

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**c-RAF İNHİBİTÖRÜ GW5074'ÜN DENEYSEL AĞRI MODELİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

ELİF TAŞDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN:
Yrd. Doç. Dr. SALİM YALÇIN İNAN**

KONYA 2015

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**c-RAF İNHİBİTÖRÜ GW5074'ÜN DENEYSEL AĞRI MODELİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

ELİF TAŞDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN:
Yrd. Doç. Dr. SALİM YALÇIN İNAN**

KONYA 2015

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **Elif Taşdemir**'in “c-Raf İnhibitörü GW5074’ün Deneysel Ağrı Modeli Üzerine Etkisi” başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya, Türkiye / 26.05.2015

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Salim Yalçın İnan

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Farmakoloji AD.

İmzası

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ayşe Saide Şahin

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Farmakoloji AD.

İmzası

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Hülagü Barışkaner

Selçuk Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Farmakoloji AD.

İmzası

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 27.05.2015 tarih ve 13/09 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmzası

APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “The effects of c-Raf inhibitor GW5074 on the experimental model of analgesia” by “*Elif TASDEMİR*” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of “**Medical Pharmacology**”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan.

Konya, Turkey / 26.05.2015

Principal Advisor

Assistant Professor Salim Yalcin Inan

Department of Medical Pharmacology

Meram Faculty of Medicine

University of Necmettin Erbakan

Signature

Examination Committee Member

Dr. Ayse Saide Sahin,

Professor and Department Head

Department of Medical Pharmacology

Meram Faculty of Medicine

University of Necmettin Erbakan

Signature

Examination Committee Member

Dr. Hulagu Bariskaner,

Professor and Department Head

Department of Medical Pharmacology

Faculty of Medicine

University of Selcuk

Signature

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Dr. Kismet Esra NURULLAHOGLU ATALIK

Professor and Director of Institute of Health Sciences

27.05.2015 and Signature

BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

26.05.2015

Elif Taşdemir

İmzası

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim süresince bizlere yol gösteren, bilgi ve deneyimleriyle daima destek olan tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Salim Yalçın İnan'a, bölüm başkanımız Prof. Dr. Ayşe Saide Şahin'e, öğretim üyelerimizden Prof. Dr. K. Esra Nurullahoğlu Atalık'a, Yrd. Doç. Dr. Burak Cem Soner'e, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Kılıç'a,

Burs vererek lisansüstü eğitimime katkıda bulunan TÜBİTAK (BİDEB)'a,

Tanımdan mutluluk duyduğum yüksek lisans dönem arkadaşlarıma,

Bu yolda desteğini hep hissettiğim sevgili annem, babam ve kardeşlerime,

Sevgisi ve yardımlarıyla daima bana güç veren, anlayışıyla her zaman yanımda olan sevgili eşim Ecz. Ali Taşdemir'e

Sonsuz teşekkür ve saygılarımla...

Bu tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 141318004 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Elif TAŞDEMİR

İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak</i>	<i>i</i>
<i>Tez Onay Sayfası</i>	<i>ii</i>
<i>Approval</i>	<i>iii</i>
<i>Tez Beyan Sayfası</i>	<i>iv</i>
<i>Teşekkür</i>	<i>v</i>
<i>İçindekiler</i>	<i>vi</i>
<i>Kısaltmalar ve Simgeler Listesi</i>	<i>viii</i>
<i>Şekiller Listesi</i>	<i>ix</i>
<i>Resim ve Tablo Listesi</i>	<i>x</i>
<i>Özet</i>	<i>xi</i>
<i>Abstract</i>	<i>xii</i>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ağrı.....	3
2.1.1. Ağrının Tanımı	3
2.1.2. Ağrının Sınıflandırılması.....	3
2.1.2.1. Nörofizyolojik Sınıflandırma.....	3
2.1.2.2. Süreye Bağlı Sınıflandırma	4
2.1.3. Nosisepsiyon.....	4
2.1.4. Ağrının Algılanması	5
2.2. Deneysel Ağrı Modelleri	7
2.2.1. Termal Uyarı İle Oluşturulan Ağrı Modelleri	8
2.2.2. Kimyasal Uyarı İle Oluşturulan Ağrı Modelleri.....	8
2.2.3. Mekanik Uyarı İle Oluşturulan Ağrı Modelleri	9
2.3. c-Raf Kinaz.....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Deney Hayvanı	13
3.2. Kullanılan İlaçlar ve Uygulama Şekilleri	13
3.3. Çalışma Grupları	13
3.4. Kimyasal Ağrı Modeli	14
3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	14
4. BULGULAR	16

5. TARTIŞMA ve SONUÇ	17
6. KAYNAKLAR	21
EKLER.....	28
ÖZGEÇMİŞ.....	29

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

A δ : A-delta

A β : Amiloid beta peptid

APP : Amiloid prekürsör protein

CGRP : Kalsitonin gen-ilişkili peptid

COX-2 : Siklooksijenaz tip 2 enzimi

DMSO : Dimetil sülfoksit

DRG : Dorsal kök gangliyonu

ERK : Ekstraselüler-sinyal regüle edilmiş kinaz

IASP : Uluslararası Ağrı Çalışma Derneği

iNOS : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

i.p. : İntraperitoneal

i.t. : İntratekal

LRRK2 : Lösince zengin tekrarlı kinaz 2

NF- κ B : Nükleer faktör kappa B

NO : Nitrik oksit

NSAİİ : Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar

sn : Saniye

s.c. : Subkutan

SSS : Santral Sinir Sistemi

siRNA : selektif small interfering RNA

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Transdüksiyon

Şekil 2: Ağrı yolları

Şekil 3: Çözücü ve deney gruplarının kıvrınma sayıları

RESİM VE TABLO LİSTESİ

Resim 1: Deney Hayvanı Davranışları. (A: Deney hayvanının asetik asit yokken gözlenen davranışı, B: Asetik asit uygulamasından sonra gözlenen kıvrınma hareketi)

Tablo 1: GW5074'ün çeşitli dozlarının farelerde abdominal kontraksiyon testi sonuçlarına etkisi

ÖZET

Visseral ağrı en sık rastlanılan ağrı tipi olup, mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Doku hasarına bağlı olarak salgılanan prostaglandinler ağrı reseptörlerinin eşliğini düşürmektedir. Dolayısıyla, sitokinlerin ve diğer proinflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu kontrol eden c-Raf kinaz sinyal yolağının farmakolojik olarak inhibe edilmesi bu eşğin yükselmesine sebep olabilir.

Bu araştırma selektif c-Raf inhibitörü olan GW5074'ün kimyasal ağrı modelinde antinosiseptif etkisinin olup olmadığını test etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Metamizol (250 mg/kg), GW5074 0.5 ve 2 mg/kg dozlarında asetik asitle indüklenen abdominal kontraksiyon testinde antinosiseptif aktivite gösterdi. GW5074 her iki dozda da kıvrınma sayılarını önemli derecede azalttı.

Bu bulgular ışığında, GW5074'ün kimyasal ağrı modelinde farelerde periferik antinosiseptif özellik gösterdiği düşünülebilir. Buna göre, c-Raf sinyalizasyonunun inhibe edilmesinin ağrı yönetiminde olası yararı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Antinosisepsif etki, c-Raf kinaz, C57BL/6 fareleri, GW5074, Kimyasal ağrı modeli.

ABSTRACT

Visceral pain is the most common type of pain, and its mechanism isn't understood exactly. Prostaglandins which are released depending on tissue damage reduce the pain receptors threshold. Thus, pharmacological inhibition of c-Raf kinase signaling which controls expressions of cytokines and other proinflammatory factors, may increase mentioned threshold.

The present investigation was performed to assess if there is any possible antinociceptive effect of GW5074, a selective c-Raf inhibitor, in chemical pain model.

Metamizole (250 mg/kg), GW5074 0.5 and 2 mg/kg showed antinociceptive activity in the abdominal constrictor test induced by acetic acid. Both doses of GW5074 significantly reduced the number of stretches in the abdominal constrictor test.

Therefore it is possible to conclude that GW5074 has a peripheral antinociceptive effect in mice evaluated from chemical pain model. The analgesic effect of GW5074 suggests that inhibition of c-Raf signaling may be potentially useful for managing pain.

Key words: Antinociceptive effect, Chemical pain model, c-Raf kinase, C57BL/6 mice, GW5074.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ağrı, zararlı uyarılara karşı koruyucu bir mekanizma (Verma ve ark. 2014) olup, doku hasarının eşlik ettiği hoş olmayan sensorial ve emosyonel bir duygudur (Swieboda ve ark. 2013). Hastalar tarafından sık ifade edilen çok faktörlü kompleks bir olgu olan ağrı, hem nörobilim alanında hem de tıbbi araştırmalarda önemli bir yere sahiptir (Barrot 2012). Bilimin ve bilimsel metotların gelişmesine paralel olarak analjezi yöntemlerinin geliştirilmesi araştırmacıların en büyük ilgi alanlarından biri olmaya devam etmektedir.

Ağrı tedavisinde sık kullanılan ve narkotik analjezikler olarak da bilinen opioidlerin bağımlılık ve tolerans gelişmesi yanında solunum depresyonu, konstipasyon gibi kullanımını kısıtlayan ciddi yan tesirleri bulunmaktadır (Mete 2008).

Nonsteroidal antiinflamatuar ilaçlar (NSAİİ), özellikle şiddetli olmayan ağrılarda çok sık kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda NSAİİ'nin analjezik etkilerine karşı da tolerans gelişebildiği gösterilmiştir (Yılmaz ve Ulugöl 2009). Bu durum günümüzün en fazla kullanılan bu ağrı kesici ilaç grubu için ciddi bir sakınca olarak görülmektedir.

Ağrı yapıcı kimyasal veya mekanik etkenlerin periferde prostaglandinlerin sentezini ve periferik afferent sinir uçlarının ağrı uyarılarına karşı duyarlılığını artırdıkları belirtilmiştir (Kayaalp 2009). Prostaglandinler hem nosiseptif duyarlılığı artırırklar hem de lokal dolaşımında vazodilasyona sebep olarak daha fazla algejenik (aljezik) madde birikmesine sebep olurlar (Aydın 2002). Bununla ilişkili olarak NSAİİ'nin çoğu dokularda siklooksijenaz enzimlerini inhibe ederek (prostaglandin sentezi inhibisyonu) analjezik etki göstermektedir (Kayaalp 2009).

Genel bir analjezik olarak sık kullanılan bu grup ilaçlar, ciddi gastrointestinal yan tesirleri yanında böbrek hasarı da yapmaktadır. Bu ilaçların ciddi yan tesirlerinin oluşu araştırmacıları yeni ilaçlar üzerinde çalışmalara yöneltmektedir (Mete 2008).

GW5074 (5-iyodo-3-[(3,5-dibromo-4-hidroksi fenil) metilen]-2-indolinon) c-Raf-1 kinazın spesifik inhibitörüdür. c-Raf-1 kinaz sinyal yolağı sitokinlerin ve diğer proinflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu kontrol eder. Bunu da nükleer faktör kappa

B (NF-κB) sinyalizasyonunu stimüle ederek yapar. Serbest NF-κB'nin çoğu inflamatuvar proteinleri stimüle ettiği bilinmektedir (Burgess ve Echeverria 2010).

Hastaların, özellikle kanser tedavisi görenlerin ağrısını en aza indirmek veya ortadan kaldırmak, yaşam kalitesini olumlu yönde değiştirecektir. Çalışmamızda son yıllarda santral sinir sistemi (SSS) üzerindeki etkileri yeni gösterilen raf kinaz inhibitörü GW5074'ün farelerde asetik asit ile oluşturulan deneysel ağrı modeli üzerine etkileri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ağrı

2.1.1. Ağrının Tanımı

Ağrı, en yaygın hastalık semptomudur. Ağrılı (noksiyus) uyarılara karşı vücudun cevap olarak verdiği koruyucu bir mekanizmadır (Swieboda ve ark. 2013). Uluslararası Ağrı Çalışma Derneği (International Association for the Study of Pain, IASP) tarafından yapılmış olan tanıma göre ağrı, “gerçek veya potansiyel doku hasarıyla ilişkili, duyuşsal ve emosyonel hoş olmayan oldukça subjektif bir deneyimdir” (Loeser ve Melzack 1999).

Ağrı, nosisepsiyon içinde bir algılama olayıdır (Yılmaz 2008). Aynı şiddetteki ağrılı bir uyarı, kişiden kişiye değişen şiddette ağrı oluşturabilir. Hatta aynı kişide bile değişik şartlarda değişik şiddette ağrı oluşturabilmektedir (Gökçe Kutsal ve ark. 2005).

2.1.2. Ağrının Sınıflandırılması

Ağrının sınıflandırılması sürekli ve sabit değildir. Sık kullanılan sınıflama aşağıdaki gibidir (Kavlak Adana 2009):

2.1.2.1. Nörofizyolojik Sınıflandırma

1. Nosiseptif Ağrı: Sinir sistemi dışında tüm doku ve organlarda bulunan nosiseptörler (özelleşmiş sinir uçları) tarafından algılanıp, SSS’ne iletdikten sonra hissedilen ağrı tipidir (Gökçe Kutsal ve ark. 2005). Somatik ve visseral ağrıyı kapsamaktadır.

a. Somatik Ağrı: Prensip olarak, somatik ağrı vücudu oluşturan yapıların herhangi birine ait dokudan kaynaklanır. Kas incinmesi örnek olarak verilebilir (Gürel Korkmaz 2009).

b. Visseral Ağrı: İç organlardan başlayan ağrılı uyarılar, otonom sisteme ait afferent yollarla taşınmaktadır. Visseral ağrı; yaygın, lokalizasyonu güç, yansıyan tipte olabilmektedir (Aydın 2002). Apandisit ağrısı örnek olarak verilebilir (Gürel Korkmaz 2009).

2. Nöropatik (Nonnosiseptif) Ağrı: Bu ağrı tipi, sinir sisteminin fonksiyonel bozukluğu ile ilgilidir. Periferik, santral ve sempatik sinir sisteminin bozukluğu nöropati olarak isimlendirilen ağrılı bir duruma neden olabilmektedir (İrdesel 2010). Diyabetik polinöropatiler örnek olarak verilebilir (Aydın 2002).

2.1.2.2. Süreye Bağlı Sınıflandırma

- i. Akut Ağrı:** Daima nosiseptif nitelikte olup, vücuda zarar veren bir olayın varlığını göstermektedir. Neden olan lezyon ile ağrı arasında yer, şiddet ve zaman bakımından ilişki söz konusudur. Postoperatif ağrı bunun en iyi örneğidir (Aydın 2002).
- ii. Kronik Ağrı:** Ağrının otonom hastalığın persistan semptomu olduğu, nörolojik, psikolojik ve fizyolojik bileşenler ile birlikte olduğu bir hastalık sürecidir. Ağrı davranışı uzun sürmekte ve çevresel faktörlerle güçlendirilmektedir (Gürel Korkmaz 2009). 3-6 ay süren akut ağrı kronik ağrı özelliklerini gösterir (Aydın 2002).

2.1.3. Nosisepsiyon

Nosisepsiyon, bedenin bir bölgesindeki doku yaralanmasında uyarının nosiseptör ile alınıp, SSS'ne götürülmesi, belirli bölge ve nöral yapılarda integre edilmesi, bu zararlı tehdidin algılanması, buna karşı fizyolojik, biyokimyasal ve psikolojik önlemlerin harekete geçirilmesidir. Nosisepsiyon, doku hasarı ile ağrının algılanması arasında oluşan elektrokimyasal olaylar serisinin bütünüdür (Mete 2008; Yılmaz 2008). Ağrı nosisepsiyon içinde bir algılama şekli olup kişiye ve içinde bulunduğu koşullara göre değişen bir duygulanım şeklidir (Önal 2005).

Ağrı inputu dokunun çevresindeki periferik lifler tarafından toplanır ve santral aksonlar tarafından spinal kord yoluyla beyine iletilir (Mertens ve ark. 2015). Ağrı algılamasının temeli primer afferent nosiseptörlerdir (Kavlak Adana 2009). Nosiseptörler cilt, periost, eklemler, kaslar, periton, organ duvarlarında bulunurlar (Gürel Korkmaz 2009; Swieboda ve ark. 2013). Temel uyarıları mekanik, termal ve kimyasal uyarılardır (Gökçe Kutsal ve ark. 2005; Gürel Korkmaz 2009). Nosiseptörler ile çevrelerindeki düz kaslar, kapillerler ve afferent sempatik sinir uçları nosiseptörlerin mikro çevresini oluştururlar (Sönmezocak 2011). Bu

reseptörlerin aktivasyonu uyarının şiddeti ve frekansı ile orantılıdır (Gürel Korkmaz 2009).

Ağrı iletiminde yer alan liflerin iki tipi vardır (Swieboda ve ark. 2013):

- 1) A-delta ($A\delta$) lifi
- 2) C lifi

$A\delta$ lifleri; genellikle uyarıldıkları tipe göre, mekanik veya termal nosiseptör adını almaktadır (Gürel Korkmaz 2009) ve keskin, iyi lokalize edilebilen bir ağrı üretirler (Gürel Korkmaz 2009; Swieboda ve ark. 2013). Bu lifler miyelinlidir ve yaklaşık 20 m/sn hızda iletme kapasitesine sahiptir (Swieboda ve ark. 2013).

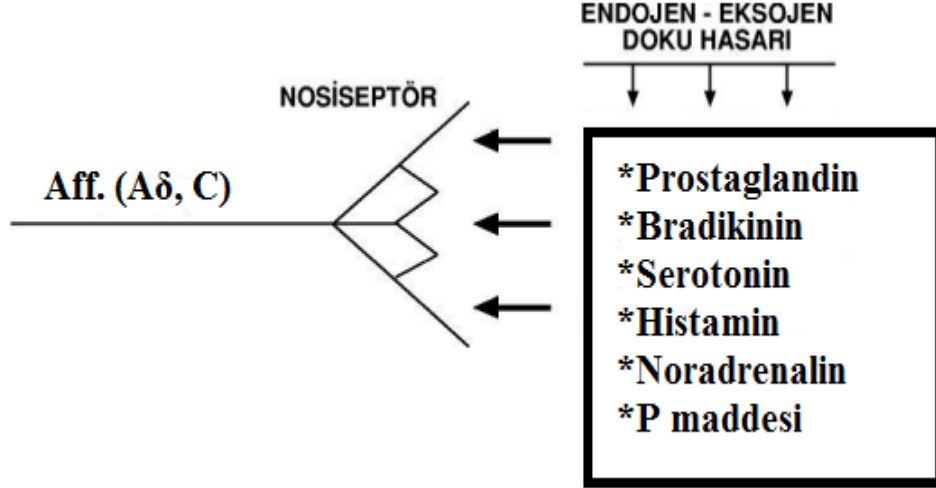
C liflerinin uçları birden fazla stimulusla uyarıldıkları için “polimodal reseptörler” adını almaktadır (Mete 2008; Kavlak Adana 2009). Bunların miyelin kılıfları yoktur, dolayısıyla ağırlı uyanların iletimi çok yavaş (0.5-2.0 m/sn hızda) olur (Gökçe Kutsal ve ark. 2005; Swieboda ve ark. 2013). Bu tip liflerin uyarılması künt, yamııcı, sızlayıcı, çok iyi lokalize edilemeyen tarzda ağrıya sebep olur (Gökçe Kutsal ve ark. 2005). C lifi sinir uçları, prostaglandin ve diğere mediyatörler tarafından duyarlılığı artırılabilir (Swieboda ve ark. 2013).

Normal fizyolojik koşullarda ağrı, hoş olmayan bir algılama olarak tanımlansa da amacı organizmayı zararlı bir saldırıdan korumaktır (Aydın 2002).

2.1.4. Ağrının Algılanması

Ağrı 4 aşamada algılanır:

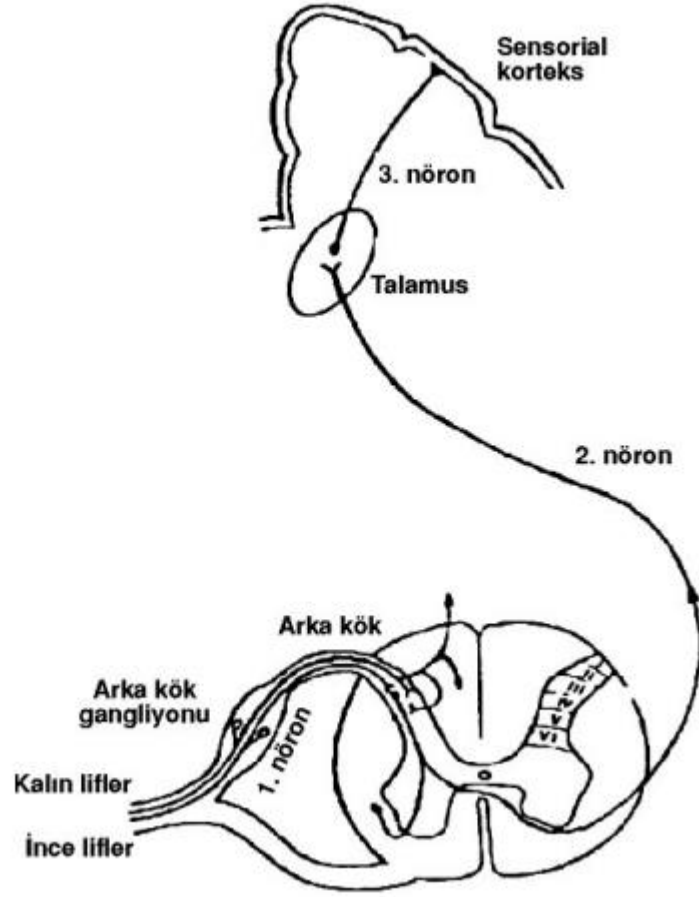
- a) Transdüksiyon (Şekil 1): Nosiseptörler termal, mekanik gibi uyanlarla uyarıldıkları gibi aljezik maddeler (prostaglandin, bradikinin, P maddesi vb.) adı verilen biyokimyasal maddelerle de uyarılabilir veya duyarlılıkları artırılabilir (Yılmaz 2008). Nosiseptörlerde uyarının elektriksel aktiviteye dönüştürüldüğü aşamaya denilmektedir (Aydın 2002).



Şekil 1: Transdüksiyon (Paksoy 2006'dan modifiye edilmiştir) (Aff : Afferent).

- b) Transmisyon: Nosiseptörlerce algılanan ağrı bilgisinin üst merkezlere doğru iletilmesidir. Bu iletimde, A δ ve C lifleri etkindir.
- c) Modülasyon: Başlıca spinal kord seviyesinde meydana gelen bir olaydır. Ağrılı uyaran burada değişime uğrayarak daha üst merkezlere iletilir.
- d) Persepsiyon: Spinal korddan geçip üst merkezlere doğru iletilen ağrının algılanmasıdır. Persepsiyon aşamasında, ağrı duyusu hissedilir (Kavlak Adana 2009).

Ağrı algılanmasının aşamaları Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2: Ağrı yolları (Paksoy 2006).

2.2. Deneysel Ağrı Modelleri

Hayvan modelleri son 20 yılda ağrının anlaşılmasında, tedavisinde ve analjezik etkinliğin öngörülmesinde önemli bir araç haline gelmiştir (Gigliuto ve ark. 2014). Farmakolojik ajanların nosisepsiyon ve analjezideki etkililiğini test etmede, deneysel metotlar kullanılmaktadır (Ekinci ve ark. 2011).

Deneysel ağrı modellerinde, güvenilir bir model elde etmek ve analjezik etkiyi tespit etmek için güçlü bir ağrının oluşturulması önemlidir (Olesen ve ark. 2009). Bu modeller genellikle termal, mekanik ve kimyasal uyarılara karşı gelişen ağrı eşiğine dayanmaktadır (Barrot 2012). Ağrıdan kaynaklanan davranışların değerlendirilmesinde algojenik uyarıdan geri çekilme (Kauppila ve ark. 1998), abdominal gerilme (Gigliuto ve ark. 2014), vokalizasyon, ısırma, eşme, yalama davranışları en sık kullanılan parametrelerdir (Woolf 1984; Matthies ve Franklin 1992).

2.2.1. Termal Uyarı İle Oluşturulan Ağrı Modelleri

Isıya karşı nosiseptif cevabı ölçen testler deneysel olarak sıçan ve farelerde kullanılabilir. Bu gruptaki bütün testlerde yanma riskinden sakınmak için çalışmalarda, testi durdurma zamanı her zaman tanımlanır (Barrot 2012).

Tail immersiyon testi: Bu testte hayvanın kuyruğu, sıcaklığı sabit tutulan 55°C'deki suya daldırılır (Mishra ve ark. 2011; Haider ve ark. 2012). Birkaç saniye (sn) içerisinde sıçan kuyruğunu geri çeker. Bu zamana kadar geçen süre kronometre ile kaydedilir (Mishra ve ark. 2011). Testi sonlandırma zamanı 20 sn olarak belirlenebilir (Choi ve ark. 2012).

Tail flick testi: Nosiseptif testlerin en eskilerinden biridir. Uyarı, kontrol edilen radyant ısı ile oluşturulur. Deney hayvanının kuyruğu bu ısıya maruz bırakıldıktan bir süre sonra kuyruk çekme hareketi gözlenir ve bu süre belirlenir. Bu test opiyatlara son derece duyarlı olup, sıçanlarda kolaylıkla uygulanabilir. Ancak uygulamadaki zorluk, hayvanı stres oluşturmadan doğru hareketsiz kalmasını sağlamaktır (Barrot 2012). Doku hasarından sakınmak için ısının şiddetine bağlı olarak 10-30 sn sonunda ölçüm sonlandırılabilir (Kılıç ve Erol 2000; Koçak ve Şahin 2009).

Hot plate testi: Sık kullanılan klasik bir testtir (Barrot 2012). Bu test temel olarak, elektriksel olarak ısıtılmış bir yüzeyden oluşmaktadır. Bu yüzey bakır veya cam olabilir (Mishra ve ark. 2011). Sıcaklık sık olarak 52 veya 55°C 'de tutulur. Daha yüksek sıcaklıkta doku hasarı tehlikesi bulunmaktadır.

Hayvanın ısıtılan yüzeye bırakılmasından sonra ayağını yalamasına veya çekmesine kadar geçen süre kaydedilir. Kullanılan yüzey materyaline bağlı olarak deney hayvanının pençe yalama latensi 5-10 s arasında değişkenlik gösterir (Barrot 2012). Bazı çalışmalarda özellikle farelerde zıplama davranışı gösterene kadarki süre kaydedilir (Barrot 2012; Choi ve ark. 2012). Ayrıca ayağını kaldırma, sallama davranışları da gözlenebilir (Zimmer ve ark. 1998).

2.2.2. Kimyasal Uyarı İle Oluşturulan Ağrı Modelleri

Bu ağrı modellerinde nosiseptif cevap, asetik asit ve formalin ile oluşturulan kimyasal uyarıya karşı üretilmektedir (Ruiz-Medina ve ark. 2012).

Abdominal kontraksiyon testi: İnsanlardaki intestinal ağrıya klinik olarak ilişkisi olduğu düşünülen hayvan modeli, asetik asit ile indüklenen visseral kontraksiyon modelidir (Shamsi Meymandi ve Keyhanfar 2013). Ağrı oluşturmak için kullanılan bu testte asetik asit kullanılmaktadır. Genellikle %0.6-1'lik asetik asit çözeltisi deney hayvanına intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edilir. 15 dakika boyunca gözlenen ağrı davranışı kaydedilir (Niu ve ark. 2011; Choi ve ark. 2012; Adedapo ve ark. 2014). Ağrı davranışı olarak abdominal kasılmalar, arka ayakların ekstansiyonu ve vücudun dönmesi gözlemlenebilir (Mishra ve ark. 2011).

Formalin Testi: Bu testte, 20 µl %5'lik formalin solüsyonu deney hayvanının arka ayağının dorsal yüzeyine subkutan (s.c.) olarak enjekte edilir. Beklenen ağrı davranışı, deney hayvanının enjeksiyonun yapıldığı pençesini yalaması ve/veya ısırmasıdır. Yanıt iki aşamadan oluşmakta olup, birinci aşama 0-9 dakika arası ikinci aşama ise 10-40 dakika arasındadır. Antinösetif aktivite, nösetif davranış inhibisyonunun yüzdesi olarak ifade edilir (Alexa ve ark. 2015). İlk aşamada nösetörler kimyasal ile direkt uyarılır ikinci aşamada ise bu duruma inflamasyon da eşlik eder (Arıcıoğlu 2007).

2.2.3. Mekanik Uyarı İle Oluşturulan Ağrı Modelleri

Ayak çekme testi (Paw withdrawal/ paw pressure test): 1957 yılında Randall ve Selitto tarafından geliştirilen bu test, temel olarak mekanik uyarı yardımıyla ağrı eşliğinin belirlenmesinde kullanılır. Mekanik uyarı deney hayvanının pençesine uygulanır. Bir pedal aracılığıyla giderek artan miktarda basınç uygulanır. Temel yanıt olarak vokalizasyon kabul edilir ve çoğu zaman vokalizasyona ayak çekme davranışı eşlik eder. Yöntem genel olarak sağlıklı ayak ile inflamatuvar maddenin enjekte edilip, sonra ilaç uygulamasının yapıldığı ayak arasındaki farkı belirlemeyi amaçlar (Arıcıoğlu 2007).

Kuyruk sıkıştırma testi (Tail pinch/ Tail clip test): Temel prensipler ve hayvanın olası davranışları yönünden ayak çekme testi gibidir. Uygulanan basıncın büyüklüğüne göre tepki gösterme süresi değişebilir. Araştırmada farklı şiddette uyarı oluşturan farklı klipsler kullanılabilmesi gibi belli bir klipsle eşik üstü süre tespit edilebilir (Arıcıoğlu 2007; Yılmaz 2008).

2.3. c-Raf Kinaz

Raf kinazlar, memeli hücrelerindeki hücre sinyali transdüksiyon mekanizmalarının önemli bileşenleridir. Aktivasyonları ile normal hücrelerde ve kanser hücrelerinde fosforilasyon kaskadı oluşur. Raf kinazların aktivasyonu hücrel büyüme ve gelişmenin düzenlendiği belirtilmiştir (Galmiche ve Fueller 2007).

Raf ailesinden ilk olarak 1985'te keşfedilen Raf-1, günümüzde c-Raf olarak adlandırılmıştır (Roskoski 2010). Raf kinazlar, A-Raf, B-Raf ve c-Raf olmak üzere üç izoformdan oluşan bir serin/treonin spesifik kinaz ailesidir (Baccarini 2002; Maurer ve ark. 2011; Osborne ve ark. 2012). Bunların proliferasyon, yaşam, (Galmiche ve Ezzoukhry 2010; Roskoski 2010), apoptozis (Roskoski 2010) ve transformasyon gibi çeşitli hücrel proseslerde yer aldığı rapor edilmiştir (Schreck ve Rapp 2006).

Raf izoformları yapıca benzerdir (Chong ve ark. 2003). Bütün Raf kinazların CR1, CR2 ve CR3 olmak üzere üç bölgesi vardır (Chong ve ark. 2003; Baccarini 2005). CR1 bölgesinde iki adet Ras bağlama bölgesi bulunmaktadır (Baccarini 2005) ve sistein bakımından zengindir. CR2; serin/treonin bakımından zengindir. CR3 ise Raf'ın katalitik kinaz alanıdır (Chong ve ark. 2003; Baccarini 2005).

Raf izoformlarının ekspresyonları farklıdır (Chong ve ark. 2003). En yaygın üretilen Raf kinazın c-Raf olduğu bildirilmiştir (Lei ve ark. 2008). B-Raf ve c-Raf'lar beyinde eksprese edilirken, A-Raf burada eksprese edilmez (Chong ve ark. 2003).

A-Raf, B-Raf ve c-Raf knockout fareler üretilmiştir. A-Raf knockout farelerin canlı olarak doğduğu ve genetik profillerine bağlı olarak nörolojik (anormal hareketler, tremor, rijidite vb.) ve intestinal defektlerin (megakolon) olduğu belirtilmiştir. Diğer taraftan; B-Raf ve c-Raf'ı olmayan embriyoların midgestasyonelde iken öldüğü belirtilmiştir (Baccarini 2005).

İnaktif halde (Ras-GDP) bulunan Ras proteinlerinin, hücrenin uyarılmasıyla aktif duruma (Ras-GTP) gelmesi tetiklenir (Doğan ve Güç 2004). Yani bu sinyal iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlamaktadır (Küçükaya ve Afrasyap 2012; Osborne ve ark. 2012).

Fosforillenen Ras proteinleri yüksek afinite ile Raf kinazlara bağlanmaktadır (Baccarini 2002; Doğan ve Güç 2004; Küçükkaya ve Afrasyap 2012). Bu proteinler Raf kinazların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlamaktadır (Baccarini 2002; Doğan ve Güç 2004; Burgess ve Echeverria 2010). Sonra burada sırasıyla mitojen ekstraselüler sinyal regüle edici kinaz (Keller ve ark. 2004; Burgess ve Echeverria 2010), ekstraselüler-sinyal regüle edilmiş kinaz (ERK) fosforillenir ve aktive edilir (Schreck ve Rapp 2006). Buna ek olarak; ERK sinyalizasyon yolağının hücre çoğalması, hücre ölümü ve hücre iskeletinin şekillenmesinde rol oynadığı belirtilmektedir (Küçükkaya ve Afrasyap 2012).

Raf kinazların beyindeki geçici aktivasyonunun nöroprotektif olduğu ve normal beyin fonksiyonları için gerekli olduğu belirtilmektedir. Bir derlemede, c-Raf'ın geçici aktivasyonunun hücre yaşamını ve sinaptik plastisiteyi devam ettirdiği bildirilmiştir. Diğer taraftan anormal aktivasyonunun beyindeki proinflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu aktive ederek veya artırarak nöroinflamasyona, nörodejenerasyona ve hatta hücre ölümüne sebep olabileceği belirtilmiştir (Burgess ve Echeverria 2010).

c-Raf, NF- κ B sinyalizasyonunu stimüle ederek sitokinlerin ve diğer proinflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu kontrol edebilir (Burgess ve Echeverria 2010). c-Raf aktivasyonunun beyin fonksiyonları üzerine negatif veya pozitif bir etkisinin olabileceği, bunun aktivasyon zamanının uzunluğuna bağlı olduğu rapor edilmiştir (Beeram ve ark. 2003; Doğan ve Güç 2004).

Ayrıca, c-Raf kinaz inhibitörü olan GW5074 bileşiğinin nöroprotektif olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Chin ve ark. 2004, Echeverria ve ark. 2008). Beyinde amiloid beta peptid (A β) birikiminin nöronal hücre ölümünü indüklediği belirtilmektedir (Echeverria ve ark. 2008).

Alzheimer hastalarının postmortem incelemelerinde, beyinlerinde c-Raf'ın upregüle olduğu bulunmuştur. Bununla bağlantılı olarak; Echeverria ve ark. (2008)'nin yapmış oldukları bir çalışmada, embriyojenik sıçan kortikal hücreleri kültür ortamına alınıp 7 gün sonra 5 μ M A β ve farklı konsantrasyonlarda GW5074'ü birlikte uygulamışlar, 48 saat sonra hücre sağ kalım oranı analiz edilmiş ve sonuç

olarak da; %73'ten (5 μ M A β), %93'e (5 μ M A β + 10 μ M GW5074) çıkmıştır. GW5074'ün nöroprotektif olduğu belirtilmiştir.

Liu ve ark. (2011)'nin yapmış oldukları çalışmada, GW5074'ün dopamin nöron kaybına olan etkisini incelemek için transgenik *Caenorhabditis elegans* modeli (Lösence zengin tekrarlı kinaz 2 (LRRK2) G2019S-indüklediği nörodejenerasyon modeli) kullanılmıştır. LRRK2'nin transgenik ekspresyonu, dopaminerjik nöron kaybı ve davranış eksiklikleri ile sonuçlanmıştır. 7 günlük hayvanlara %1'lik DMSO uygulanmasının ardından deneklerin %52'sinin en az 1 dopamin nöronunda dejenerasyon olduğu, %48'inin ise, intakt 6 anterior dopamin nöronları olduğu gösterilmiştir. Ancak, 25 ve 10 μ M GW5074 uygulamasının hayvanın dopamin nöron sağ kalımını önemli derecede artırdığı belirtilmiştir.

Nöropatik ağrı modellerinde GW5074 uygulamasının hiperaljezi ve allodiniyi önemli derecede azalttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Jaggi ve Singh 2012; 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanı

Deneyleerde, Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Deney Hayvanları Ünitesi'nden sağlanan 9 haftalık genç-yetişkin erkek C57BL/6 türü fareler kullanıldı. Fareler adı geçen deney hayvanları ünitesinden Tıbbi Farmakoloji laboratuvarına deneyleerden en az 1 hafta önce getirilerek laboratuvar koşullarına adaptasyonları sağlandı. Laboratuvar oda sıcaklığında (23 ± 1 °C) ve 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık döngüsünün olacağı şekilde ayarlandı. Farelere ihtiyaçları kadar yiyecek (standart pellet yem) ve içme suyu verildi. Deneyleer ve ilaç uygulamaları 09:30-15:30 saatleri arasında yapıldı. Bu çalışma için, etik kurul onayı Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'ndan (03.04.2015/2015-010) alındı (Bk. Ekler).

3.2. Kullanılan İlaçlar ve Uygulama Şekilleri

Deneyleerde GW5074 (Tocris), DMSO (Sigma), glasiyel asetik asit (Sigma) ve metamizol (Novalgin ampul, Sanofi Aventis İlaç San.) kullanıldı. Metamizol sodyum'un, serum fizyolojik içerisindeki çözeltileri hazırlandı. Uygulamalarda ilaçlar 10 g vücut ağırlığı başına 0.1 ml olacak şekilde hazırlanıp i.p. olarak enjekte edildi.

3.3. Çalışma Grupları

Çalışmamızda 5 grup oluşturuldu.

Grup 1: DMSO (çözücü) (n=6),

Grup 2: Metamizol (Referans ilaç) 250 mg/kg dozda (Kılıç ve Erol 2000) verildi (n=5).

Grup 3: GW5074 0.1 mg/kg dozda (n=6),

Grup 4: GW5074 0.5 mg/kg dozda (Chin ve ark. 2004) (n=6),

Grup 5: GW5074 2 mg/kg dozda (Chin ve ark. 2004) enjekte edildi (n=6).

Çalışmaya başlamadan önce deney hayvanları tartıldı ve ağırlıklarına göre verilecek ilaç dozları hesaplandı. Enjeksiyonlar yapıldıktan 30 dakika sonra farelere %0.6'lık asetik asit verildi ve abdominal kontraksiyon testi yapıldı.

3.4. Kimyasal Ağrı Modeli

Çalışmada, kimyasal ağrı modeli olarak abdominal kontraksiyon testi kullanıldı. %0.6'lık asetik asit çözeltisi i.p. olarak enjekte edildi (Arihan ve ark. 2010). Asetik asit enjeksiyonundan sonra 15 dakika boyunca gözlenen kıvranma sayıları kaydedildi. Gözlenen kıvranma (Resim 1) sayılarının ortalaması alındı. Çözücü ve referans ilaç grubunun kıvranma sayıları ile karşılaştırılarak analjezik aktivite değerlendirildi.

% Analjezik aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Koçak ve Şahin 2009'dan modifiye edilmiştir).

$$\% \text{ Analjezik aktivite} = \frac{\text{Çözücü grubundaki ortalama kıvranma sayısı} - \text{Deney grubundaki ortalama kıvranma sayısı}}{\text{Çözücü grubundaki ortalama kıvranma sayısı}} \times 100$$

3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

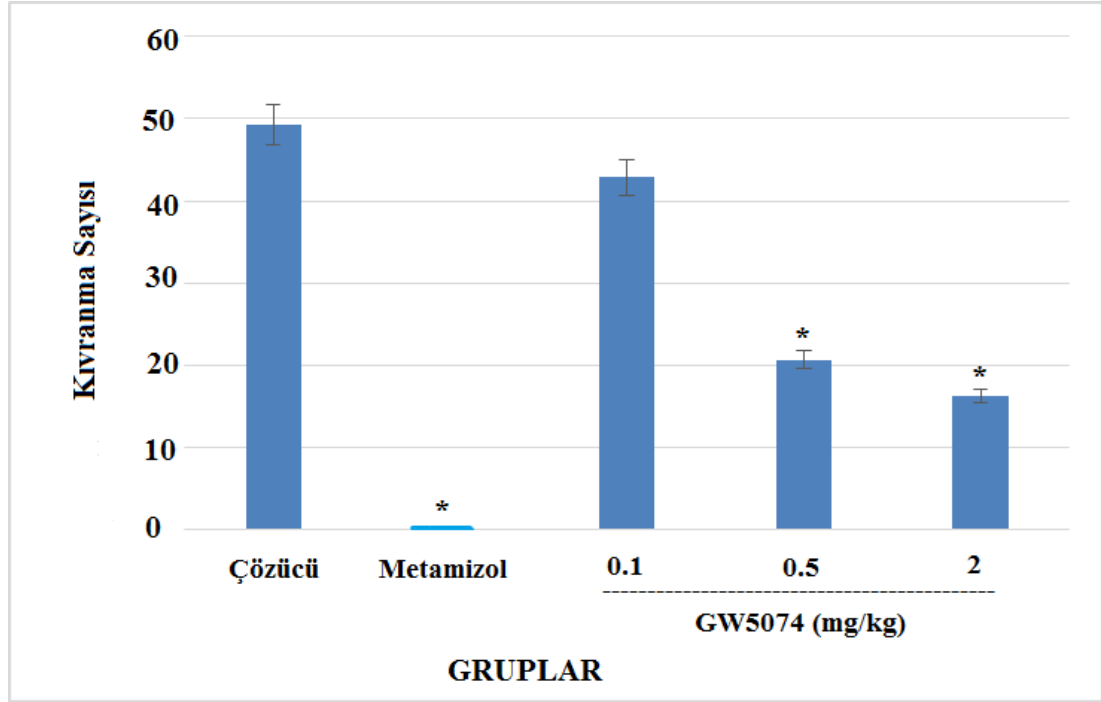
Elde edilen sonuçlar ortalama \pm standart hata şeklinde hesaplandı. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin istatistiksel analizi "IBM SPSS Statistics Version 20" programı kullanılarak yapıldı. Sonuçların istatistiksel olarak analizi için çoklu gruplara ait verilerin değerlendirilmesi ve karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve post-hoc Tukey testi kullanıldı. p değerleri 0.05'ten küçük olanlar anlamlı olarak kabul edildi ($p < 0.05$).



Resim 1: Deney Hayvanı Davranışları. (A: Deney hayvanının asetik asit yokken gözlenen davranışı, B: Asetik asit uygulamasından sonra gözlenen kıvrınma hareketi)

4. BULGULAR

Metamizol (250 mg/kg) ve GW5074 (0.1, 0.5 ve 2 mg/kg) abdominal kontraksiyon testinde çözücü grubuna göre kıvranma sayılarını azalttı (Şekil 3). Ancak bu azalma GW5074'ün 0.1 mg/kg dozunda anlamlı değil iken, 0.5 ve 2 mg/kg GW5074 ve metamizol (250 mg/kg) gruplarında anlamlılık belirlendi ($p<0.05$).



* $p<0.05$ çözücü grubuna göre anlamlı olarak kabul edildi.

Şekil 3: Çözücü ve deney gruplarının kıvranma sayıları

GW5074 (0.1, 0.5 ve 2 mg/kg)'ün antinosiseptif etki yüzdesi hesaplandı (Tablo 1). Sonuçlara göre, GW5074'ün 0.5 ve 2 mg/kg dozlarında antinosiseptif etkiyi artırdığı görülmektedir.

İLAC	Doz (mg/kg, i.p.)	% Antinosiseptif Etki
GW5074	0.1	13.18
GW5074	0.5	58.11
GW5074	2	67.23
Metamizol	250	100

Tablo 1: GW5074'ün çeşitli dozlarının farelerde abdominal kontraksiyon testi sonuçlarına etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Raf kinaz, dorsal kök gangliyon nöron gelişiminde (farklılaşma ve akson gelişimi) ve nöronun canlılığının devamında önemli rol oynamaktadır (Jaggi ve Singh 2013). c-Raf'ın geçici aktivasyonunun sinaptik plastisiteyi devam ettirdiği de bildirilmiştir.

Raf inhibitörü sorafenib'in transgenik fare modelinde beyinde siklooksijenaz tip 2 enzimi (COX-2), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), ve amiloid prekürsör protein (APP) ekspresyonunu azalttığı ve bellek bozukluğunu düzelttiği rapor edilmiştir (Burgess ve Echeverria 2010). Dolayısıyla nitrik oksit (NO) miktarı Raf inhibitörü ile azaltılmıştır. NO birikmesinin hiperaljeziye neden olduğu belirtilmiştir (Kayaalp 2009). Bununla ilişkili olarak, çalışmamızda kullandığımız c-Raf inhibitörü GW5074 NO miktarını ve hiperaljeziyi azaltabilir veya önleyebilir.

Ağrı, en yaygın hastalık semptomu olup (Swieboda ve ark. 2013) hoş olmayan bir deneyimdir. Ağrı durumuyla ilişkili olan kimyasal mediyatörler, ağrı bilimcilerin her zaman ilgi gösterdikleri bir konu olmuştur (Verma ve ark. 2014). Doku hasarına bağlı olarak salgılanan prostaglandinler ağrı reseptörlerinin eşiğini düşürmektedir (Paksoy 2006). Dolayısıyla, sitokinlerin ve diğer proinflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu kontrol eden c-Raf kinaz sinyal yolağının (Burgess ve Echeverria 2010) farmakolojik olarak inhibe edilmesi bu eşğin yükselmesine sebep olabilir. Bu nedenle çalışmamızda bu yolağı inhibe eden GW5074'ün kimyasal ağrı modelinde antinoseptif etki gösterebileceği hipotezini kurduk.

Lei ve ark. (2008) GW5074 ve antiinflamatuvar bir ilaç olan deksametazonun hava yolu hiperreaktivitesi üzerine etkisini incelemişler. Çalışmalarında "sidestream smoke fare modeli"ni kullanmışlar. Sidestream smoke ve inflamatuvar cevap arasında güçlü bir korelasyon bulunduğu, sidestream smoke'ın sistemik inflamatuvar sitokin üretimini ve oksidatif stresi indüklediği belirtilmiştir. Deney modelini oluşturmak için fareler 4 hafta boyunca her gün 4 adet sigaranın dumanına maruz bırakılmış. 1. Haftadan sonra deney hayvanlarına 3 hafta boyunca GW5074 (0.5 ve 2 mg/kg) veya deksametazon i.p. olarak uygulamışlar. 4 haftanın sonunda hayvanların trakealarını incelemişler ve karbakol, endotelin-I ve potasyum'a karşı kontraktıl cevabın önemli derecede arttığını göstermişler. Ayrıca yaptıkları patolojik inceleme sonuçlarına göre inflamatuvar hücrelerin trakea düz kas tabakasına infiltrasyonu ve muköz bezlerde

hipertrofi gözlenmiştir. Ancak deksametazon ve GW5074 uygulamasının hayvanlardaki bu patolojik değişiklikleri azalttığı ve artmış olan kontraktıl cevabın da önemli ölçüde baskılandığı gösterilmiştir. Sonuç olarak yapılan bu çalışmaya göre, c-Raf inhibisyonu ile inflamasyon sinyalizasyonunun inhibe edilebileceğini söyleyebiliriz. İnflamasyonun inhibe edilmesi ağrının azaltılması anlamına da gelmektedir. Dolayısıyla c-Raf inhibisyonunun inflamasyon kontrolünde olduğu kadar ağrı yönetiminde rolü olabilir.

Jaggi ve Singh isimli araştırmacıların yaptıkları bir çalışmada, kronik konstriktif yaralanma modeli ile sıçanlarda nöropatik ağrı oluşturulmuştur. Cerrahi müdahaleden iki hafta sonra da GW5074 (2 ve 4 µg) intratekal (i.t.) olarak uygulanmıştır. Sonuç olarak çalışmalarında GW5074 uygulamasının hiperaljezi ve allodiniyi önemli derecede azalttığını göstermişlerdir. Bu modelde nöropatik ağrı yönetiminde c-Raf sinyalizasyonunun farmakolojik olarak inhibe edilmesinin yararlı olabileceği belirtilmiştir (Jaggi ve Singh 2013). Aynı araştırmacıların başka bir çalışmasında, periferik nöropati, vinkristin (50 µg/kg)'in 10 gün boyunca art arda uygulamasıyla elde edilmiş ve GW5074 (2 ve 4 µg, i.t.) uygulamasının vinkristinin indüklediği hiperaljezi ve allodiniyi önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Jaggi ve Singh 2012).

Yapılan bir çalışmada, Raf-1 selektif small interfering RNA (siRNA)'in i.t. uygulamasıyla c-Raf'ı knockdown yapılan sıçanlara bir hafta süreyle morfin uygulaması yapılmış. Sonuç olarak; bu uygulamanın morfin-aracılı antinosiseptif toleransı ve termal hiperaljeziyi azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada lumbar spinal korddaki dorsal horn kalsitonin gen-ilişkili peptid (CGRP) içeriğinin de önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Tumati ve ark. 2010).

Yue ve ark. (2008)'nin yaptıkları bir kültür çalışmasında, neonatal sıçan dorsal kök gangliyon (DRG) nöronları kullanılmış ve aralıksız morfin aracılı bazal CGRP salınımındaki artışı GW5074 uygulamasının azalttığı gösterilmiştir. Kronik opioid agonist uygulamasıyla adenilil siklaz süperaktivasyonu indüklenmekte ve bu durumun GW5074 ile azaltılabileceği öne sürülmüştür (Yue ve ark. 2006).

Yine GW5074 uygulanan bir başka neonatal sıçan DRG nöronlarının kültür çalışmasında, morfin + kapsaisin uygulamasının GW5074 verilmeyen gruba göre CGRP salınımını azalttığı gösterilmiştir (Tumati ve ark. 2009).

Bahsettiğimiz bu çalışmalardan dolayı, GW5074 bileşiğinin antinosiseptif etkisinin olup olmadığını araştırmak istedik ve çalışmamızda bu kimyasalı kullandık.

Asetik asitin indüklediği abdominal kontraksiyon testi, insanlardaki intestinal ağrıyla ilişkili durumu klinik olarak göstermektedir. Bununla bağlantılı olarak, insanlardaki analjezik dozlar ile bu testteki ED₅₀ değerleri arasında bir korelasyon bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca, abdominal kontraksiyon testi ağrı değerlendirmesinde son derece duyarlı bir modeldir. Zayıf analjezikler için de uygulanabilir ve dolayısıyla yeni ilaçların karşılaştırılması için uygundur (Shamsi Meymandi ve Keyhanfar 2013). Bütün bu sebeplerden dolayı çalışmamızda ağrı modeli olarak bu testi kullanmayı uygun gördük.

Çalışmamızda, GW5074'ün muhtemel antinosiseptif etkisi kimyasal ağrı modeli ile test edildi. Eldeki veriler değerlendirildiğinde; standart ilaç grubu metamizol, 0.5 ve 2 mg/kg GW5074 gruplarında çözücü grubuna göre belirgin bir analjezik etkinlik görülmüştür. Ayrıca, GW5074'ün kıvrınma testinde antinosiseptif etkinlik bakımından 2 mg/kg ile 0.5 mg/kg dozları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak 2 mg/kg dozunda daha yüksek bir antinosiseptif etkinlik belirlenmiştir (Şekil 3).

Çalışmamız sonucunda gözlenen etki, bileşiğin c-Raf kinaz inhibisyonu yaparak proinflamatuvar mediyatörlerin sentezini engelleyebileceği ve ağrı eşliğini yükseltmiş olabileceğinden kaynaklanabilir.

Ayrıca Raf kinaz sinyalizasyonu ile aktive edilebilen NF-κB interlökin 6, interlökin-1 beta ve tümör nekrozis faktör alfa'yı içeren proinflamatuvar mediyatörlerin genlerini aktive eder (Lei ve ark. 2008; Tornatore ve ark. 2012). GW5074 ile dolaylı olarak bu proinflamatuvar mediyatörlerin üretimi azaltılabilir ve antinosiseptif etkiye yardımcı olabilir. Elde edilen sonuçların ağrı tedavisi ile ilgili yapılan araştırmalara katkıda bulunacağı düşüncesindeyiz.

Bu çalışmada elde edilen sonuçların doğrulanması ve bu antinosiseptif etki mekanizmalarının tam olarak açıklanabilmesi için moleküler düzeyde çalışmalara gerek vardır. Nromedyatr düzeyinin belirlenmesi ve reseptör düzeyinde yapılacak çalışmalar sonucunda c-Raf inhibitörü olan GW5074'n ağrı tedavisinde önemli olup olmayacağı aydınlatılabilecektir.

6. KAYNAKLAR

Adedapo AA, Aremu OJ, Oyagbemi AA. Anti-oxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties of the acetone leaf extract of *vernonia amygdalina* in some laboratory animals. *Adv Pharm Bull.* 2014; 4(2): 591-598.

Alexa T, Luca A, Dondas A, Bohotin CR. Preconditioning with cobalt chloride modifies pain perception in mice. *Exp Ther Med.* 2015; 9(4): 1465-9.

Arıcioğlu F. Ağrı araştırmalarında kullanılan hayvan modelleri. *Klinik Gelişim.* 2007; 28-35.

Arıhan O, İskit AB, Kartal M, Yılmaz G. *Salvia albimaculata* hedge & hub'ın antinosiseptif etkileri. *Ankara Ecz Fak Derg.* 2010; 39(2): 113-22.

Aydın ON. Ağrı ve ağrı mekanizmalarına güncel bakış. *ADÜ Tıp Fak Derg.* 2002; 3(2): 37-48.

Baccarini M. An old kinase on a new path: Raf and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002; 9(8): 783-5.

Baccarini M. Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase". *FEBS Lett.* 2005; 579(15): 3271-7.

Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience.* 2012; 211: 39-50.

Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK. Regulation of c-Raf-1: therapeutic implications. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2003; 1(8): 476-81.

Burgess S, Echeverria V. Raf inhibitors as therapeutic agents against neurodegenerative diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010; 9(1): 120-7.

Chin PC, Liu L, Morrison BE, Siddiq A, Ratan RR, Bottiglieri T, D'Mello SR. The c-Raf inhibitor GW5074 provides neuroprotection in vitro and in an animal model of neurodegeneration through a MEK-ERK and Akt-independent mechanism. *J Neurochem.* 2004; 90(3): 595-608.

Choi JH, Cha DS, Jeon H. Anti-inflammatory and anti-nociceptive properties of *Prunus padus*. *J Ethnopharmacol.* 2012; 144(2): 379-86.

Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal.* 2003; 15(5): 463-9.

Doğan AL, Güç D. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Derg.* 2004; 35: 34-42.

Echeverria V, Burgess S, Gamble-George J, Arendash GW, Citron BA. Raf inhibition protects cortical cells against beta-amyloid toxicity. *Neurosci Lett.* 2008; 444(1): 92-6.

Ekinci O, Pelit T, Gül F, Subaşı D, Aydın N, Terzioğlu B, Gören Z. Comparison of antinociceptive effects of analgesics in a chemical model of visceral pain in mice. *Nobel Med.* 2011; 7(2): 40-4.

Galmiche A, Fueller J. RAF kinases and mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773(8): 1256-62.

Galmiche A, Ezzoukhry Z. Regulation of cell survival by RAF kinases. *Med Sci (Paris).* 2010; 26(8-9): 729-33.

Gigliuto C, De Gregori M, Malafoglia V, Raffaeli W, Compagnone C, Visai L, Petrini P, Avanzini MA, Muscoli C, Vigano J, Calabrese F, Dominioni T, Allegri M, Cobianchi L. Pain assessment in animal models: do we need further studies?. *J Pain Res.* 2014; 7: 227-36.

Gökçe Kutsal Y, Varlı K, Çeliker R, Özer S, Orer H, Aypar Ü, Şahin A, Oruçkaptan H. Ağrıya multidisipliner yaklaşım. *Hacettepe Tıp Derg.* 2005; 36: 111-28.

Gürel Korkmaz Ö. Değişik muskuloskeletal sistem hastalıklarının basınç ağrı eşiği üzerine etkisi. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2009 (Tez Danışmanı: Uzm. Dr. Cengiz Bahadır).

Haider S, Nazreen S, Alam MM, Hamid H, Alam MS. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Platanus orientalis* Linn. and its ulcerogenic risk evaluation. *J Ethnopharmacol.* 2012; 143(1): 236-40.

İrdesel J. Neuropathic Foot Pain. *Türkiye Klinikleri J PM&R-Special Topics.* 2010; 3(2): 47-53.

Jaggi AS, Singh N. Analgesic potential of intrathecal farnesyl thiosalicylic acid and GW 5074 in vincristine-induced neuropathic pain in rats. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50(5): 1295-1301.

Jaggi AS, Singh N. Intrathecal delivery of farnesyl thiosalicylic acid and GW 5074 attenuates hyperalgesia and allodynia in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Neurol Sci.* 2013; 34(3): 297-304.

Kauppila T, Kontinen VK, Pertovaara A. Weight bearing of the limb as a confounding factor in assessment of mechanical allodynia in the rat. *Pain.* 1998; 74(1): 55-9.

Kavlak Adana S. Transvezikal prostatektomilerde hasta kontrollü analjezi (HKA) ile tramadol, lornoksikam ve metamizolun postoperatif analjezik etkinliğinin karşılaştırılması. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2009 (Tez Danışmanı: Uzm. Dr. Neşe Aydın).

Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 2009, 12. Baskı, Ankara, Türkiye, s: 837-70.

Keller ET, Fu Z, Brennan M. The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68(6): 1049-53.

Kılıç FS, Erol K. Central components in the antinociceptive activity of dipyrone in mice. *Inflammopharm.* 2000; 8(3): 259-265.

Koçak Y, Şahin A. *Peganum harmala* L. (Üzerlik) tohum ektresinin analjezik aktivitesi ve akut toksisitesinin fareler üzerinde belirlenmesi. *YYU Vet Fak Derg.* 2009; 20(1): 27-30.

Küçükkaya B, Afrasyap L. Mitojenle etkileşen protein kinazların heterotrimerik G proteinleri ile düzenlenmesi. *Türk Biyokimya Derg.* 2012; 37(2): 218-28.

Lei Y, Cao YX, Xu CB, Zhang Y. The Raf-1 inhibitor GW5074 and dexamethasone suppress sidestream smoke-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Respir Res.* 2008; 9: 71.

Liu Z, Hamamichi S, Lee BD, Yang D, Ray A, Caldwell GA, Caldwell KA, Dawson TM, Smith WW, Dawson VL. Inhibitors of LRRK2 kinase attenuate neurodegeneration and Parkinson-like phenotypes in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* Parkinson's disease models. *Hum Mol Genet.* 2011; 20(20): 3933-42.

Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. *Lancet.* 1999; 353(9164): 1607-9.

Matthies BK, Franklin KB. Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. *Pain.* 1992; 51(2): 199–206.

Maurer G, Tarkowski B, Baccarini M. Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene.* 2011; 30(32): 3477-88.

Mertens P, Blond S, David R, Rigoard P. Anatomy, physiology and neurobiology of the nociception: A focus on low back pain (part A). *Neurochirurgie.* 2015; 61(1): 22-34.

Mete S. Deneysel akut ağrı modelinde tramadol-agmatin etkileşmesi ve olası mekanizmalarının araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 2008 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fazilet Aksu).

Mishra D, Ghosh G, Kumar PS, Panda PK. An experimental study of analgesic activity of selective cox-2 inhibitor with conventional nsaid. *Asian J Pharm Clin Res.* 2011; 4(1): 78-80.

Niu XF, Zhou P, Li WF, Xu HB. Effects of chelerythrine, a specific inhibitor of cyclooxygenase-2, on acute inflammation in mice. *Fitoterapia.* 2011; 82(4): 620-5.

Olesen AE, Andresen T, Christrup LL, Upton RN. Translational pain research: evaluating analgesic effect in experimental visceral pain models. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(2): 177-81.

Osborne JK, Zaganjor E, Cobb MH. Signal control through Raf: in sickness and in health. *Cell Res.* 2012; 22(1): 14-22.

Önal A. Basic concepts related with the sensation of pain: neurophysiological mechanisms, endogenous opioid peptides and opioidergic receptors. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci.* 2005; 1(9): 1-14.

Paksoy M. Kapalı minör ürolojik girişimlerde ağrı tedavisi için lornoksikam ve tramadol uygulamalarının karşılaştırılması. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Anestezi ve Reanimasyon Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2006 (Tez Danışmanı: Dr. Cengiz Yumru).

Roskoski R, Jr. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 399(3): 313-7.

Ruiz-Medina J, Flores JA, Tasset I, Tunez I, Valverde O, Fernandez-Espejo E. Alteration of neuropathic and visceral pain in female C57BL/6J mice lacking the PPAR-alpha gene. *Psychopharmacology (Berl).* 2012; 222(3): 477-88.

Schreck R, Rapp UR. Raf kinases: oncogenesis and drug discovery. *Int J Cancer.* 2006; 119(10): 2261-71.

Shamsi Meymandi M, Keyhanfar F. Relative potency of pregabalin, gabapentin, and morphine in a mouse model of visceral pain. *Can J Anaesth.* 2013; 60(1): 44-9.

Sönmezocak OH. Rem uyku yoksunluğuna bağlı hiperaljezide kanabinoidlerin rolü. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, 2011 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Levent Öztürk).

Swieboda P, Filip R, Prystupa A, Drozd M. Assessment of pain: types, mechanism and treatment. *Ann Agric Environ Med.* 2013; 1: 2-7.

Tornatore L, Thotakura AK, Bennett J, Moretti M, Franzoso G. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. *Trends Cell Biol.* 2012; 22(11): 557-66.

Tumati S, Yamamura HI, Vanderah TW, Roeske WR, Varga EV. Sustained morphine treatment augments capsaicin-evoked calcitonin gene-related peptide release from primary sensory neurons in a protein kinase A- and Raf-1-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 330(3): 810-7.

Tumati S, Roeske WR, Largent-Milnes T, Wang R, Vanderah TW, Varga EV. Sustained morphine-mediated pain sensitization and antinociceptive tolerance are blocked by intrathecal treatment with Raf-1-selective siRNA. *Br J Pharmacol.* 2010; 161(1): 51-64.

Verma V, Sheikh Z, Ahmed AS. Nociception and role of immune system in pain. *Acta Neurol Belg.* 2014;

Woolf CJ. Long term alterations in excitability of the flexion reflex produced by peripheral tissue injury in the chronic decerebrate rat. *Pain.* 1984; 18(4): 325-43.

Yılmaz İ. Farelerde dipirona karşı gelişen analjezik toleransta nitrik oksidin rolü. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, 2008 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet Ulugöl).

Yılmaz I, Ulugöl A. The effect of nitric oxide synthase inhibitors on the development of analgesic tolerance to dipyron in mice. *Int J Neurosci.* 2009; 119(6): 755-64.

Yue X, Varga EV, Stropova D, Vanderah TW, Yamamura HI, Roeske WR. Chronic morphine-mediated adenylyl cyclase superactivation is attenuated by the Raf-1 inhibitor, GW5074. *Eur J Pharmacol.* 2006; 540(1-3): 57-9.

Yue X, Tumati S, Navratilova E, Strop D, St John PA, Vanderah TW, Roeske WR, Yamamura HI, Varga EV. Sustained morphine treatment augments basal CGRP release from cultured primary sensory neurons in a Raf-1 dependent manner. *Eur J Pharmacol.* 2008; 584(2-3): 272-7.

Zimmer A, Zimmer AM, Baffi J, Usdin T, Reynolds K, Köng M, Palkovits M, Mezey E. Hypoalgeia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95: 2630-5.



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi



Karar Sayısı: 2015 – 010

Karar Tarihi: 03.04.2015


Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji A.D.'den Yrd.Doç.Dr.Salim Yalçın İNAN ve Ecz.Elif TAŞDEMİR tarafından sunulan "**C-Raf İnhibitörü GW5074'ün Deneysel Ağrı Modeli Üzerine Etkisi**" başlıklı tez projesi 11 üyenin katılımı ile değerlendirildi.


Projede 6 grupta toplam 50 adet fare(C57BL6) kullanılacağı ve farelerin yüksek doz anestezi ile sakrifiye edileceği bildirilmiştir

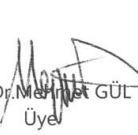
Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin, Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyle Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddeler gereğince "Etik Kurallara Uygunluk Esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyle Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddelerde belirtilen başvuru sahibinin sorumlulukları ve hayvan deneyle ilgili etik ilkeler saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında yönerge ilkelerine uyulduğu ve çalışmanın deneysel kısmını gerçekleştirecek araştırmacıların deney hayvanları kullanım sertifikasına sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "**Uygun**" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.


Prof.Dr.Selim KUTLU
Başkan

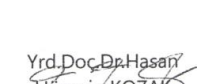

Prof.Dr.Lema TAVLIP
Üye


Prof.Dr.A.Saide ŞAHİN
Üye


Prof.Dr.Mehmet GÜL
Üye



Doç.Dr.Ercan KURAR
Üye


Doç.Dr.Tevfik
KÜÇÜKKARTALLAR
Üye


Yrd.Doç.Dr.Hasan
Hüseyin KOZAK
Üye


Yrd.Doç.Dr.Ömer
FANYELİ
Üye


Halil Aydın ŞİMŞEK
Üye


Vet.Hek.Alpaslan ÖZKURKÇÜLER
Üye


Mustafa ŞİRİN
Üye

Adres : Meram Tıp Fakültesi Kampüsü 42080 Akyokuş – Meram / KONYA
Tel : +90 332 223 71 11 e-posta : konudam@konya.edu.tr
Faks : +90 332 223 71 24 Elektronik Ağ : <http://www.konya.edu.tr/merkezler/konudam>

ÖZGEÇMİŞ

Araştırmacı, 1991 yılında Tarsus'ta doğdu. İlkokulu ve ortaokulu İbrahim Kozacıoğlu İlköğretim Okulu'nda, lise eğitimini ise Tarsus Yabancı Dil Ağırlıklı Lise'sinde tamamlayarak 2007 yılında birincilikle mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2012 yılında tamamlayıp birincilikle mezun oldu. Aynı yıl Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

İletişim Bilgileri:

GSM: 0554 381 62 52

e-mail: elifkarabacak2010@hotmail.com