda c-fos ekspresyonu meydana gelmektedir. Trigeminal reseptif alanlardan ağrı bilgisinin taşınmasıyla ilgili primer afferent liflerden TNC lamina I ve II'deki hücreler direkt sinaptik uyarı almaktadır. C-fos ekspresyonunun, TNC'de görülmesi için trigeminal sinirin innerve ettiği meninks, trigeminal ganglion ve süperior sagital sinüs gibi intra ve ekstrakranial yapıların mekanik, kimyasal veya elektriksel olarak uyarılması gerekmektedir (44). Kortikal yayılan depresyon (CSD) ile depresyonun oluşma şeklinden bağımsız olarak (mekanik, kimyasal veya elektriksel) c-fos proteini indüklenmektedir (6, 31). Kortikal yayılan depresyon sonrasında c-fos hücreleri, ipsilateral lamina I ve II'de özellikle de trigeminal sinirin oftalmik dalının sonlanma yeri olan ventral TNC'de artmaktadır. Laboratuvar hayvanlarında TNC'deki c-fos uyarılması insanlardaki vasküler başağrısının modeli olarak kullanılmaktadır (44). TNC'de c-fos ekspresyonunu düzenleyen 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2B}, NK-1, GABA_A, NMDA, AMPA, tip 3 metabotropik glutamat reseptörleri ve opioid μ reseptörleri gibi birçok reseptör bulunmaktadır. Triptanlar 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{1F} reseptörleri; ergot alkaloidleri 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{1F} reseptörleri üzerinden etki göstermektedirler.

TNC’de eksprese olan c-fos hücrelerinin laminar dağılımı ve yoğunluğu, uyarının yerine ve şekline göre farklılık göstermektedir. Trigeminal ganglion stimülasyonu, c-fos mRNA ekspresyonu veya TNC’in yüzeyel laminalarında c-fos indüksiyonuna yol açmaktadır (44).

NO donorü olan nitrogliserinin çalışmalarda, infüzyon şeklinde verildiğinde migren baş ağrısına yol açtığı bilinmektedir (59). Bu gibi tetikleyiciler de beyin sapı TNC nöronlarında c-fos ekspresyonuna yol açmaktadırlar (50, 51).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma “Gazi Üniversitesi Deney hayvanları Etik Kurulu”ndan etik kurul onayı alındıktan sonra Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenerek (01/2007-91), Gazi Üniversitesi Nöropsikiyatri Eğitim, Uygulama ve Araştırma Merkezi Nörobilim Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi.

III.1. Denekler

Çalışmamızda 200-250 gram ağırlığında, erişkin erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar üçlü veya dörtlü gruplar halinde tabanında 3-6 cm kalınlığında talaş bulunan sert zemine sahip şeffaf kafeslerde tutuldular. Kafesler, dışarıdan gelen ışığı geçirmeyen, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatılan, içerisinde ısının $22\pm2^{\circ}\text{C}$ olduğu özel bir bölümde saklandı (Resim 1 ve 2). Sıçanlar cerrahiden en az 7 gün öncesinden, araştırma bitimine kadar bu şartlar altında tutuldular.

Sıçanların sağ nazosilier sinirlerine ligasyonu uygulanırken, sol taraflarına ise sham operasyonu uygulandı.



Resim 1: Kafeslerin tutulduğu bölüm



Resim 2: Kafes ortamında sıçanlar

III.2. Cerrahi, Başağrısı Modelinin Oluşturulması

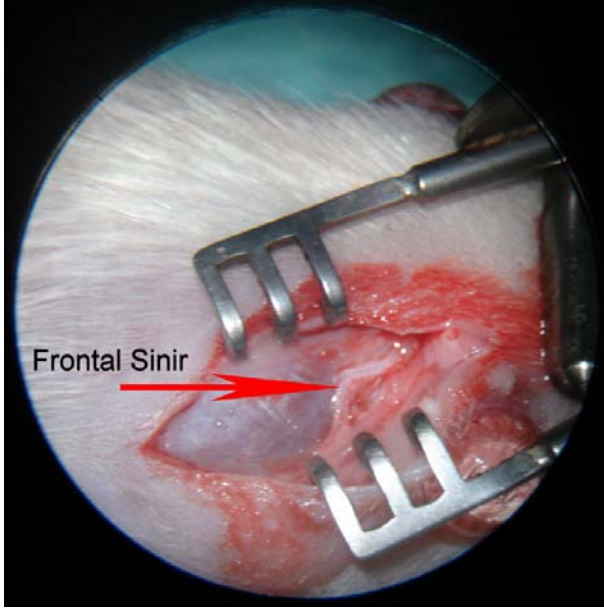
Başağrısı modeli, trigeminal sinirin oftalmik dalının uç dallarından biri olan nazosilier sinir ligasyonu yapılarak oluşturuldu.

Bir gece öncesinden aç bırakılan sıçanlara 50 mg kg^{-1} intraperitoneal ketamin %10 (Ketalar®)-ksilazin %2 (Rompun®) karışımının enjeksiyonu ile anestezi verildi. Daha sonra cerrahi uygulanacak saha tıraş edildi ve sıçanlar elektrik kontrollü ısıtıcı battaniye üzerine, pron pozisyonda stereotaksik çerçeveye yerleştirildi (Resim 3).

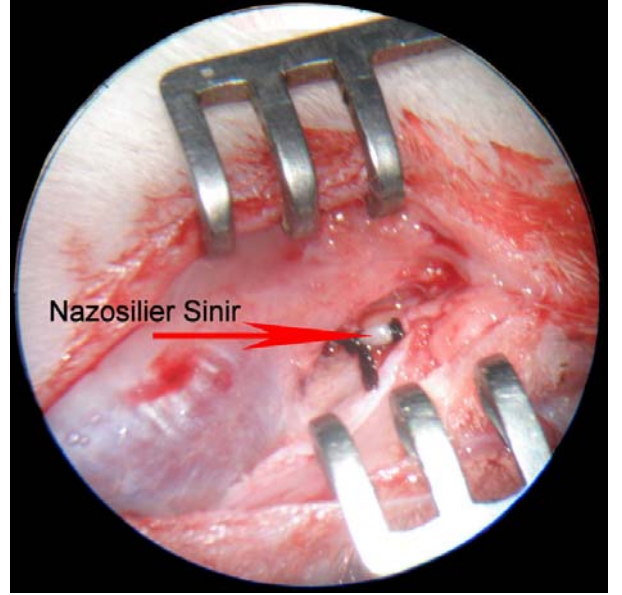


Resim 3: Anestezi sonrası stereotaksik çerçeveye yerleştirilmiş sıçan

Cilt antisepsisi sağlandıktan sonra, sağ orbita çukurunun 2-3 mm medialinden cilt ve cilt altı dokuların insizyonu gerçekleştirildi. Frontal sinir, cerrahi mikroskop altında, fasyanın künt diseksiyonu ile belirlendikten sonra, orbita içine doğru sinirin trasesi takip edilerek sağ nazosilier sinir lokalize edildi. Sağ nazosilier sinir, 5-0 ipek cerrahi suture ile yaklaşık 1 mm uzaklıktaki iki ayrı noktadan sıkıca bağlandı (Resim 4-5). Sham operasyonu için ise deneklerin sol orbita çukurunun 2-3 mm medialinden insizyon açılarak, nazosilier sinir lokalize edildikten sonra ligasyon uygulanmadı.



Resim 4: Cilt insizyonu ve frontal sinir



Resim 5: Nazosilier sinirin ligasyonu

İşlem sırasında deneklerin rektal ısısı kontrol edildi. Kanama kontrolü yapıldıktan sonra cilt ve cilt altı dokular uygun şekilde kapatılarak cerrahi işlem sonlandırıldı (Resim 6). Cerrahi insizyon bölgesine Emla krem® (AstraZeneca) uygulandıktan sonra denekler kafeslerine alınarak uyanmaları beklendi.



Resim 6: Cilt insizyonun kapatılması

III.3. Davranışsal Testler

Tüm sıçanların cerrahiden sonraki 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 35. ve 40. günlerde periorbital bölgeleri, taktıl allodini yönünden von Frey filamentleri, fırça allodinisi için sulu boya fırçası ile bilateral olarak değerlendirildi. Ayrıca aynı günlerde sıçanların periorbital bölgelerinin bilateral termal cevapları belirlendi.

III.3.A. Sıçanların davranış testlerinin gerçekleştiği düzeneklere yerleştirilmesi

Sıçanlar, tahtadan yapılan 50 cm yükseklikte ve 8 cm çapındaki düzeneklere yerleştirildi (Resim 7). Daha sonra sıçanların bu ortama alışmaları için yaklaşık 30 dakika beklenildi. Bu sırada eğer sıçanlar, düzenekten atarlarsa nazikçe kuyruklarından tutularak tekrar yerleştirildi.



Resim 7: Davranış testlerinin gerçekleştiği düzenek

uygulandı (Resim 9). Sıçanların başlarını çekmeleri pozitif yanıt olarak kabul edildi. Eğer uygulanan filamente yanıt alınamazsa uyarı bir kademe artırılarak bir numara büyük von Frey filamentine geçildi. Buna karşın, yanıt alınması durumunda bir küçük boyutlu filament kullanıldı (up and down yöntemi). Sıçanların başlarını geri çekme eşik (withdrawal threshold) değerleri, yanıt paternlerine dayanılarak Dixon'un nonparametrik istatistik yöntemi ile hesaplandı (15).



Resim 9: Takdil allodininin von Frey filamentleri ile değerlendirilmesi

III.3.C. Fırça ile değ rlendirilen mekanik allodini

Fırça allodinishi değ rlendirmek için 2 no'lu fırça kullanıldı. Sıçanların periorbital bölgesindeki cildine cerrahiden sonraki 12. 15, 18, 21, 24, 27, 30, 35 ve 40. günlerde önce sinir ligasyonu yapılmayan taraf, daha sonra ligasyon yapılan taraf olmak üzere bilateral fırça uygulandı (Resim 10). Sıçanların ba larını çekmeleri pozitif yanıt olarak kabul edildi.



Resim 10: Fırça ile allodininin değ rlendirilmesi

III.3.D. Termal eşik değerlerinin değerlendirilmesi

Sıçanların termal uyarıya yanıtlarını değerlendirmek için cerrahiden sonraki 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 35 ve 40. günlerde 5 wattlık 1.0 cm çapındaki ısı kaynağı periorbital bölgelerine temas ettirilerek ısı 35°C'den başlayarak yavaş yavaş artırıldı (Resim 11). Başlarını çekmeleri pozitif yanıt olarak kabul edildi ve bu yanıtı verdikleri ısı değerleri kaydedildi.



Resim 11: Termal cevap için kullanılan alet ve sıçanda termal cevabın değerlendirilmesi

III.4. Perfüzyon ve dokuların hazırlanması

Nazosilier sinir ligasyonunun 45. gününde, bilateral periorbital bölgelerine 8'er dakika fırça uygulandıktan 2 saat sonra, sıçanlara letal doz (100 mg kg⁻¹) tiyopental intraperitoneal verilerek, perfüzyona alındı. Perfüzyonda transkardiak 100 mL heparinli % 0.9'luk NaCl ardından, 300-350 mL 0.1 M PBS %4 paraformaldehit kullanılarak fiksasyon sağlandı. Paraformaldehit solüsyonu 500 mL distile su içinde 40 gr paraformaldehit olacak şekilde hazırlandıktan sonra ağzı kapatılarak 60 °C' de ısıtıldı. Magnetik karıştırıcıda (ARE Heating magnetic stirrer) 10 dakika boyunca karıştırılırken NaOH eklendi ve solüsyon berrak hale getirilip soğumaya bırakıldı. Fosfat tamponu için 450 mL distile suya 0.144 gr KH₂PO₄, 9 gr Na₂HPO₄ eklendi. Daha önce hazırlanan 500 mL'lik solüsyonla karıştırılıp distile suyla 1000 mL'ye tamamlandı. Solüsyon pH'sı pH ölçer (pH 211 Mikroprocessol pHmeter) ile 7.4'e ayarlandı.

Kardiyak perfüzyon sonrası beyin, beyin sapı ve üst servikal dokular +4 °C'de 48 saat boyunca paraformaldehit solüsyonunda bekletildi. Daha sonra %30 sükröz solüsyonu içine konulan dokular dibe çöktükten sonra (yaklaşık 3 gün içinde) spinal kanalın ventraline mikroskop altında ince bir kesi yapılarak sol taraf işaretlendi, sliding mikrotomla (Leica) kuru buz ile donduruldu ve 50 µm'lik kesitler alındı.

III.5. C-Fos immünohistokimyasal çalışma

Boyamalarda elde edilen kesitlerin yanında pozitif kontrol (kortikal spreading depresyon) ve negatif kontrol grubu aynı anda boyandı. Kesitler 0.1 M PBS’de 3 kez 10’ar dakika yıkandıktan sonra, 10 mL PBS ve 100 µm %30 H₂O₂ karıştırılarak hazırlanan solüsyonla oda sıcaklığında 30 dk boyunca H₂O₂ blokajı yapıldı. Kesitler tekrar 3 kez 10’ar dakika yıkandıktan sonra, 9800 µL PBS, 200 µL keçi serumu ve 30 µL tritonX karıştırılarak hazırlanan solüsyonla oda sıcaklığında 2 saat boyunca protein blokajı uygulandı. Daha sonra primer antikor aşamasına geçildi ve blokaj solüsyonuna ilave edilen 1/5000 dilüsyonda c-fos antikoruna ile (Calbiochem, USA) +4 °C’de 1 gece bekletildi. Ertesi gün 3 kez 10 dk PBS’de yıkama sonrasında sekonder antikor aşamasında, 1mL % 2’lik keçi serumu, 1/600 biyotinilated rabbit IgG, % 0.3 triton X’le hazırlanan solüsyonda oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Tekrar 3 kez 10’ar dakika PBS’de yıkandıktan sonra, 5 mL PBS içine 1 damla A, 1 damla B solüsyonuyla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Tekrar PBS’le yıkama yapıldıktan sonra kesitler hafif kahverengi olana dek 1-5 dakika bekletildi ve boyanmaları sağlandı. Diaminobenzidin (DAB) aşaması sonrası kesitler yıkandıktan sonra lam üzerine dizilerek kurumaya bırakıldı. Dokular kuruduktan sonra 10 dk % 75’lik alkolde, 10 dk % 90’lık alkolde, 10 dk % 100’lük alkolde bekletildi. Daha sonra 10 dakika kurutulmaya bırakıldı. Dokular 10-20 dakika ksilen solüsyonunda bekletildikten sonra, kapatma solüsyonu (vecta mount) damlatılıp lamelle kapatıldı. C-fos pozitif hücreler ışık mikroskopunda (Nikon ECLIPSE TE 2000-U) sayıldı. Sayımlar rat anatomi atlasına bakılarak trigeminal nükleus kaudaliste (obeks 2-2.5 mm altındaki beyin sapında) nosiseptif laminalarda (lamina 1 ve 2) yapıldı.

III.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel değerlendirme SPSS 15.0 bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirildi. Nazosiliyer ligasyon uygulanan ve uygulanmayan taraflar arasında istatistiksel karşılaştırmalar normal dağılıma benzerlik gösteren varyasyon katsayısı % 10 altındaki değişkenler için bağımlı gruplar Student-t, normal dağılmayan ve ordinal değişkenler için Wilcoxon, dikotom değişkenler için ise McNemar testi kullanılarak yapılmıştır. Yüksek derecede korelasyon gösteren zamanlar arasında çoklu karşılaştırma için ek düzeltme uygulanmamıştır. İstatistiksel anlamlılık için tip bir hata sınırı %5 olarak kullanılmıştır.

IV. BULGULAR

IV. 1. Von Frey filamentleri ile değ rlendirilen mekanik allodini

Operasyon öncesinde kontrol ölçümlerinde, sağ ve sol taraftaki von Frey e ik değerlerinin her ikisinin de ortancası 10 (10-10) gram olarak tespit edildi.

Operasyondan sonra 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 35. ve 40. günlerde nazosilier sinirin bağlandığı sağ taraftaki von Frey e ik değerlerinin ortancası sırasıyla 1.91 (0.11-5.31), 1.91 (1.01-5.31), 2.81 (1.01-5.31), 1.01 (0.21-2.09), 1.01 (0.21-2.81), 2.09 (0.21-5.31), 1.91 (0.21-2.09), 1.91 (0.21-1.91), 1.91 (0.21-2.81) gram iken; nazosilier sinirin bağlanmadığı sol tarafta ise 10 (10-10), 10 (10-10), 10 (10-10), 10 (2.81-10), 10 (2.81-10), 10 (10-10), 10 (5.31-10), 10 (5.31-10), 10 (5.31-10) olarak tespit edildi. Sağ taraf von Frey e ik değerleri sol taraf von Frey e ik değerlerine göre anlamlı azaldığı tespit edildi ($p<0.05$).

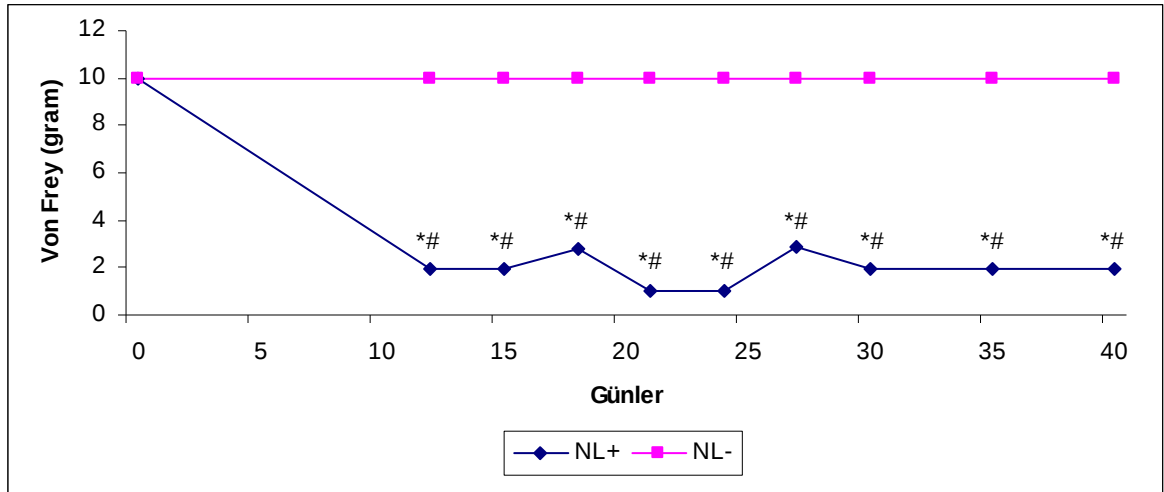
Operasyondan sonra 12. 15, 18, 21, 24, 27, 30, 35. ve 40. günlerde nazosilier sinirin bağlanmadığı sol taraftaki von Frey e ik değerleri, kontrol değeri ile karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı. Operasyondan sonra 12. 15, 18, 21, 24, 27, 30, 35. ve 40. günlerde nazosilier sinirin bağlandığı sağ taraftaki von Frey e ik değerleri, kontrol değeri ile karşılaştırıldığında ise 12. günden itibaren anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($p<0.05$).

Tablo I: Von Frey eşik değerlerinin karşılaştırılması [Ortanca (En düşük- En yüksek)]

	Nazosilier ligasyon + (NL+)	Nazosilier ligasyon - (NL-)
Kontrol	10 (10-10)	10 (10-10)
12. gün	1.91 (0.11-5.31) *#	10 (10-10)
15. gün	1.91 (1.01-5.31) *#	10 (10-10)
18. gün	2.81 (1.01-5.31) *#	10 (10-10)
21. gün	1.01 (0.21-2.09) *#	10 (2.81-10)
24. gün	1.01 (0.21-2.81) *#	10 (2.81-10)
27. gün	2.09 (0.21-5.31) *#	10 (10-10)
30. gün	1.91 (0.21-2.09) *#	10 (5.31-10)
35. gün	1.91 (0.21-1.91) *#	10 (5.31-10)
40. gün	1.91 (0.21-2.81) *#	10 (5.31-10)

* $p < 0.05$ NL+ ve NL- karşılaştırıldığında

$p < 0.05$ kontrol değeri ile karşılaştırıldığında



* $p < 0.05$ NL+ ve NL- karşılaştırıldığında

$p < 0.05$ kontrol değeri ile karşılaştırıldığında

Şekil I : Von Frey eşik değerlerinin karşılaştırılması (Ortanca)

IV. 2. Termal eşik değerleri

Operasyon öncesinde kontrol ölçümlerinde, termal eşik değerleri sol tarafta 38.74 ± 0.15 °C olarak değerlendirilirken; nazosilier sinirin bağlanacağı sağ tarafta 38.73 ± 0.14 °C idi. Operasyon öncesinde kontrol ölçümlerinde sağ ve sol taraf arasında anlamlı fark saptanmadı.

Operasyondan sonra 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 35 ve 40. günlerde nazosilier sinirin bağlanmadığı sol taraftaki termal eşik değerleri 38.11 ± 0.30 °C, 38.69 ± 0.60 °C, 39.2 ± 1.13 °C, 38.43 ± 0.46 °C, 39.26 ± 0.27 °C, 39.21 ± 0.69 °C, 39.21 ± 0.33 °C, 38.91 ± 0.26 °C, 39.17 ± 0.35 °C iken; nazosilier sinirin bağlandığı sağ tarafta ise 35.9 ± 0.61 °C, 35.89 ± 0.65 °C, 36.03 ± 0.58 °C, 35.7 ± 0.67 °C, 35.89 ± 0.54 °C, 35.71 ± 0.67 °C, 35.34 ± 0.44 °C, 35.18 ± 0.55 °C, 35.61 ± 0.43 °C olarak tespit edildi. Sağ ve sol taraf arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.05$).

Operasyondan sonra 15, 18, 21, 24, 27, 30, 35. ve 40. günlerde nazosilier sinirin bağlanmadığı sol taraftaki termal eşik değerleri kontrol değeri ile karşılaştırıldığına anlamlı fark saptanmadı. Operasyondan sonraki sadece 12. günde nazosilier sinirin bağlanmadığı sol taraftaki termal eşik değerleri, kontrol değeri ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p = 0.0055$).

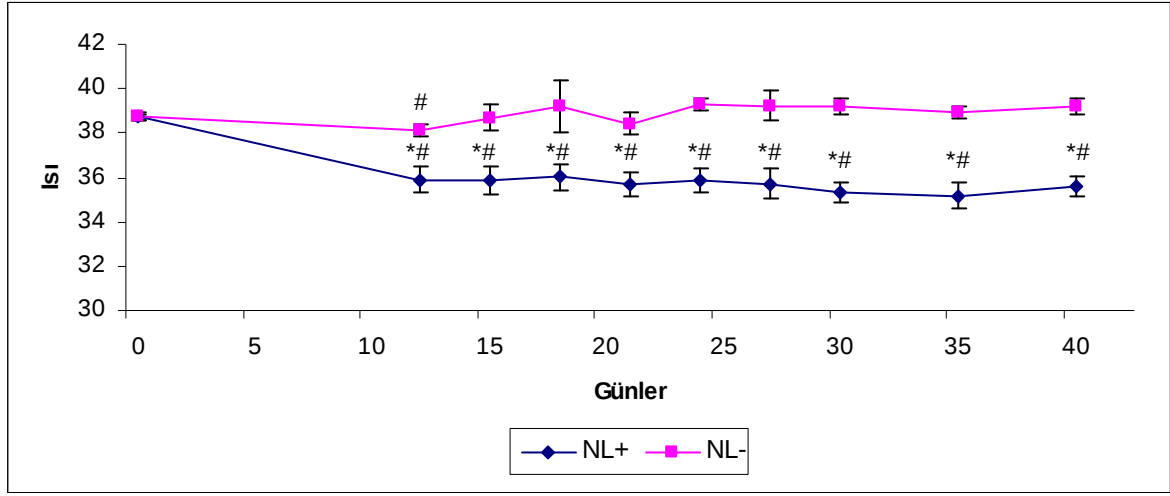
Operasyondan sonra 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 35. ve 40. günlerde nazosilier sinirin bağlandığı sağ taraftaki termal eşik değerleri kontrol değeri ile karşılaştırıldığına ise 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 35. ve 40. günlerdeki değerlerin kontrol değerine göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($p < 0.001$).

Tablo II: Termal eşik değerlerinin karşılaştırılması (Ort $\pm$ SS)

	Nazosilier ligasyon + (NL+)	Nazosilier ligasyon - (NL-)
Kontrol	38.73 $\pm$ 0.14	38.74 $\pm$ 0.15
12. gün	35.97 $\pm$ 0.61 *#	38.11 $\pm$ 0.30#
15. gün	35.89 $\pm$ 0.65 *#	38.69 $\pm$ 0,60
18. gün	36.03 $\pm$ 0.58 *#	39.2 $\pm$ 1.13
21. gün	35.7 $\pm$ 0.53 *#	38.43 $\pm$ 0.46
24. gün	35.89 $\pm$ 0.54 *#	39.26 $\pm$ 0.27
27. gün	35.71 $\pm$ 0.67 *#	39.21 $\pm$ 0.69
30. gün	35.34 $\pm$ 0.44 *#	39.21 $\pm$ 0.33
35. gün	35.18 $\pm$ 0.55 *#	38.91 $\pm$ 0.26
40. gün	35.61 $\pm$ 0.43 *#	39.17 $\pm$ 0.35

* p<0.05 NL+ ve NL- karşılaştırıldığında

p<0.05 kontrol değeri ile karşılaştırıldığında



* $p < 0.05$ NL+ ve NL- karşılaştırıldığında

$p < 0.05$ Kontrol değeri ile karşılaştırıldığında

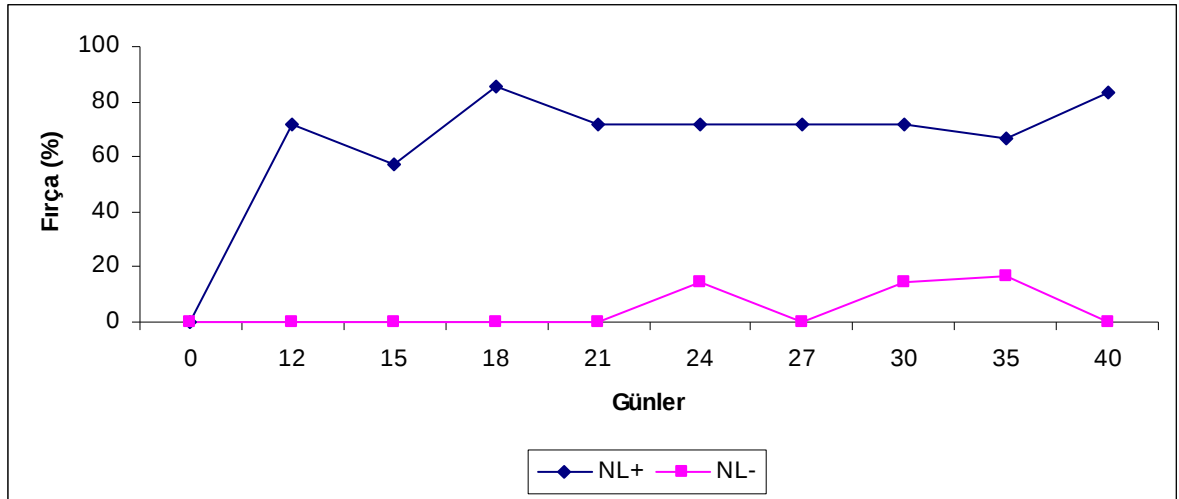
Şekil II: Termal eşik değerlerinin karşılaştırılması (Ort $\pm$ SS)

IV. 3. Fırça ile değerlendirilen mekanik allodini

Fırça ile mekanik allodini değerlendirildiğinde operasyondan sonra 12. günden itibaren farklılık görülmeye başlanmıştır. Yapılan istatistik testinin anlamlılık derecesi istatistiksel önemlilik sınırına yakındır ($p=0.063$, Mc Nemar testi). 40. güne kadar ufak değişimler olmakla birlikte 40. günde de bu farklılık korunmaktadır ($p=0.063$). Sağ ve sol taraf arasında maksimum fark 18. günde gözlenmiştir ($p=0.031$).

Tablo III: Fırça ile değerlendirilen mekanik allodininin karşılaştırılması (% pozitif cevap)

	Nazosilier ligasyon + (NL+)	Nazosilier ligasyon - (NL-)
Kontrol	0	0
12. gün	71.4	0
15. gün	57.1	0
18. gün	85.7	0
21. gün	71.4	0
24. gün	71.4	14.3
27. gün	71.4	0
30. gün	71.4	14.3
35. gün	66.7	16.7
40. gün	83.3	0



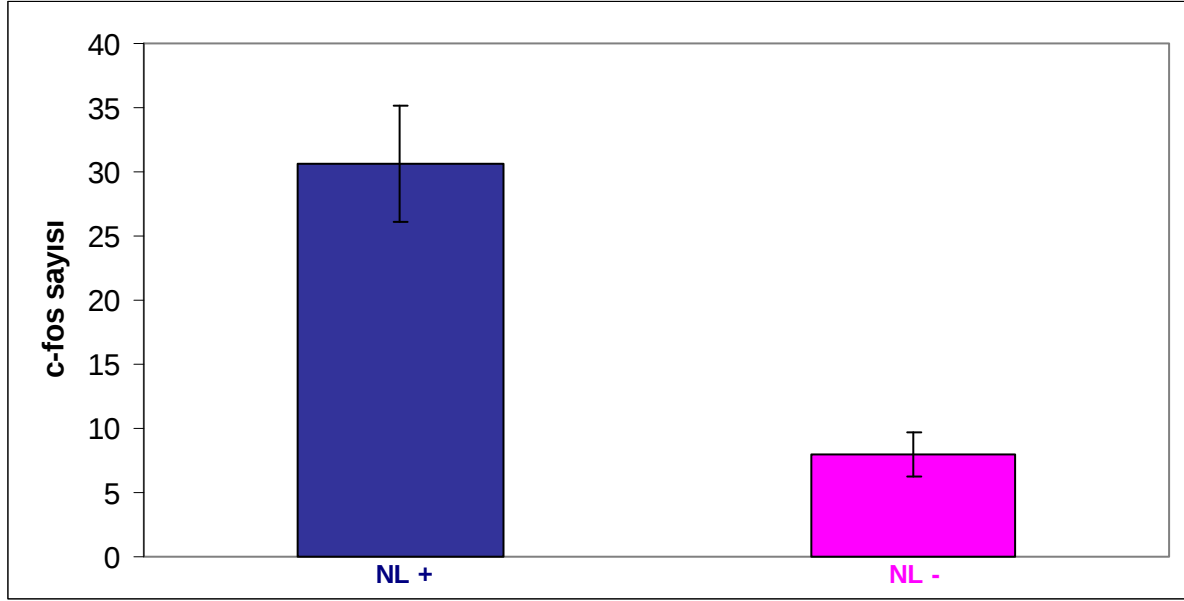
Şekil III: Fırça ile değerlendirilen mekanik allodininin karşılaştırılması (% pozitif cevap)

Sıçanlar, operasyondan 12 gün sonra hiperaljezi ve allodini yönünden değerlendirilirken 12. günden itibaren nazosilier sinirin bağlandığı sağ tarafa von Frey filamentleri, fırça veya termal uyarı uygulandıktan hemen sonra “grooming” davranışlarının o tarafta belirgin olarak arttığı gözlemlendi.

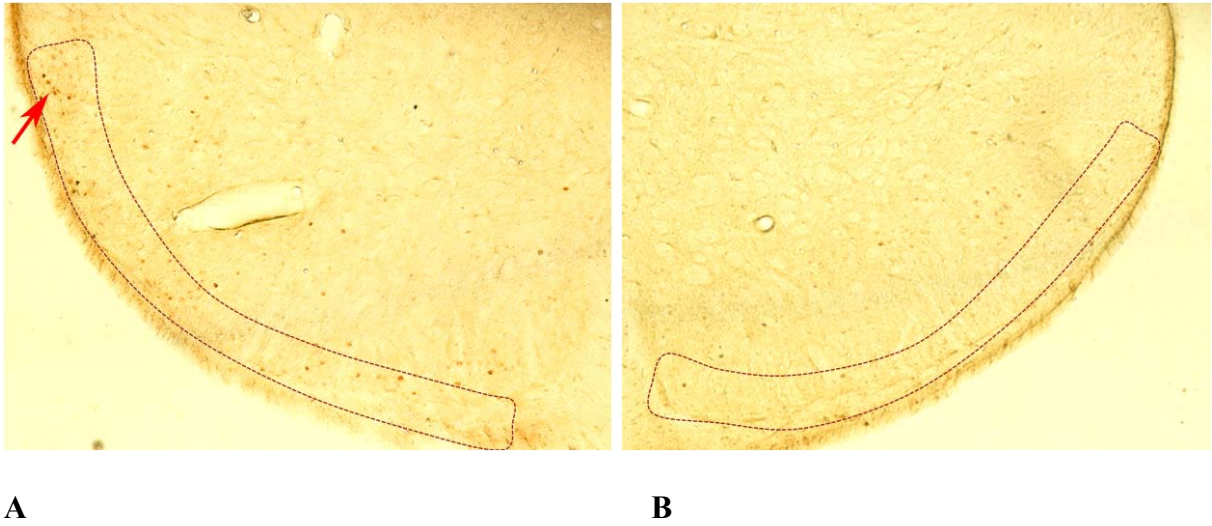
IV. 4. TNC kesitlerindeki C- fos sayımları

Değerlendirilen TNC kesitlerinde, nazosilier sinir ligasyonunun uygulanmadığı tarafta az sayıda c-fos pozitif nöron saptandı. Bu nöronların belirli bir kümelenme göstermeden tüm laminalarda dağınık olduğu gözlemlendi. Nazosilier sinir ligasyonunun uygulandığı tarafta ise lamina I ve II’de c-fos pozitif nöronların nazosilier sinir ligasyonunun uygulanmadığı tarafla karşılaştırıldığında daha fazla olduğu tespit edildi.

Nazosilier sinir ligasyonunun uygulandığı tarafta, lamina I ve II’de c-fos pozitif nöronların sayısı 30.63 ± 4.49 iken; nazosilier sinir ligasyonunun uygulanmadığı tarafta ise 7.93 ± 1.69 olarak bulundu, iki taraf arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p=0.042$, Wilcoxon testi).



Şekil 4: Nazosilier sinir ligasyonunun uygulandığı tarafta (NL+) ve uygulanmadığı tarafta (NL-) Lamina I-II'deki c-fos pozitif hücre sayısı



Şekil 5: Nazosilier sinir ligasyonunun uygulandığı tarafta Lamina I-II'deki c-fos pozitif hücre dağılımının (A), nazosilier sinir ligasyonunun uygulanmadığı tarafta c-fos pozitif hücre dağılımına (B) göre belirgin şekilde artmış olduğu görüldü.

40. günde ki fırça allodinisine cevaplar Lamina I-II'deki c-fos pozitif hücre sayımı ile değerlendirildiğinde ise nazosilier sinir ligasyonun uygulandığı sağ taraftaki c-fos hücre sayısının, sol tarafla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğu ve hepsinin fırça testinde allodini yanıt verdiği gözlemlendi.

V. TARTIŞMA

Çalışmamızın sonucunda nazosilier sinir ligasyonu uygulanan tarafta, sham operasyonun yapıldığı tarafla karşılaştırıldığında; 12. günden itibaren von Frey eşik değerlerinde ve termal eşik değerlerinde anlamlı olarak azalma olduğu ve bu azalmanın 40. günde de devam ettiği saptandı. Ayrıca nazosilier sinir ligasyonu uygulanan tarafta 12. günden itibaren fırçaya pozitif cevap yüzdelerinin, sham operasyonun yapıldığı tarafa göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Operasyondan 45 gün sonra perfüzyon yapılarak TNC'deki c-fos ekspresyonu incelendiğinde ise sinir ligasyonunun uygulandığı tarafta lamina I ve II'de c-fos pozitif nöronların sayısının, nazosilier sinir ligasyonunun uygulanmadığı tarafa göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı.

Trigeminovasküler sistem aktivasyonunun başağrısındaki rolü bilinmektedir (22, 24, 49). Buna rağmen trigeminovasküler sistem aktivasyonunu ile ilgili çok fazla deneysel model bulunmamaktadır. Homojen grup sağlanmasının güçlüğü, bazı işlemlerin ve incelemelerin uygulanmasının mümkün olmaması gibi nedenler, klinikte başağrısı ile araştırma yapmakta zorluklara yol açmaktadır. Bu nedenle bu alandaki gelişmeler ancak hayvan deneyleri ile mümkün olmaktadır. Başağrısı mekanizmalarının incelenmesi, ağrıyı tetikleyen uyaranların saptanması ve uygun tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi için çeşitli hayvan modelleri oluşturulmuştur. Bu nedenle biz de bu çalışmada farklı bir deneysel kronik başağrısı modeli oluşturarak deneklerin davranış değişikliklerini, nöropatik ağrı belirtilerini ve TNC'deki c-fos ekspresyonunu araştırdık.

Hayvan modellerinde ağrı bulgularının yanı sıra uyarı sonucu oluşan bazı davranış bozukluklarının değerlendirilmesi ağrının karakterini belirlemekte, mekanizmalarını anlamakta ve yeni tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Santral sensitizasyon sonrasında oluşan hiperaljezi ve allodini gibi davranış bozukluklarının belirlenmesi de bu nedenle önemlidir. Biz de bu nedenle çalışmamızda nazosilier sinir ligasyonu sonrasında, deneklerin mekanik ve termal uyarılara verdikleri cevaplardaki değişiklikleri değerlendirdik.

Santral sensitizasyonun, travma sonrası ağrı hipersensitivitesindeki rolü ilk kez sıçan spinal kordunda gösterildikten sonra çeşitli insan ve hayvan modellerinde de benzer çalışmalar yapılmıştır (29, 35, 37, 48, 57, 65). Santral sensitizasyonda klinik olarak ağrı eşiklerinde düşme ile birlikte ağrı bölgesinin dışında aşırı ağrı cevabı görülmektedir (42, 64).

Baş ağrısı ile birlikte yüzde de ağrılı bölgeler görülebilmektedir. Meninkslerdeki nosiseptörlerinin, baş ağrısı patofizyolojisinde önemli rolü olduğu bilinmektedir. Beyin cerrahisinde intrakranial ameliyatlarda, uyanık hastalarda meninkslere mekanik ve elektriksel uyarı uygulandığında yüzde de uyarı olduğu görülmüştür. Bu durum derin ve yüzeysel afferent uyarıların spinal ve medüller arka kökteki ortak santral nöronlarda birleşmesine bağlıdır. Meninkslerden ve yüzden gelen trigeminal nosiseptif afferentler medüller arka kökteki spinal trigeminal nükleuslara ulaşmaktadırlar (22).

Medüller arka kök derin laminalarındaki trigeminovasküler nöronlarda, santral sensitizasyon, oluşabilmektedir. Migren baş ağrısının patogenezinde bu sensitize nöronların rolünün olduğu düşünülmektedir (12). Sıçan durasına inflamatuvar ajanların uygulanması ile trigeminovasküler yolak aktive olmakta ve bunun sonucunda intrakranial dura ve periorbital

ciltten gelen uyarıları alan medullar arka kök nöronlarının uzun süreli sensitizasyonu sağlanmaktadır (10, 52). Bu nöronal sensitizasyon sonucunda duranın mekanik, cildin mekanik ve termal uyarıya cevabının eşiği düşmekte, şiddeti artmakta ve uyarılabilen alanlar genişlemektedir (10).

Nöropatik ağrı modelleri içinde parsiyel siyatik sinir ligasyon ve kronik konstriksiyon hasarı modelleri sıklıkla kullanılırken, trigeminovasküler sistemin aktivasyonu ile ilgili fazla deneysel model bulunmamaktadır (3, 18, 53). Yapılan çalışmalarda sıklıkla duranın kimyasal veya elektriksel stimülasyonu ile ilgili modeller kullanılmaktadır (10, 22, 46, 67). Kronik konstriksiyon hasarı oluşturmak için ise infraorbital sinir ligasyon modelleri tercih edilmiştir (17, 61). Oysa başağrısına aracılık eden trigeminal aktivasyonda, oftalmik dalın önemli rol oynadığı gösterilmiştir (22). Bu nedenle çalışmamızda trigeminal sinirin oftalmik dalı olan nazosilier sinir ligasyonu ile trigeminal aktivasyon oluşturmayı amaçladık.

Hiperaljezi ve allodininin belirlenmesi için mekanik, soğuk ve sıcak uyarıların uygulandığı düzenekler bulunmaktadır. Oshinsky ve arkadaşları (46) uyanık sıçanlarda, epizodik dural stimülasyon uyguladıkları çalışmalarında, iç çapı 8 cm, uzunluğu 25 cm olan plastik tüpten oluşan bir düzenek kullanmışlardır. Bu düzende sıçanların ileri geri hareket etmeleri mümkün değilken, ancak zorlukla kendi etraflarında dönebilmeleri mümkün olabilmektedir. Deseure ve arkadaşları (17) tarafından yapılan, infraorbital sinirin kronik konstriksiyonu sonrası davranış değişikliklerinin değerlendirildiği çalışmada ise sıçanlar 24×14×17 cm'lik plastik kafeste 10 dakika tutulup bu ortama alıştırıldıktan sonra 40×40×30 cm'lik daha büyük bir kafese alınmışlardır. Çalışmamızda sıçanların bulundukları ortam nedeniyle oluşabilecek stres davranışlarından da kaçınmak için daha

önce de kullanılan bir düzenekte çalışmamızı gerçekleştirmeye karar verdik. Bu nedenle davranış testleri, tahtadan yapılan 50 cm yükseklikte ve 8 cm çapındaki düzeneklerde uygulandı (23). Sıçanların bu düzeneklere kısa sürede alıştıkları ve hatta bir süre sonra uyudukları gözlemlendiği için bu ortamın ek bir stres oluşturmadığını düşünüyoruz.

Hiperaljezi değerlendirilmesinde kullanılan düzeneklerde uygulanan uyarıya cevabın normal mi, yoksa hiperaljezi mi olduğunu ayırt etmek her zaman mümkün olmayabilir. Bu nedenle klinikte allodiniyi değerlendirmekte genellikle takdil allodini tercih edilmektedir.

Burstein ve arkadaşları (10), duranın kimyasal stimülasyonu ile fasial uyarıya beyin sapındaki trigeminal nöronların cevabını değerlendirdikleri çalışmalarında, von Frey filamentleri ile durada mekanik stimülasyona duyarlılığın arttığını tespit etmişlerdir. Yamamura ve arkadaşları (67) yaptıkları çalışmada, sıçanların duralarının uyarılması ile oluşan santral sensitizasyon sonucunda ağrısız uyarılara karşı bile artmış kardiyovasküler ve trigeminal nöronal yanıt geliştiğini göstermişlerdir. Oshinsky ve arkadaşları (46) uyanık sıçanlarda, epizodik dural stimülasyon uyguladıkları çalışmalarında yine GTN sonrası periorbital von Frey eşiklerinin düştüğünü göstermişlerdir.

Çalışmamızda operasyondan sonra 12. günden itibaren sensitizasyon gelişmesine bağlı olarak, nazosilier sinirin bağlandığı sağ taraftaki von Frey eşik değerleri, nazosilier sinirin bağlanmadığı taraftaki eşik değerlerine göre anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p<0.05$). Diğer çalışmalarda von Frey filamentleri ile tespit edilen hiperaljezi ve allodini cevapları benzer şekilde nazosilier sinir ligasyonu sonrasında da görülmüştür. İnsanlarda da

migren atağı sırasında eşiklerin düştüğü ve bunun sonucunda da sensitizasyonun oluştuğu gösterilmiştir (9, 11, 12).

Termal cevap da santral sensitizasyonun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Burstein ve arkadaşları (10), duranın stimülasyonu ile beyin sapındaki trigeminal nöronlardaki fasial uyarı cevabının arttığını gösterdikleri çalışmalarında, nöronların çoğunda kütanöz ısı hassasiyetinin arttığını saptamışlardır. Yamamura ve arkadaşları (67) da yaptıkları çalışmada, sıçanların duralarının uyarılması ile oluşan santral sensitizasyon sonucunda termal uyarıya verilen cevap eşiğinin düştüğünü göstermişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, benzer şekilde operasyondan sonra 12. günden itibaren sensitizasyonla uyumlu olarak, nazosilier sinirin bağlandığı sağ taraftaki termal eşik değerlerinin, nazosilier sinirin bağlanmadığı taraftaki termal eşik değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($p<0.05$). Operasyondan sonra 15. günden itibaren nazosilier sinirin bağlanmadığı sol taraftaki termal eşik değerleri kontrol değeri ile karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı. Operasyondan sonraki sadece 12. günde nazosilier sinirin bağlanmadığı sol taraftaki termal eşik değerleri kontrol değeri ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p=0.0055$). Bu farkın nedeni 12. günde insizyona bağlı periferik hassasiyetin devam etmesi olabilir. 15. günden sonra ise insizyonun iyileşmesi ile periferik hassasiyet kaybolması nedeniyle farkın kaybolduğunu düşünüyoruz.

Brush allodini de mekanik allodininin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerden biridir. Ellrich ve arkadaşlarının (22) sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada, orta serebral arter yakınlarındaki parietal duramaterin elektriksel uyarısı sonrasında; trigeminal sinirin supraorbital, infraorbital ve mental dallarına ait dermatomlarının fırça ve forsepsle

uyarılması ile oluşan değişiklikler değerlendirilmiştir. Burstein ve arkadaşları (10), duranın kimyasal stimülasyonu ile fasial uyarıya beyin sapındaki trigeminal nöronlardaki cevabını değerlendirdikleri çalışmalarında, nöronların çoğunda fırçaya yanıtın arttığını saptamışlardır. Yamamura ve arkadaşları (67) da yaptıkları çalışmada benzer şekilde, sıçanların duralarının uyarılması ile oluşan santral sensitizasyon sonucunda fırçaya verilen cevabın arttığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda da fırça ile mekanik allodini değerlendirildiğinde operasyondan sonra 12. günden itibaren farklılık görülmeye başlanmıştır. Yapılan istatistik testinin anlamlılık derecesi istatistiksel önemlilik sınırına yakındır ($p=0.063$, Mc Nemar testi). 40. güne kadar ufak değişimler olmakla birlikte 40. günde de bu farklılık korunmaktadır ($p=0.063$). Lamina I-II'deki c-fos pozitif hücre sayımı değerlendirildiğinde ise nazosilier sinir ligasyonunun uygulandığı sağ taraftaki c-fos hücre sayısının, sol tarafla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olması ile birlikte hepsinin fırça testinde allodini yanıt verdiği gözlemlendi.

Sensitizasyonla ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda sıçanlarda sensitizasyon sonrası “grooming” adındaki davranışın artıp artmadığı incelenmiştir (17, 61). Çalışmamızda da benzer şekilde, operasyondan sonra nazosilier sinirin bağlandığı sağ tarafta özellikle von Frey filamentleri, fırça veya termal uyarı uygulandıktan hemen sonra “grooming” davranışının belirgin olarak arttığı gözlemlendi. Ağrıya verilen bir yanıt olarak çıkan bu davranış sensitizasyon geliştiğinde artmaktadır. Bu davranışın değerlendirilmesi önceden planlanmadığından sinir ligasyonu öncesi ve sonrası; sağ veya sol taraftaki sayısal farklılıklar belirlenmedi. Ancak bu konuda ileride yapılacak çalışmaların, bu farklılıkların değerlendirilmesine yardımcı olabileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda nazosilier sinir ligasyonunun uygulandığı tarafta von Frey eşiğinin ve termal eşiğin azaldığı, fırçaya karşı gelişen allodini yüzdesinin ise arttığı tespit edilmiştir. Bu değişikliklerin ilk ne zaman ortaya çıktığı ise belirlenememiştir. Ayrıca 40. günde halen von Frey eşiğinin, termal eşiğin düşüklüğü ve fırçaya karşı gelişen allodininin devam ettiği görülmüştür. Yapılacak daha uzun süreli çalışmalarla bu belirsizliklerin de aydınlatılabileceğini düşünüyoruz.

Baş ağrısı modellerinde trigeminovasküler sistemin aktivasyonunu kanıtlamak için baş ağrısı ile ilişkili beyin sapı çekirdeklerinde nosiseptif nöronlardaki c- fos ekspresyonu kullanılmıştır (7). Trigeminoasküler sinirin aktivasyonu ile beyin sapındaki ikinci sıra nöronlarda c-fos ekspresyonunun incelenmesi spesifitesi ve sensitivitesi yüksek bir yöntemdir. Biz de bu amaçla c-fos ekspresyonu göstermek için c-fos immünokimyasal yöntemi kullanmayı tercih ettik.

Filipkowski ve arkadaşları (23) sıçanlarda yaptıkları çalışmada fırça ile uyarı verdiklerinde veya yeni bir ortama koyduklarında, her iki durumda da c-fos ekspresyonunun oluştuğunu göstermişlerdir. Bester ve arkadaşları (4) da siyatik sinir hasarı sonrasında yüzeyel arka kökte c-fos ekspresyonunun indüklendiğini tespit etmişlerdir. Trigeminal sinir tarafından innerve edilen intra veya ekstrakranial yapıların mekanik, elektriksel veya kimyasal olarak uyarılması ile trigeminal nükleusta c-fos ekspresyonu indüklenebilmektedir. Migrendeki CSD'de TNC'de c-fos ekspresyonu tespit edilmiştir. Trigeminal nükleusun elektriksel uyarısı ile unilateral c-fos mRNA veya TNC'de yüzeyel seviyeler c-fos ekspresyonu gösterilmiştir. Bu çalışmamızın sonucunda, nazosilier sinir ligasyonunun beyin sapı TNC'de anlamlı oranda c-fos aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Nazosilier sinir

ligasyonunun uygulandığı tarafta c-fos dağılımının TNC kesitlerinde nosiseptif laminalarda yoğunluk göstermesi ve özellikle de trigeminal sinirin oftalmik dalının aktivasyonu açısından anlamlıdır. Nazosilier sinir ligasyonunun uygulandığı tarafta c-fos dağılımını yüzeyel laminalarda daha fazla olarak görülmüştür. Nazosilier sinir ligasyonunun uygulanmadığı tarafta ise c-fos dağılımının tüm laminalarda seyrek olduğu görülmüştür. Bu da nazosilier sinir ligasyonu ile c-fos ekspresyonunun oluştuğunu göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda ilk kez, trigeminal sinirin oftalmik dalı olan nazosilier sinir ligasyonu uygulanarak, sinir ligasyonu yapılan tarafta von Frey eşiğinde, termal eşikte azalmanın ve fırça allodinisi ile karakterize TNC'deki c-fos ekspresyonunda artmanın görüldüğü bir kronik baş ağrısı modeli oluşturulmuştur. Çalışmamızda uyguladığımız kronik baş ağrısı modelinin geliştirilmesinin, gelecekte klinikte yeni tedavi stratejilerinin oluşturulmasında katkıları olacağını düşünüyoruz.

VI. ÖZET

Trigeminovasküler sistem aktivasyonunun başağrısındaki rolü bilinmesine rağmen kronik başağrısında trigeminovasküler sistem aktivasyonunu ile ilgili literatürdeki model sayısı sınırlıdır. Bu nedenle çalışmamızda ratlarda farklı bir kronik başağrısı modeli oluşturmayı amaçladık.

Etik kurul kararı alındıktan sonra trigeminal sinirin oftalmik dalı olan nazosilier sinir ligasyonu uygulanarak oluşturulan kronik başağrısı modelinde 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 35 ve 40. günlerde deneklerin davranış değişiklikleri von Frey testi, fırça allodinisi, ısı testi ile değerlendirildi. Ayrıca nazosilier sinir ligasyonundan 45 gün sonra TNC'deki c-fos ekspresyonu incelendi.

Çalışmanın sonucunda nazosilier sinir ligasyonu uygulanan tarafta periorbital bölgede, sham operasyonun yapıldığı tarafla karşılaştırıldığında 12. günden itibaren von Frey eşik değerlerinde ve termal eşik değerlerinde anlamlı olarak azalma olduğu saptandı, bu azalma 40. günde de devam etmekteydi. Ayrıca nazosilier sinir ligasyonu uygulanan tarafta 12. günden itibaren fırçaya pozitif cevap yüzlerinin, sham operasyonun yapıldığı tarafa göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Operasyondan 45 gün sonra TNC'deki c-fos ekspresyonu incelendiğinde ise sinir ligasyonunun uygulandığı tarafta lamina I ve II'de c-fos pozitif nöronların sayısının, nazosilier sinir ligasyonunun uygulanmadığı tarafa göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı. Bu modelin geliştirilmesinin, gelecekte klinikte yeni tedavi stratejilerinin oluşturulmasında katkıları olacağını düşünüyoruz.

VII. SUMMARY

The role of trigeminovascular activation in headache is known but in literature there is only a few models observing the trigeminovascular activation in chronic headache. For this reason in the following research it is aimed to compose a different model of chronic headache.

As the Ethics Committee approval was obtained, after performing a chronic headache model with ligation of nasociliary nerve, ophthalmic branch of trigeminal nerve; responses of the rats to von Frey ligaments, brush and thermal stimulation is evaluated on the 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 35, 40th days. Also the c-fos expression in the TNC is examined after 45 days.

As a result, after 12 days in the right periorbital regions of the rats, where the nasociliary nerve ligation performed, the thresholds to von Frey ligaments and thermal stimulation are reduced compared to the left periorbital regions; and on the 40th day these results are still continuing. Also the percentages of the positive responses to brush are higher in the right periorbital regions compared to the left regions of the rats. After 45 days, when the c-fos expression in the TNC examined, the number of c-fos positive neurons in the lamina I and II are found to be higher in the right periorbital regions compared to the left regions. We believe that in the future the improvement of this model will give rise to the new treatment modalities in the clinical usage.

VII. KAYNAKLAR

1. Ahn AH, Goadsby PJ: Animal Models of Headache: The Headaches. Üçüncü Baskı. Olesen J, Goadsby PJ, Ramadan NM, Tfelt- Hansen P, Welch KMA (eds) Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2006, S. 95-111.
2. Allen GV, Barbrick B, Eser MJ. Trigeminal-parabrachial connection: possible pathway for nociception-induced cardiovascular reflex responses. Brain Res 715: 125-135, 1996.
3. Bennett GJ, Xie YK: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain 33: 87-107, 1988.
4. Bester H, Beggs S, Woolf CJ: Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush. J Comp Neurol 428 :45-61, 2000.
5. Bolay H, Moskowitz MA. Mechanisms of the Pain modulation in Chronic Syndromes. Neurology 59 (5Suppl 2): S2-7, 2002.
6. Bolay H, Moskowitz MA. The emerging importance of cortical spreading depression in migraine headache. Rev Neurol 161: 655-657, 2005.
7. Bolay H, Reuter U, Dunn A, Huang Z, Boas D, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. Nature medicine 8: 136-142, 2002.

8. Bove GM, Moskowitz MA: Primary afferent neurons innervating guinea pig dura. *J Neurophysiol* 77:299-308, 1997.
9. Burstein R, Cutrer MF, Yarnitsky D: The development of cutaneous allodynia during a migraine attack clinical evidence for the sequential recruitment of spinal and supraspinal nociceptive neurons in migraine. *Brain* 123: 1703-1709, 2000.
10. Burstein R, Yamamura H, Malick A, Strassman AM: Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. *J Neurophysiol* 79: 964-982, 1998.
11. Burstein R, Yarnitsky D, Goor-Aryeh I, Ransil BJ, Bajwa ZH: An association between migraine and cutaneous allodynia. *Ann Neurol* 47: 614-624, 2000.
12. Burstein R: Deconstructing migraine headache into peripheral and central sensitization. *Pain* 89: 107-110, 2001.
13. Buzzi MG, Carter WB, Shimizu T, Heath H 3rd, Moskowitz MA: Dihydroergotamine and sumatriptan attenuate levels of CGRP in plasma in rat superior sagittal sinus during electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neuropharmacology* 30:1193-1200, 1991.
14. Cervero F: Afferent activity evoked by natural stimulation of the biliary system in the ferret. *Pain* 13: 137-151, 1982.
15. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL: Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53: 55-63, 1994.
16. Coggeshall RE. Fos, nociception and the dorsal horn. *Progress in Neurobiology* 77: 299-352, 2005.

17. Deseure KR, Adriaensen HF: Comparison between two types of behavioral variables of non-evoked facial pain after chronic constriction injury to the rat infraorbital nerve. *Comp Med* 52: 44-49, 2002.
18. Dowdall T, Robinson I, Meert TF: Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacol Biochem Behav* 80: 93-108, 2005.
19. Draisci G, Iadarola MJ: Temporal analysis of increases in c-fos, preprodynorphin and preproenkephalin mRNAs in rat spinal cord. *Brain Res Mol Brain Res* 6: 31-37, 1989.
20. Drummond PD: Scalp tenderness and sensitivity to pain in migraine and tension headache. *Headache* 27: 45-50, 1987.
21. Edvinsson L, Goadsby PJ: Neuropeptides in migraine and cluster headache. *Cephalalgia* 14: 320-327, 1994.
22. Ellrich J, Andersen OK, Messlinger K, Arendt-Nielsen L: Convergence of meningeal and facial afferents onto trigeminal brainstem neurons: an electrophysiological study in rat and man. *Pain* 82: 229-337, 1999.
23. Filipkowski RK, Rydz M, Berdel B, Morys J, Kaczmarek L: Tactile experience induces c-fos expression in rat barrel cortex. *Learn Mem* 7: 116-122, 2000.
24. Fusco M, D'Andrea G, Miccicè F, Stecca AD, Bernardini A, Leon Cananzi, Neurogenic inflammation in primary headaches. *Neurol Sci* 24:S61-S64, 2003.
25. Glover JNM, Harrison SC: Crystal structure of the Heterodimeric bZIP TranscriptionFactor c-fos/c-Jun Bound to DNA. *Nature* 373: 257-261, 1995.

26. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R: Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system. *Ann Neurol* 23: 193-196, 1988.
27. Göbel H, Ernst M, Jeschke J, Keil R, Weigle L. Acetylsalicylic acid activates antinociceptive brain-stem reflex activity in headache patients and in healthy subjects. *Pain* 48: 187-195, 1992.
28. Headache Classification Committee of the International Headache Society. Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgia and facial pain. *Cephalalgia* 8: 1-96, 1988.
29. Hu JW, Sessle BJ, Raboisson P, Dallel R, Woda A: Stimulation of craniofacial muscle afferents induces prolonged facilitatory effects in trigeminal nociceptive brain-stem neurones. *Pain* 48: 53-60, 1992.
30. Hunt SP, Pini A, Evan G: Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328: 632-634, 1987.
31. Iadecola C: From CSD to headache: a long and winding road. *Nature Med* 8: 110-112, 2002.
32. Jensen K, Tuxen C, Olesen J: Pericranial muscle tenderness and pressure-pain threshold in the temporal region during common migraine. *Pain* 35: 65-70, 1988.
33. Jensen K: Extracranial blood flow, pain and tenderness in migraine. Clinical and experimental studies. *Acta Neurol Scand Suppl* 147: 1-27, 1993.

34. Ji RR, Rupp F: Phosphorylation of transcription factor CREB in rat spinal cord after formalin-induced hyperalgesia: relationship to c-fos induction. *J Neurosci* 17: 1776-1785, 1997.
35. Koltzenburg M, Torebjörk HE, Wahren LK: Nociceptor modulated central sensitization causes mechanical hyperalgesia in acute chemogenic and chronic neuropathic pain. *Brain* 117: 579-591, 1994.
36. Lous I, Olesen J: Evaluation of pericranial tenderness and oral function in patients with common migraine, muscle contraction headache and combination headache. *Pain* 12: 385-393, 1982.
37. Magerl W, Wilk SH, Treede RD: Secondary hyperalgesia and perceptual wind-up following intradermal injection of capsaicin in humans. *Pain* 74: 257-268, 1998.
38. Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA: Neurogenically mediated plasma extravasation in dura mater: effect of ergot alkaloids. A possible mechanism of action in vascular headache. *Cephalalgia* 8: 83-91, 1988.
39. Mathew NT, Reuveni U, Perez F: Transformed or evolutive migraine. *Headache* 27: 102-106, 1987.
40. Mathew NT, Stubits E, Nigam MP: Transformation of episodic migraine into daily headache: analysis of factors. *Headache* 22: 66-68, 1982.
41. Mathew NT: Transformed migraine. *Cephalalgia* 13 Suppl 12: 78-83, 1993.
42. McMahon SB, Lewin GR, Wall PD: Central hyperexcitability triggered by noxious inputs. *Curr Opin Neurobiol* 3: 602-610, 1993.

43. Messlinger K, Dostrovsky J.O, Strassman A.M: Anatomy and Physiology of Head Pain: The Headaches. Üçüncü Baskı. Olesen J, Goadsby PJ, Ramadan NM, Tfelt-Hansen P, Welch KMA (eds) Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2006, S. 95-111.
44. Mitsikostas DD, Margarita SR. Reseptor Systems Mediating C-Fos Expression Within Trigeminal Nucleus Caudalis In Animal Models Of Migraine. Brain Research Reviews 35: 20-35, 2001.
45. Moskowitz MA. Neurogenic versus vascular mechanism in migraine headaches. Trend Pharmacol Sci 13: 307-311, 1992.
46. Oshinsky ML, Gommonchareonsiri S: Episodic dural stimulation in awake rats: a model for recurrent headache. Headache 47: 1026-1036, 2007.
47. Rasmussen BK: Epidemiology of Migraine: The Headaches. Üçüncü Baskı. Olesen J, Goadsby PJ, Ramadan NM, Tfelt-Hansen P, Welch KMA (eds) Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2006, S. 235-243.
48. Ren K, Dubner R: NMDA receptor antagonists attenuate mechanical hyperalgesia in rats with unilateral inflammation of the hindpaw. Neurosci Lett 163: 22-26, 1993.
49. Reuter U, Bolay H, Moskowitz MA.. Let's talk cortical spreading depression and migraine aura.[www. lancetneuronet.com](http://www.lancetneuronet.com).
50. Reuter U, Bolay H, Olesen IJ, Chiarugi A, Sanchez del Rio M, Letourneau R, Theoharides TC, Waeber C, Moskowitz MA. Delayed inflammation in rat meninges: implications for migraine pathophysiology. Brain 124: 2490-2502, 2001

51. Reuter U, Chiarugi A, Bolay H, Moskowitz MA. Nuclear Factor- κ B as a Molecular Target for Migraine Therapy. *Ann Neurol* 51: 507-516, 2002.
52. Schepelmann K, Ebersberger A, Pawlak M, Oppmann M, Messlinger K: Response properties of trigeminal brain stem neurons with input from dura mater encephali in the rat. *Neuroscience* 90: 543-554, 1999.
53. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y: A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43: 205-218, 1990.
54. Sharp FR, Gonzalez MF, Sharp JW, Sagar SM: c-fos expression and (14C) 2-deoxyglucose uptake in the caudal cerebellum of the rat during motor/sensory cortex stimulation. *J Comp Neurol* 284: 621-636, 1989.
55. Silberstein SD, Lipton RB, Solomon S, Mathew NT Classification of daily and near-daily headaches: proposed revisions to the IHS criteria. *Headache* 34: 1-7, 1994.
56. Silberstein SD, Olesen J: Chronic Migraines: The Headaches. Üçüncü Baskı. Olesen J, Goadsby PJ, Ramadan NM, Tfelt-Hansen P, Welch KMA (eds) Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2006, S. 613-619.
57. Simone DA, Sorkin LS, Oh U, Chung JM, Owens C, LaMotte RH, Willis WD: Neurogenic hyperalgesia: central neural correlates in responses of spinothalamic tract neurons. *J Neurophysiol* 66: 228-246, 1991.
58. Strassman AM, Raymond SA, Burstein R: Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature* 384: 560-564, 1996.
59. Thomsen LL, Olesen J. Nitric oxide in primary headaches. *Curr Opin Neurol* 14: 315-321, 2001.

60. Van den Berg V, Amery WK, Waelkens J. Triggers factor in migraine: a study conducted by the Belgian Migraine Society. *Headache* 27:191-196, 1987.
61. Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ: Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci* 14: 2708-23, 1994.
62. Waelkens J: Warning symptoms in migraine: characteristics and therapeutic implications. *Cephalalgia* 5: 223-228, 1985.
63. Weiller C, May A, Limmroth V, Jupther M, Kaube H, Schayck RV, Coenen HH, Diener HC. Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med* 1: 658-660, 1995.
64. Woolf CJ, Doubell TP: The pathophysiology of chronic pain-increased sensitivity to low threshold A beta-fibre inputs. *Curr Opin Neurobiol* 4: 525-534, 1994.
65. Woolf CJ: Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306: 686-688, 1983.
66. Wöber C, Holzhammer J, Zeitlhofer J, Wessely P, Bingöl ÇW. Trigger factors of migraine and tension-type headache: experience and knowledge of the patients. *J Headache Pain* 2006;7: 188-195.
67. Yamamura H, Malick A, Chamberlin NL, Burstein R: Cardiovascular and neuronal responses to head stimulation reflect central sensitization and cutaneous allodynia in a rat model of migraine. *J Neurophysiol* 81: 479-493, 1999.

68. Zagami AS, Bahra A: Symptomatology of Migraines without Aura: The Headaches. Üçüncü Baskı. Olesen J, Goadsby PJ, Ramadan NM, Tfelt- Hansen P, Welch KMA (eds) Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2006, S. 399-407.
69. Zagami AS, Goadsby PJ, Edvinsson L: Stimulation of the superior sagittal sinus in the cat causes release of vasoactive peptides. *Neuropeptides* 16: 69-75, 1990.