



**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MORİNGA STENOPETALA EKSTRESİNİN**  
**FARMAKOLOJİK**  
**ETKİLERİ**  
**Muna HUSSİEN**  
**Yüksek Lisans Tezi**

***MORİNGA STENOPETALA* EKSTRESİNİN**  
**FARMAKOLOJİK**  
**ETKİLERİ**  
**Muna HUSSİEN**  
Yüksek Lisans Tezi

***MORİNGA STENOPETALA* EKSTRESİNİN  
FARMAKOLOJİK ETKİLERİ**

**Muna HUSSİEN**

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü


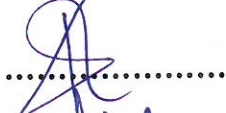
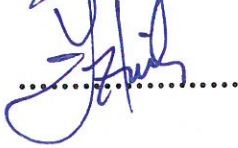
Farmakoloji Anabilim Dalı

Eskişehir, Ağustos 2016

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 16045161)

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Muna HUSSİEN 'nin '*Moringa Stenopetala* Ekstresinin Farmakolojik Etkileri' başlıklı, Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans tezi, 03.08.2016 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Doç. Dr. Rana ARSLAN Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof.Dr. Kevser EROL. Osmangazi Üniversitesi.	
Üye	Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK Anadolu Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22.08.2016 tarih ve ...24..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Dilek AK  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## ÖZGEÇMİŞ

### Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Muna Jemal HUSSEIN  
Doğum tarihi ve yeri : 1988, ADDIS ABABA  
Uyruğu : ETİYOPYA  
Medeni durumu : EVLİ  
İletişim adresleri : Büyükdere Mah. Dilberler Sok.  
23/1 Eskişehir  
Telefon : 05078227877  
e-posta : [emoon2005@gmail.com](mailto:emoon2005@gmail.com)

### Eğitim Durumu

İlköğretim : 1995 – 2000, Awaliya  
Müslüman Misyoner Okulu  
Ortaokul : 2000 – 2003, Enat Orta Okulu  
Lise : 2003 – 2007, Katedral Lisesi  
Lisans : 2008– 2012, Alkan Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi, Eczacılık  
Bölümü  
Yüksek Lisans : 2013 – , Anadolu Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü,  
Farmakoloji Anabilim Dalı  
Yabancı Diller : İngilizce  
Katılan Kurslar ve Eğitim  
Programları : Eskişehir Osmangazi  
Üniversitesi,  
Deney Hayvanları Kullanım  
Sertifika Eğitim Programı, 23  
Mart-03 Mayıs 2015

## ÖNSÖZ

Tıbbi bitkiler, insanlık tarihinin çok eski zamanlarından beri hastalıkların tedavisinde ve hastalıklara karşı korunmada önemli bir rol oynamıştır. Tıbbi bitkilerin halk arasında uzun yıllar kullanımı onların tedavi edici özelliklerinin belirlenmesinde rol oynamıştır. Tarih boyunca pek çok hastalık bitkilerle tedavi edilmeye çalışılmıştır. Bu durum pek çok modern ilacın geliştirilmesine de öncülük etmiştir. Özellikle son yıllarda tüm dünyada doğal yaşamın desteklenmesiyle birlikte bitkisel ilaçların kullanımında büyük bir artış yaşanmıştır. Bitkisel ürünlere yönelik ve bu ürünlerin daha büyük ölçüde araştırma konusu yapılması eczacılık alanı açısından önemli bir gelişme olmakla birlikte, söz konusu ürünlerin kullanımındaki yaygınlık göz ardı edilemeyecek toplum sağlığı sorunlarını da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle tıbbi amaçla kullanılan bitkilerin etkilerinin bilimsel olarak değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Moringa dünya üzerinde özellikle Asya ve Afrika kıtalarında oldukça yaygın yetişmekte olan bir türdür. Yetiştirildiği bölgelerde halk tarafından hem tıbbi amaçlarla hem de besin olarak tüketilmektedir. Moringa türleri farklı kullanım alanları nedeniyle günümüzde hakkında yaygın olarak araştırmalar yapılan tıbbi bitkilerdendir.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamda her türlü bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Rana ARSLAN'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. İkinci tez danışmanım Eczacılık Fakültesi Dekanı ve Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yusuf Öztürk'e saygılarımı sunarım. Ayrıca ekstrelerin hazırlanması için bizden yardımlarını esirgemeyen Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Neşe Kırimer'e ve bitki ekstresini hazırlayan ve diğer analizlerini yapan Farmakognozi Anabilim Dalı doktora öğrencisi arkadaşım Nursenem KARACA'ya da çok teşekkür ederim. Bu tez çalışmam boyunca sabırla destek veren ve her zaman yanımda olan, eşime Abdulkadir Mohammed'e de sonsuz teşekkür ederim.

Muna Jemal HUSSİEN

## **MORİNGA STENOPETALA EKSTRESİNİN FARMAKOLOJİK ETKİLERİ**

### **ÖZET**

*Moringa stenopetala* çok amaçlı kullanımı olan bir bitki, yaygın olarak gıda desteği ve hipertansiyon, baş ağrısı, mide rahatsızlıkları, astım, diyabet ve sıtma gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisi için halk hekimliğinde kullanılmaktadır. Bu bitkinin en önemli kullanım alanlarından birisi de ağrı tedavisidir. Bu tez kapsamında, *M.stenopetala* yapraklarının %80 metanol ekstresinin analjezik etkisi ve etki mekanizmasının araştırılması amaçlanmıştır. Her iki cinsiyetten Swiss albino fareler rastgele onbir gruba ayrıldı. Negatif kontrol grubuna 0,1ml serum fizyolojik oral olarak verildi. Pozitif kontrol olarak Dipron (500mg/kg) kullanılırken, *M. stenopetala* yapraklarından elde edilen % 80 metanol ekstresi 50, 100 ve 200 mg/kg doz oral olarak uygulandı. Maddeler uygulanmadan önce ve uygulandıktan 45 dk. sonrasında fareler sıcak plaka, kuyruk daldırma ve asetik asit kıvrınma testlerine tabi tutulmuştur. Analjezik etki mekanizmasını incelemek amacıyla, nalokson (opioid antagonisti, 5mg/kg, i.p.), ketanserin (5-HT<sub>2</sub> reseptör antagonisti, 1mg/kg, i.p.) ve yohimbin ( $\alpha_2$  reseptörü antagonisti, 1 mg/kg,i.p.) varlığında 100mg/kg *M. stenopetala* %80 metanol ekstresi uygulandı.

*M. stenopetala* ekstresi tüm deneysel ağrı modellerinde önemli bir analjezik etki göstermiştir. Sıcak plaka ve kuyruk daldırma testlerinde analjezik etki mekanizmasını incelemek amacıyla uygulanan antagonistlerden ketanserin ve yohimbin varlığında analjezik etkinlikte anlamlı bir geri dönüş görülürken nalakson uygulamasında geri dönüş gözlenmemiştir. Kıvrınma testinde ise nalakson ve yohimbin uygulaması yapılan gruplarda analjezik etki anlamlı düzeyde antagonize olmuştur.

Bu tez kapsamında, oral uygulanan MSE'nin test edilen dozlarda hem periferik hem de santral antinosiseptif etkisi olduğu ortaya konmuştur. MSE'nin santral antinosiseptif etkisinde noradrenerjik ve serotonerjik yolların anlamlı derecede rol oynadığı görülürken, opioderjik sistemin ise kısmen etkisi olduğu belirlenmiştir. Periferik antinosiseptif etkiyi belirlemek için kullanılan kıvrınma testinde ise opioderjik ve noradrenerjik yolağın daha etkili olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak *M. stenopetala* bitkisi hem içerisindeki antinosiseptif etkisinde rol oynayan maddeler açısından değerlendirilebileceği hem de bu bitki daha ileri çalışmalarla ağrı tedavisinde kullanıma sunulabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Moringa Stenopetala*, antinosiseptif mekanizmalar, sıcak plaka testi, kuyruk daldırma testi, kıvrınma testi

## PHARMACOLOGICAL EFFECTS of the EXTRACT of *MORINGA STENOPETALA*

### ABSTRACT

*Moringa stenopetala* is a multi purpose plant commonly used among people mainly as food and as a remedy in folk medicine to treat various disorders like; hypertension, headache, stomach disorders, asthma, diabetes and malaria. Consumption of this plant for pain relief is one of its venerable usage. In this study, we aimed to investigate the analgesic effect and mechanism of action of *Moringa stenopetala*. Thus, in this experiment 80% methanol crude extract of the leaves of *M.stenopetala* was evaluated for its analgesic properties and mechanism of action using established animal models. Swiss albino mice of either sex were randomly divided into eleven groups. The negative control group was orally given 0,1 ml of saline. The positive control received depron (500mg/kg) and also were treated with 80 % methanol extract of *M. stenopetala* at doses of 50, 100 and 200 mg/kg orally. Animals were then subjected to a tests including hot plate, tail immersion, acetic acid induced writhing before and 45 min later after administration of the extract. 100mg/kg dose of 80 % methanol extract of *M. stenopetala* was used to predict analgesic mechanism of action by giving antagonists naloxone (non selective-opioid antagonist, 5 mg/kg), ketanserin (5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist-1mg/kg) and yohimbine ( $\alpha_2$  receptor antagonist-1mg/kg) intraperitoneally. No reduction effect was observed in case of naloxone and shown significant pain reduction effect with ketanserin and yohimbine. It was antagonized in the writhing test and a significant analgesic effect is shown on the groups that were treated by naloxone and yohimbine.

In this thesis, the orally administered doses of the tested MSE has been shown to be antinociceptive effect both on peripheral and central nervous system pathways. It is expected that analgesic effect takes place through noradrenergic and serotonergic effects which implies it acts in central nervous system pathway significantly and it is also determined that the opioidergic system is partly involved. In the writhing test used to determine the peripheral antinociceptive effect, opioidergic and noradrenergic pathways have been determined to be more effective. As a result, *M. stenopetala* plant can be evaluated interms of substance that has antinociceptive effect and can be recommended for further studies in terms of pain treatment.

**Keywords:** *Moringa stenopetala*, mechanism of antinociception, hot-plate test, tail- immersion test, writhing test



<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>SAYFA</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	i
<b>ÖNSÖZ</b>	ii
<b>ÖZET</b>	iii
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>İÇİNDEKİLER</b>	v
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	viii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	ix
<b>SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	x
<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1
<b>KAYNAK BİLGİSİ</b>	2
<b>Ağrı</b>	2
Patofizyolojiye dayalı Sınıflandırma	2
Ağrı mediyatorleri	2
<b>Ağrının İletimi</b>	3
Transdüksiyon	3
Transmisyon	3
Modulasyon	4
Persepsiyon	4
Ağrının İnhibisyonu	5
Kimyasal Mediatörler	5
<i>Serotonin</i>	6
<i>Bradikinin</i>	6
<i>Histamin</i>	6
<i>P maddesi</i>	6
<i>Prostanoidler</i>	7
<i>ATP</i>	7
<i>Reaktif Oksijen Türleri</i>	7
<i>Protonlar</i>	7
<b>Analjezik Etkili İlaçlar</b>	8
<i>Non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar</i>	8
<i>Opioid İlaçlar</i>	10
<i>Diğer Sistemlerde Etkili İlaçlar</i>	10

<i>Antikonvulzanlar</i>	10
<i>Antidepresanlar</i>	10
<b>Moringa Hakkında Bilgiler</b>	10
<i>Besin değeri</i>	11
<i>Fitokimya</i>	12
<b><i>Moringa Türlerinin Farmakolojik Etkileri</i></b>	12
<i>Antibakteriyel etkileri</i>	12
<i>Anti-astmatik etkisi</i>	12
<i>Antipiretik etkileri</i>	12
<i>Antidiyabetik etkinlik</i>	12
<i>Antihipertansif etkileri</i>	13
<i>Antioksidan etkileri</i>	13
<i>Hepatoprotective activity</i>	13
<i>Antitümör etkisi</i>	13
<i>Antispazmodik ve anti-ülser etkiler</i>	13
<i>Kardiyak ve dolaşım uyarıcı etkisi</i>	13
<i>Toksisite</i>	14
Yapılan çalışmaları	14
<b>GEREÇLER</b>	15
<b>Hayvanlar</b>	15
Kullanılan Kimyasal madde ve İlaçlar	15
<b>YÖNTEM</b>	16
<i>Bitki Ekstresinin Hazırlanması</i>	16
<i>Alkaloid tayini</i>	16
<i>Hager's testi</i>	16
<i>Dragendorff testi</i>	16
<i>Karbonhidrat tayini</i>	16
<i>Molish's testi</i>	16
<i>Fehling's testi</i>	16
<i>Glikozit tayini</i>	16
<i>Sülfürik asit testi</i>	16
<i>Saponin tayini</i>	16
<i>Fenolik bileşik tayini</i>	16
<i>Toplam Fenolik madde Miktarı Tayini</i>	17

LCMS-IT-TOF Sistem Analizi	17
Test Maddelerinin Uygulanması	17
Sıcak Plaka Testi	18
Kuyruk Daldırma Testi	18
Kıvrınma Testi	18
Verilerin Değerlendirilmesi	18
<b>BULGULAR</b>	20
<b>LCMS-IT-TOF Sistem Analizi</b>	20
<b>Toplam Fenol Miktarı Tayini</b>	21
Sıcak Plaka Testi	21
Kuyruk Daldırma Testi	22
Kıvrınma Testi	23
<b>TARTIŞMA</b>	25
<b>ÖNERİLER</b>	27
<b>KAYNAKLAR</b>	28

## ÇİZELGELER DİZİİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 100 mg <i>Moringa</i> yapraklarının aminoasit içeriği	11
Çizelge 2 Ekstrenin toplam fenolik madde miktarı	21
Çizelge 3 Kalitatif fitokimyasal analiz sonuçları	21

## ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Birincil Aferent Nöronların Doku Hasarında Salıverilen İnflamatuvar Mediyatörlere Cevabı	3
Şekil 2 Doku Hasarı Nedenli Ağrı iletim ve Algılama	4
Şekil 3 İnflamatuvar Kimyasal Mediatörler	8
Şekil 4 Araşidonik Asit kaskadı ve Metabolitleri Araşidonik asit Metabolitlerinin üretimi ve iltihap Rollerini	9
Şekil 5 <i>Moringa stenopetala</i> yaprak ve ağacı.	11
Şekil 6 Gallik Asitin Farklı Konsantrasyonlardaki Toplam Fenol İçeriği	17
Şekil 7 LCMS-IT-TOF Sisteminden Alınmış Kütle Spektrumu	20
Şekil 8 LCMS-IT-TOF Sisteminden Alınmış Kütle Spektrumu	20
Şekil 9 Sıcak-Plaka Testinde MSE'nin Olası Maksimum Analjezik Etkisi	22
Şekil 10 Kuyruk Daldırma Testinde MSE'nin Olası Maksimum Analjezik Etkisi	23
Şekil 11 Kıvrınma Testinde MSE'nin Olası Maksimum Analjezik Etkisi	24

## SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

5-HT	: Serotonin (5-Hidroksitriptamin)
AP-1	: Aktivated Protein 1
ATP	: Adenosin- 5'-Trifosfat
BHT	: Butil Hidroksi Toluen
CGRP	: Kalsitonin Gen İlişkili Peptid
DOR $\delta$	: Opioid Reseptörler
DRG:	: Dorsal Kök Ganglionu
EBV	: Epstein-Barr Virüsü MB
EP1-4	: Prostanoid E Reseptörü
ESI	: Elektronik Ek Bilgiler
GABA	: Gamma-AminoBütirik Asit
GK	: Goto-Kakizaki
H1	: Histamin H <sub>1</sub> Reseptörleri
HETE	: Hidroksieikosatetraenoik asit
IL-1	: Interlökin-1
IP I	: Prostanoid Reseptörü
ISP	: Isoproterenol
KOR	: $\kappa$ Opioid Reseptörler
LCMS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle/Kütle Spektrometresi
MO	: <i>Moringa olifera</i>
MORS $\mu$	: Opioid Reseptörler
MSE	: <i>Moringa stenopetala</i> %80 Metanol Ekstresi
NF-Kb	: K-hafif Zincire Bağlanmış Nüklear Faktör
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
INH	: İzoniazid
NO	: Nitrik Oksit
NSAID	: Non -Steroidal Anti-Enflamatuar İlaçlar
PAG	: Periaquaduktal Gri Madde
PG	: Prostaglandin
PGE2	: Prostaglandin E2
PZA	: Pirazinamid
RMP	: Rifampisin
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri

SF : Serum Fizyolojik  
SP : P Maddesi  
SSRI : Serotonin Geri Alım İnhibitörleri  
TNF : Tümör Nekroz Faktörü

## GİRİŞ ve AMAÇ

Tıbbi bitkilerin tedavi amacıyla kullanımı oldukça eski yıllara dayanmaktadır. Günümüzde “fitoterapi” kavramı, tedavi edici değere sahip taze veya kurutulmuş bitki kısımları (drog) ya da bunlardan elde edilen ekstraktları kullanılarak üretilen çay, damla, draje, kapsül, şurup, tabletler ile hastalıkların tedavi edilmesi olarak tanımlanmaktadır. İnsanoğlu yüzyıllardır hastalıklarına çare aramaktadır ve bunun için ilk başvurdukları kaynak bitkiler olmuştur. Son yıllarda özellikle Avrupa ve Amerika’da bitkilerle yapılan çalışmalar ve bitkilerden elde edilen ürünleri kullananların sayısı her geçen gün artmaktadır. Dünyada bitkisel tedavilere en çok başvuru yapılan bölgelerin başında Afrika gelmektedir.

İnsanoğlunun eski çağlardan beri kontrol altına almaya çalıştığı şikâyetlerinden biri ağrıdır. Ağrı, aslında vücudumuzun uyarı sistemi şeklinde çalışan ve ağrının oluşumuna neden olan etmenin uzaklaştırılmasını sağlayan koruyucu bir mekanizmasıdır. Ağrı duyusunun üstesinden gelebilmek için geçmişte çeşitli bitki türlerinden yararlanılmaya çalışılmıştır ve bugün kullandığımız modern analjeziklerin gelişimine bazı bitkilerin de katkısı olmuştur.

Moringa türleri Hint yarımadasında ve dünyada tropikal ve subtropikal bölgelerde doğal olarak yetişen ve hem beslenme hem de tıbbi amaçlarla kullanılan bir bitkidir. Moringa ağacı yüksekliği ortalama 5-10 m arasında değişebilen nemli tropik veya sıcak kuru topraklarda yetişebilen (zorlu iklim şartlarına dayanıklı) bir bitkidir. Yaprakları, çiçekleri, kökleri, tohumları ve kozaları sebze olarak tüketilmektedir (Bichi, 2013; Stohs ve Hartman, 2015).

Bilindiği gibi, bir maddenin ilaç olabilmesi için belli aşamalardan geçmesi gerekmektedir. Öncelikle de prelinik çalışmalar olan deney hayvanları üzerinde etkinliğinin gösterilmesi ve bu etkinin hangi yolları kullanarak meydana geldiğinin belirlenmesi gerekmektedir. Moringa türleri halk arasında antitümör, antipiretik, anti epileptik, antiinflamatuar, antiülser, antispasmodik, diuretik, antihipertansif, kolesterol düşürücü, antidiyabetik, hepatoprotektif, antibakterial ve antifungal olarak kullanılmaktadır.

Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamız kapsamında daha çok Etiyopya ve Kenya’da doğal olarak yetişen bir tür olan *M. stenopetala*’nın analjezik etkisini ve bu etkide rol oynayan mekanizmaları araştırmayı amaçladık.



## KAYNAK BİLGİSİ

### Ağrı

Ağrı, mevcut veya potansiyel doku hasarı ile ilişkili bir, hoş olmayan sübjektif, duyuşsal ve emosyonel bir deneyim olarak tanımlanır (Merskey ve Boğduk,1994). Ağrı duyuşsal, fizyolojik, bilişsel, duygusal, davranışsal ve ruhsal bileşenleri ile çok boyutlu bir olgu olarak görülür. Duyusal (duyguları oluşturan) ve davranışsal bileşenler (ağrı davranışsal tepkileri oluşturan)inanç ve tutum (ağrı ve kontrolü hakkında manevi ve kültürel hem de tutumları oluşturan) tüm bunlar zararlı uyarıların iletilmesini modifiye ederek (fizyolojik bileşeni oluşturan) beyinde (duyuşsal bileşeni) algılanmasını etkileyebilirler (Besson, 1999).

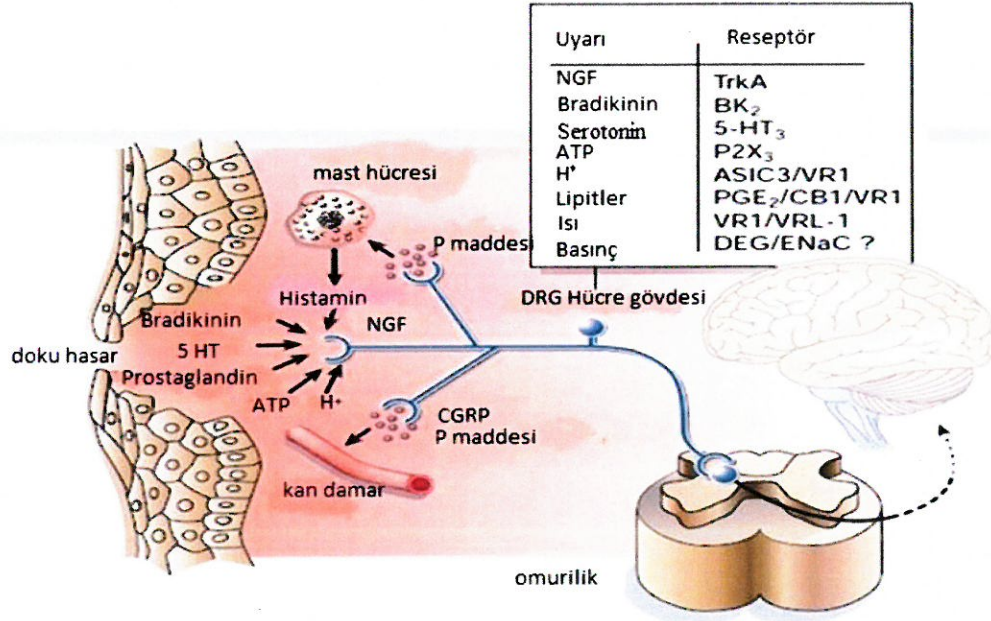
Ağrı sınıflandırması ağrı patofizyolojisini de kapsar, dolayısıyla ağrı için çeşitli sınıflandırma sistemleri oluşturulmuştur.

### *Patofizyolojiye dayalı Sınıflandırma*

Patofizyolojisine dayanarak ağrı iki ana tipe ayrılır; nosiseptif ve nöropatik. Nosiseptif ağrı: doku zedelenmesi nosiseptörler adı verilen ağrılı uyarılara duyarlı spesifik ağrı reseptörlerini aktive ettiğinde oluşan ağrıdır (Giordano, 2005). Nosiseptörler, soğuk, sıcak, titreşim, gerilim uyarılara ve oksijen yoksunluğu, doku zedelenmesi veya inflamasyona cevap olarak dokulardan açığa çıkan kimyasal maddelere yanıt verirler. Nosiseptif ağrı aktive olan nosiseptörlerin bulunduğu yere göre somatik ve visseral ağrı olarak ayrılabilir (Urch ve Suzuki, 2008). Somatik ağrı, doku yüzeylerinin (deri, ağız, burun, idrar yolu, anüs mukozası vs.) ya da kemik, eklem, kas veya bağ dokusu gibi derin dokulardaki nosiseptörlerin aktivasyonudur. Öte yandan visseral ağrı, iç organlarda bulunan nosiseptörlerin aktivasyonudur (Main ve Spanswick, 2000; Stein, 1995). Periferik ya da merkezi sinir sisteminin yapısal hasarından ve sinir hücresi disfonksiyonundan kaynaklanan ağrı 'nöropatik ağrı' olarak adlandırılmaktadır. Ağrı herhangi bir uyarı olmaksızın ortaya çıkabilir ya da ağrı eşiği düştüğü için normal şartlarda ağrıya neden olmayacak bir uyarı ağrı yapabilir. Hissedilen ağrı sağlam bölgelere de yansiyabilir (Vranken, 2008).

### **Ağrı mediyatörleri**

Ağrı iletimi inhibitör veya eksitator pek çok mediyatörün ve değişik reseptör gruplarının rol oynadığı son derece kompleks bir olaydır. Yaralanmalar sonucunda oluşan ağrılarda, termal ve mekanik uyarılara karşı nosiseptörlerin duyarlılığının artmasıyla ağrı duyusu daha da şiddetlenir. Doku zedelenmesi sonucu hücrelerden açığa çıkan potasyum, trombositlerden salınan serotonin nosiseptörleri aktive eder ve hücre membranından açığa çıkan prostaglandin (PG) ve lökotrienler nosiseptörleri daha duyarlı hale getirirler. Duyarlı hale gelen nosiseptörlerden P maddesi (SP), kalsitonin gen ile ilişkili peptid (CGRP) ve nörokinin A salınır. P maddesi mast hücrelerini uyararak histamin salınımını artırır. Doku zedelenmesi sonucunda açığa çıkan bradikinin de yine PG sentez ve salınımını artırır. Uyarılmış olan açık sinir uçları ağrıyı daha çok termal ve mekanik uyarılara duyarlı olan A delta sinir lifleriyle ya da her türlü uyarana karşı duyarlı olan C sinir lifleriyle arka kök gangliyonuna taşır (Aydın, 2002).



**Şekil 1 Birincil Aferent Nöronların Doku Hasarında Salıverilen İnflamatuvar Mediyatörlere Cevabı.** Şekilde görülen faktörlerin hepsi hücre yüzey reseptörleriyle etkileşerek nosiseptör sonlanmalarını daha duyarlı hale getirir ve harekete geçirirler. Bu nosiseptörlerin aktivasyonu aferent mesajı omuriliğin dorsal boynuzuna (ve buradan beyine) iletmekle kalmaz, ayrıca nörojenik inflamasyonu başlatır (Julius ve Basbaum, 2001)

### Ağrının İletimi

Nosisepsiyon; doku hasarı ile ağrının algılanması arasındaki karmaşık sinirsel iletim sürecidir. Ağrı ise nosisepsiyon sonucunda ortaya çıkan bilinçsel bir algıdır (Charlton, 2005). Nosisepsiyon dört süreci içermektedir: Transdüksiyon, Transmisyon, Modulasyon ve Persepsiyon (Pasero ve McCaffery, 2011).

### Transdüksiyon

Periferik sinir sistemi, zararlı ya da hasarlı uyarıyı (termal kimyasal veya mekanik olabilir) tespit etmek için özel primer afferent duyu nöronları içerir. Nosiseptörler deri ve mukozalarda ve daha az sıklıkla eklem, damar ve iç organlar gibi derin yapıların içinde yer almaktadır. Transdüksiyon aşamasında nosiseptörler çeşitli uyarıların (mekanik, termal, kimyasal) oluşturduğu uyarıyı elektriksel aktiviteye dönüştürürler (Caterina ve ark., 2005). Serotonin, histamin, potasyum, bradikinin ve prostaglandinler gibi mediyatörler nosiseptörleri daha duyarlı hale getirirler (Marchand, 2008).

### Transmisyon

Bu aşamada nosiseptörler algıladıkları uyarıyı omurilik üzerinden üst merkezlere taşırlar. Bu iletimde iki tip sinir lifi yer alır: (a) A-delta sinir lifleri, (b) C sinir lifleri. A-delta lifleri; göreceli olarak büyük çaplı ve miyelinlidirler ve hızlı bir şekilde iletim yaparlar. Termal ve mekanik uyarılara duyarlıdır. Bu lifler, keskin, iğneleyici ağrı hissi ile ilişkilidir. Nosiseptif sinir liflerinin diğeri olan C lifleri küçük çaplı, miyelinsizdir ve daha yavaş ileti sağlarlar. Her türlü uyarıyı iletirler. Bu tip lifler ise yavaş, yanıcı, kronik ağrılara aracılık ederler. Ağrı iletiminde diğer sinir lifleride çeşitli şekillerde rol alırlar. Afferent nosiseptörlerin

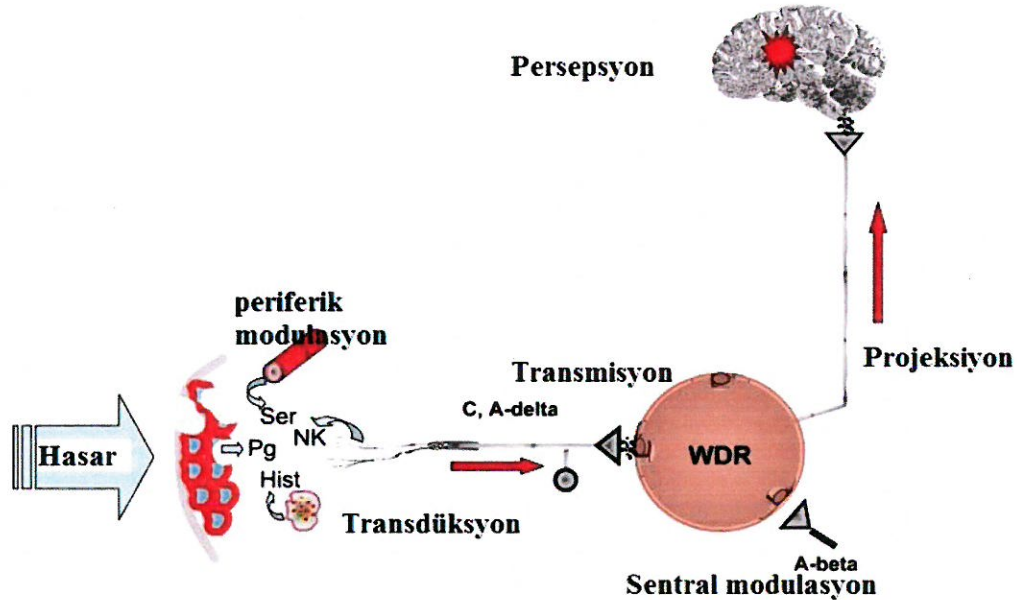
terminalleri dorsal kökü ile omurilik dorsal boynuz girer ve substantia gelatinosada ikinci sıra nöronlar üzerine sinaps yapar (Marchand, 2008). Bu aşamada omurilikteki nosiseptörlere kadar afferent sinir lifleri boyunca yaralanma bölgesinden aksiyon potansiyelini taşır. P maddesi ve diğer nörotransmitterlerin salınımı aksiyon potansiyelini omurilik dorsal boynuz kadar taşır, burdan da spinotalamik çıkan yol boyunca ortabeyin ve talamusa taşır. Son olarak, talamusa gelen lifler üçüncü nosiseptif süreci oluşturur, persepsiyon oluşması için somatosensoryel korteks, parietal lob, frontal lob ve limbik sisteme, nosiseptif mesajı gönderir (Wuhrman ve ark., 2011).

### **Modulasyon**

Ortabeyinin aktive edildikten sonra ortaya çıkmaktadır. Merkezi sinir sistemin alt alanına inen bununla birlikte endorfinler, enkefalinler, serotonin (5-HT) ve dinorfin gibi çeşitli nörotransmitterleri içeren bu nöronlar ortabeyinden kaynaklanmaktadır. Dorsal boynuzda ağrı uyarının transmisyonunu inhibe etmekte birlikte bu nöronlar fazladan nörotransmitterlerin salınımını uyararak endojen opioidlerin salınımına neden olmaktadır. Zamanla nosisepsiyonun daha iyi anlaşılması yeni tedavi olanaklarının ortaya çıkmasını sağlamış ve çeşitli ilaç ve müdahalelerle nosiseptif süreçlerin üzerinde etki edilmesine yol göstermiştir (Wuhrman ve ark., 2011).

### **Persepsiyon**

Çıkan yollar ile üst merkeze ağrının iletilmesi ve algılanmasıdır. Serebral korteksin dört temel bölgesinin çıkan yollar aracılığıyla ağırlı uyarılarla aktive olduğu düşünülmektedir. Bunlar da: insular korteks, anterior singulat korteks, birincil somatosensoryel korteks ve ikincil somatosensoryel korteks (Palecek ve ark., 2002)



**Şekil 2. Doku Hasarı Nedenli Ağrı iletim ve Algılama. Periferde Ağrı Mediyatörler Nosiseptiflerin Uyarılmasına Neden olup sonuç olarak merkezi sinir Sistemde Transdüsyon ve Kondüksiyon Ortaya Çıkmasını sağlar (http-2)**

## **Ağrının İnhibisyonu**

Ağrı üst merkezlere taşınırken belirli bölgelerde inhibe ya da fasilite edilir. Spinal kord düzeyinde bulunan inisi yolaklar ağrının kontrolünde önemli rol oynamaktadırlar. İnisi yolaklarda, ağırlı uyarıların inhibisyonunda görev alan nörotransmitterler (endojen opioidler, serotonin ve noradrenalin gibi) ağırlı uyarının ikinci sıra nöronlara geçişini inhibe ederler (Russo ve Brose, 1998; Fürst, 1999; Millan, 1999). İnisi inhibitör yolakları 3 farklı yapıdan oluşmaktadır:

1. Periaquaduktal gri maddeden (PAG) başlayıp bulbus retiküler formasyonuna ulaşan yolak, burada yer alan nörotransmitter serotonindir.
2. Pons ve bulbustaki retiküler formasyonun medial kısmından başlayan inisi yolak, bu yoldaki lifler noradrenerjik özellikte olup omurilik arka boynuzunda sonlanır.
3. Lokus seruleus'ta yer alan inisi yolak noradrenerjiktir ve ağrının omurilik arka boynuzundan üst merkezlere iletimi engellenmektedir (Saatçioğlu, 2008; Raja, 1988).

Ağrının kalitesi ile koruyucu cevapların başlaması omurilik içindeki birçok faktör ve üst beyinde integrasyon ve modifikasyon ile ilgili olan nosiseptif sinyaller aracılığıyla belirlenir (Calixto ve ark., 2000). Prostaglandinler, hem nosiseptif duyarlılığı artırırken aynı zamanda vazodilatasyon yaparak ağrıyı potansiyalize eden maddelerin bölgede birikmesini sağlarlar. İltihaplı dokulardan salıverilen prostaglandin, histamin ve bradikininin etkilerini potansiyalize eder. Araşidonik asitten meydana gelen prostaglandinler ve özellikle PGE2 hiperaleji yapan mediyatörlerin başında gelir (Kayaalp, 2005). Serotonin inflamasyon ya da zedelenme sonucunda trombositlerden ve mast hücrelerinden salıverilerek 5-HT<sub>3</sub> reseptörünü aktive eder ve duyuşal nöronları direkt olarak harekete geçirir (Dray, 1995). Nosiseptörlere doğrudan etki eden serotonin vasküler tabanlı ağrıların patogeneğinde rol oynar (Güzeldemir, 1999). Ayrıca G protein kenetli olan 5-HT<sub>1</sub> ve 5-HT<sub>2</sub> reseptörlerini aktive ederek de duyuşal nöronları uyarır. Bu durum potasyum iyon geçirgenliğini ve membran depolarizasyonunu azaltır. Buna bağılı olarak da nosiseptörlerin duyarlılığı artarak, ısı ve basınç uyarılarına karşı ağrı eşığı düşebilir (Dray, 1995). Histamin, P maddesi, interlekin-1 (IL-1) ve sinir büyüme faktörü (NGF) gibi bazı inflamatuvar mediyatörler mast hücrelerinin degranülasyonunu gerçekleştirerek histaminin salıverilmesini sağlar. Duyuşal nöronlar histamin H<sub>1</sub> reseptörlerini ederek aktive ederek membranının kalsiyum geçirgenliği artar. Bu durum duyuşal nöropeptitleri, prostaglandinleri ve endotel hücrelerindeki monohidroksieikozatetraenoik asitleri (HETE) uyararak hiperalejiye yol açar (Rang ve ark., 1994). P maddesi periferden gelerek nosiseptif uyarıları SSS'ne taşıyan primer duyuşal nöronların (C ve A- $\delta$ ) akson uçlarında bulunur. P maddesi, ağırlı impulsların birinci duyuşal nöronlardan ikinci duyuşal nöronlara taşınmasında görevlidir (Kayaalp, 2005).

## **Kimyasal Mediatörler**

Duyarlılaşma ve hiperaleji çeşitli kimyasal mediatörlerin salınımını içerir (Hargreaves ve Dubner, 1991). Yerel doku yaralanması inflamatuvar hücrelerden (örneğin PGE<sub>2</sub>) kimyasal ve inflamatuvar mediyatörlerin (potasyum, hidrojen iyonları, ATP ve bradikinin) salınmasını sağlar. Bu maddeler, doğrudan sinir

uçlarını etkinleştirmek ve diğer hücelere ve afferent sinirlerin arasında (örneğin histamin, serotonin (5-HT), sinir büyüme faktörü (NGF) ve prostanoidler için) aljezik mediyatörlerin salınmasını tetikler (Kennedy ve Leff, 1995). Bu afferent sinir terminallerinin uçlarını duyarlılaştırarak ağrılı uyaranlara karşı tepkiyi artırır. Prostaglandinler, araşidonik asit türevleri, bradikinin ve diğer ağrı üreten maddelere sinir terminallerinin duyarlılığını artırır. İkincil nöronlarda P maddesi, histamin, 5-HT ve sitokinler arasında ikincil nöronlarda olan döngüsel etkileşme, yakındaki nosiseptörleri duyarlı hale gelmesine yol açar. Sinir uçlarından salınan SP mast hücre degranülasyonunu aktive ederek histamin salınımına neden olur. Bu şekilde kemiyasal mediyatörler arasında döngüsel etkileşme ortaya çıkar (Tracey ve Walker , 1995).

#### *Serotonin*

Serotonin, antinoseptif ve pronoseptif ağrı regülasyonunda rolü olduğu belirtilmiştir ve ağrı üzerinenihai etkileri reseptörlerin alt tipleri ve ağrının durumu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Millan, 2002; Sommer, 2006). Sonuç olarak, serotoninin ağrı üzerine etkileri henüz tam olarak açıklığa kavuşmamış bir konudur; Örneğin, serotonerjik nöronlar eksik nakavt farelerde yapılan bir çalışmada normal termal ve visceral ağrı tepkileri gösterirken mekanik hassasiyetleri azalmış ve inflamatuvar ağrı hassasiyeti artmış (Zhao ve ark., 2007).

#### *Bradikinin*

Dokuda meydana gelen zedelenme sonucu plazma kininojeni olan bradikinin salınır ve ağrının yanısıra vazodilatasyona ve vasküler permeabilite artışına neden olur. Bradikinin'in insanlarda intradermal enjeksiyonunun, doza bağlı bir ağrı,ısı ve hiperaljeziye neden olması, nosiseptörlere karşı duyarlaştırıcı ve uyarıcı etkisi olduğunu da göstermektedir (Manning ve ark., 1991).

#### *Histamin*

Histaminin H1, H2 ve H3 reseptörleri hem periferde hem de santral sinir sisteminde bulunur. Histamin, mast hücrelerinden, bazofiller ve trombositlerden P maddesi, interlökin-1 (IL-1) ve TNF- $\alpha$  gibi iltihap mediyatörlerinin etkisi ile salınır. Salınan histamine duyu sinirlerini daha da hassaslaştırır ve bu etkilerine çoğunlukla H1 reseptörler aracılık eder. Ancak histaminin santraldeki etkileri biraz daha karmaşıktır (Simone ve ark., 1991; Barret ve Boitano, 2015). Gerçekten de, duyu nöronları histamin H1 reseptörlerini içermekte ve H1 reseptörlerin inaktivasyonu çeşitli duyuusal nöronların membran kalsiyum geçirgenliğini arttırmaktadır. Dolayısıyla duyu nöropeptidlerinin salınmasını uyarıyor bunun yanı sıra hiperaljezi ve başka pro-enflamatuvar etkilerini oluşturmak için endotel hücrelerinden prostaglandinleri ve mono hidroksi eikosate traenoik asitlerin (HETEs) salınmasını uyarır (Rang ve ark., 1994).

#### *P maddesi*

Santral ve periferik sinir sisteminde yer aldığı bilinmektedir. P maddesi, omurilik dorsal boynuz düzeyinde etki eden, nosisepsiyonun iletiminde önemli bir peptid olarak kabul edilmektedir. Periferik sinirlerin küçük çaplı lifleri içinde yer alan önemli nöropeptidlerden biridir ve P maddesi medulla spinalisteki birinci sıra nöronlardan salınır (Jessell ve ark., 1977; Zubrzycka ve Janecka, 2000, ).

### *Prostanoidler*

Araşidonik asitten meydana gelen prostaglandinler (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>), prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) ve tromboksan A<sub>2</sub> biyolojik olarak aktif bileşiklerdir. Ağrı, inflamasyon ve ateş oluşumunda rol alan maddelerdir. PG'ler nosiseptörlerin periferik terminallerini EP<sub>1-4</sub> ve IP reseptörlerini aktive ederek hassasiyet meydana getirirler (Tilley, 2001; Barret ve Boitano, 2015).

### *ATP (Adenosin- 5'-trifosfat)*

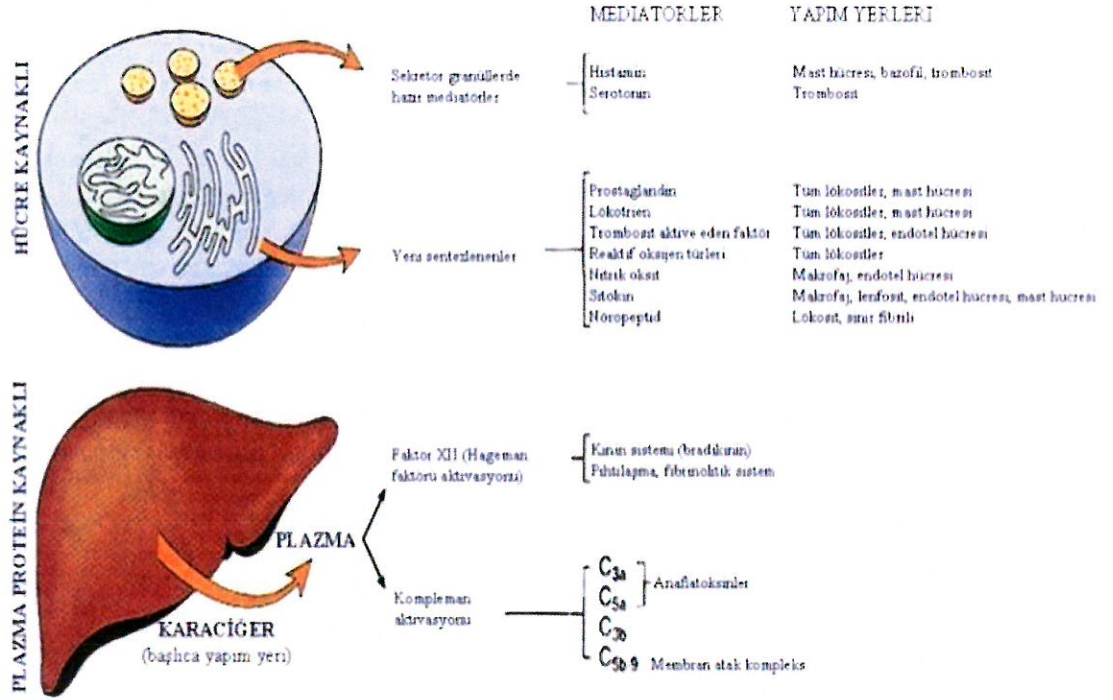
ATP (adenosin- 5'-trifosfat) hücresel solunum sırasında üretilen ve birçok hücresel süreçler tarafından tüketilen hücre içi enerji için önemli bir kaynaktır. İnsan deneyleri deriye doza bağlı şekilde ATP verildiğinde ağrıya neden olduğunu göstermiştir (Halimton ve ark., 2000). ATP membranı geçemediği için, nosiseptör olarak plazma membranında bulunan ATP reseptörleri, hücre dışı boşluğa hasarlı hücrelerden salınan ATP ile bağlanır. ATP, P<sub>2</sub>- reseptör ailesinin iki farklı reseptör alt tiplerini hedefler: ATP iyonotropik P<sub>2X</sub> reseptörleri ve metabotropik P<sub>2Y</sub> reseptör aktive eder. Şu anda, yedi farklı P<sub>2X</sub> reseptör ve sekiz P<sub>2Y</sub> alt tipleri tespit edilmiştir. P<sub>2X2</sub> ve P<sub>2X3</sub> reseptörleri DRG küçük duyu nöronlarında bulunmaktadır. Deneysel çalışmalar, DRG nöronlarında ATP'ye bağlı iletme homomerik P<sub>2X3</sub> reseptörlerinin ve heteromerik P<sub>2X2</sub>/P<sub>2X3</sub> reseptörlerinin büyük ölçüde aracılık ettiğini göstermektedir (Cockayne ve ark., 2000).

### *Reaktif Oksijen Türleri*

Reaktif oksijen türleri (ROS) hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil türleri ihtiva etmektedir ve gen transkripsiyonu faaliyetlerinin bir dizi düzenlemesi için önemli olan hücre elektron transfer reaksiyonları normal ürünleridir. Normalde ROS üretimi süperoksit dismutaz ve katalaz antioksidan aktivite ile kontrol edilir. Doku hasarı üzerine hızlı vazokonstriksiyonun sonucu olarak gelişen iskemi sırasında ROS konsantrasyonları fizyolojik olmayan bir şekilde düşük seviyelere ulaşır ve böylece antioksidan aktivite engellenmiş olur. Daha sonra, doku reperfüzyonu katalaz kolajenaz, stromelisin ve sitokin üretimini uyarır Hücre yüzey reseptörlerin, yapışma molekülleri ve büyüme faktörlerin üretimini de uyarır. Hidrojen peroksit, bradikinin ve prostaglandin dahil olmak üzere diğer enflamatuvar mediyatörlerin etkisini artırır .Bir başka reaktif molekül, olan nitrik oksit (NO) deri içine enjekte edilmesi üzerine geciktirilmiş yanma ağrısına neden olmuştur (Holthusen ve Amdt, 1994) NO donörlerinin doğrudan beyin duyu lifleri aktive ettiğini ileri sürülmüştür, vazodilatör kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) salınımına neden olmaktadır (Wei P ve ark.,1992). Kalsitonin gen ilişkili peptid nitrogliserin ve sodyum nitroprussid'in kedi arteriollerinde vasodilatör etkisini aracılık eder ve bundan başka NO'in gerçekten de, migren ve diğer baş ağrısı tiplerinde katkısı olabileceği önerilmiştir (Olesen ve ark., 1994) .

### *Protonlar*

Proton üretimi iltihaplanmada artar ve iltihab ile ilişkili hiperaljezide yer alması muhtemel ve kas egzersiz hipoksi/anoksi nedeniyle oluşan ağrı ve rahatsızlık hissinin de fark edimesinde yer alması muhtemeldir. Nitekim nosiseptörlerin doğrudan aktivasyonu asidik çözeltilerin intradermal enjeksiyonu ile üretilen keskin batma ağrı oluşması ve düşük ekstrasellüler pH, diğer iltihap mediyatörlerinin etkisini artırdığı gösterilmiştir (Bevan, 1994).

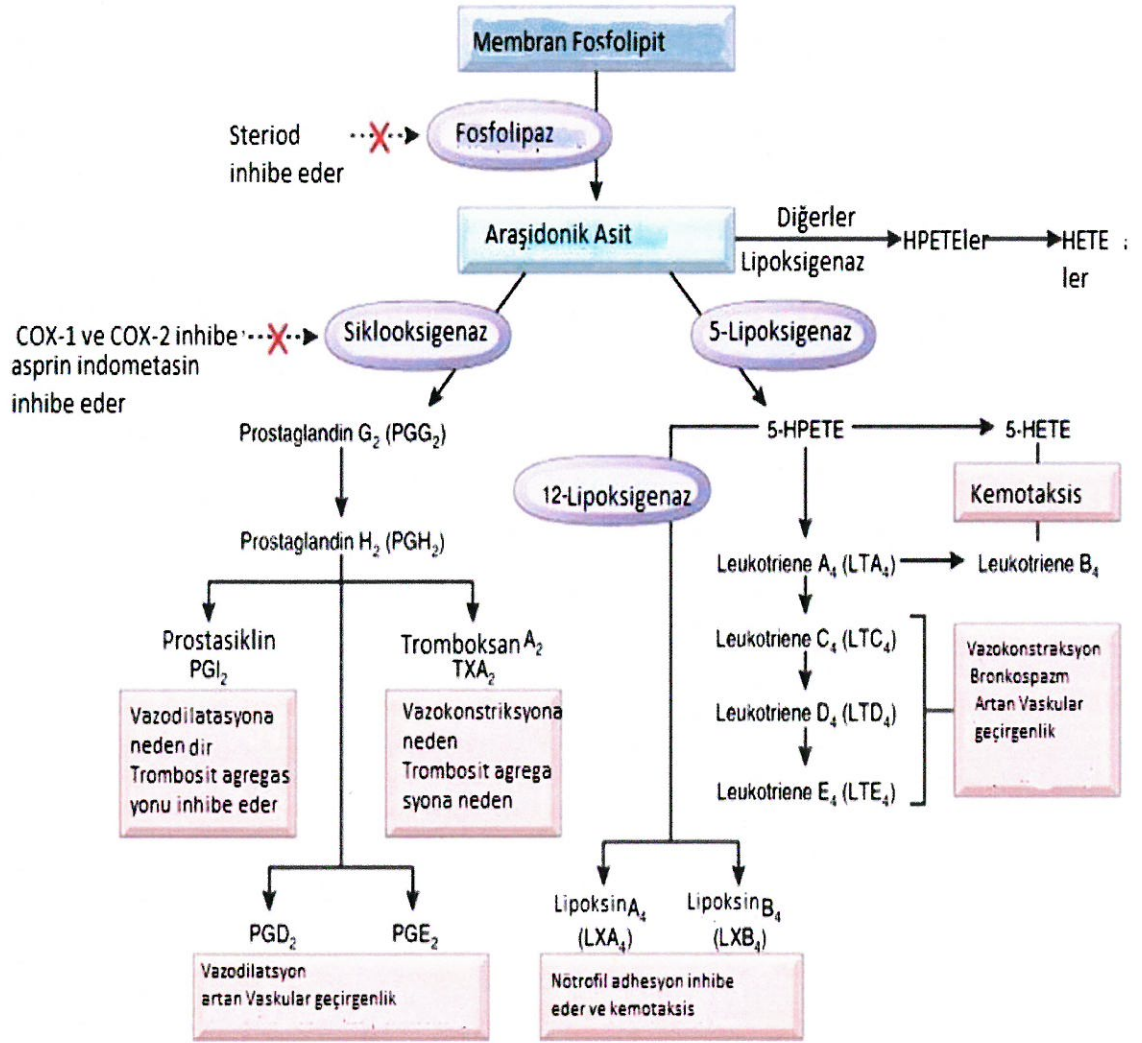


**Şekil 3. Enflamatuar Kimyasal Mediatörler.**enflamatuvar yanıt çok sayıda kimyasal sinyaller tarafından düzenlenir. Bu sinyaller(enflamatuar mediatörler) hücrelerden(hücreyel mediatör) ve vücut sıvılarından (humöral mediatör) gelir (http1).

### Analjezik Etkili İlaçlar

#### *Non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar*

Non -steroidal anti-enflamatuar ilaçlar NSAII en yaygın olarak kullanılan analjezik, antiromatizmal ve antipiretik ilaçlardır. NSAII'ların etki mekanizmalarını açıklamak için birkaç farklı hipotez ileri sürülse de en çok kabul gören siklooksijenaz (COX) enzim inhibisyonu yaparak PG sentezini inhibe etmeleridir (Ferrier ve ark., 1978). Prostaglandinler (PG'ler), enzimler tarafından kontrol edilen reaksiyon kaskadı ile araşidonik asitten sentezlenirler.



**Şekil 4. Araşidonik asit kaskadı ve metabolitleri. Araşidonik asit metabolitlerinin üretimi ve iltihaptaki rolleri. Bazı ana yollar enzimlerin farmakolojik bloke edici etkisiyle inhibe ediliyor. (COX-1 ve COX-2, siklooksijenaz 1 ve 2; HETE, hidroksieikosatetraenoik asit; HPETE, hidroperoksieikosatetraenoik asit (Vinayve ark., 2007)).**

Bu enzimler, araşidonik asitin membran fosfolipitlerinden serbestlenmesini sağlayan fosfolipaz A2 ve siklooksijenaz I ve II'dir (Vane, 1996). Bu mekanizma NSAİİ'nin anti-inflamatuar etkisini açıklayabilir. NSAİİ ağrı reseptörleri üzerinde PG'lerin duyarlaştırıcı eylemini inhibe ederek periferik analjezik etki gösterdikleri ileri sürülmüştür (Ferriera,1972). NSAİİ santral olarak analjezik etki yapabilir (Ferriera ve ark., 1978; Hunskaar ve ark., 1985). NSAİİ'lerin periferik analjezik etkisi, prostaglandin biyosentezinin inhibe edilmesi ile bağlantılı olduğu halde, merkezi etki mekanizmaları net değildir. Bununla birlikte, PG'in yer aldığı en azından kısmen bilinmektedir. PG'ler aynı zamanda yaygın olarak merkezi sinir sisteminde dağıtılır ve ağrılı periferik uyarıyı takiben serbest bırakıldıkları düşünülmektedir (Ramwell ve Shaw, 1966; Ferreira ve ark., 1978).



### ***Opioid İlaçlar***

Opioidler, klinik kullanımda en etkili analjezikler sınıfını oluşturur. Vücutta aynı sistem içerisinde hareket ederek; endojen opioid peptitler ve opioid analjezikler analjezik etkiye neden olurlar (Kavaliers, 1988). Endojen opioid sistem ağrının modülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Bir düzineden fazla endojen opioid peptid vardır. Bunlar 4 ana gruba ayrılır; enkefalinler, dinorfinler endorfin ve orfaninler (Yaksh, 1987). Bu maddeler, G-protein kenetli reseptörler olan opioid reseptörlere bağlanarak antinosiseptif etki gösterirler. Ağrıda rol oynayan opioid reseptörlerinin üç tipi izole edilmiştir;  $\mu$  opioid reseptörler (MORS),  $\delta$  opioid (DOR) ve  $\kappa$  opioid (KOR) reseptörler (Simon, 1991; Akil ve ark., 1998). Bu üç reseptörde aktivasyon sonucu adenililsiklaz inhibisyonu gerçekleşir ve opioidlerin ana rolü olarak sinirsel uyarılarda azalma meydana gelir. Supraspinal ve spinal analjeziye aracılık ederler (Stein ve ark., 2009; Barret ve Boitano, 2015).

### **Diğer Sistemlerde Etkili İlaçlar**

#### ***Antikonvülzanlar***

Antikonvülzanlar beyinde aşırı elektriksel aktivitenin azalmasını ve böylece konvülsiyonların engellenmesini sağlayan ilaçlardır. Nöropatik ağrı oluşum mekanizmalarından bir tanesi de elektriksel aktivitenin artmasıdır. Bu periferik sinirlerde, omurilik ve beyinde oluşabilir, bu nedenle epilepsi tedavisi için kullanılan bazı ilaçlar nöropatik ağrı tedavisinde etkilidirler. Antikonvülzanlar farklı mekanizmalarla nöronlarda fazla elektriksel aktiviteyi azaltırlar. Elektriksel iletim sisteminin bir parçası olan sodyum ya da kalsiyum kanalını bloke ederler. Bazı maddeler de beyindeki GABA gibi inhibitör nörotransmitterlerin düzeylerini artırarak etki gösterirler (Ross., 2002).

#### ***Antidepresanlar***

Şu anda antidepresanlar antinosiseptif etkisi nedeniyle kronik ağrı tedavisinde, özellikle nöropatik ağrı için önerilen ilaçlardandır. Nöropatik ağrı sinir sistem hasarı nedeni ile olan kronik ağrılı bir durumdur (Moore ve ark., 2011). Antidepresanlar beyindeki belirli kimyasalların seviyelerini değiştirerek etkiler. Noradrenalin ve serotonin beyin ruh hali ve ağrı etkileyen ana role sahip maddelerdir. Her iki madde ruh hali üzerinde bir etkiye sahip olmakla birlikte, noradrenalin ağrı yollarında daha etkili olduğu görülmektedir. Noradrenalin çıkan beyin ağrı mesajlarının iletimini söndürebilir ve trisiklik antidepresanlar noradrenalin ve serotonin geri alımını bloke ederek çalışırlar (Long, 2011).

### **Moringa Hakkında Bilgiler**

*Moringa stenopetala*, *Moringaceae* ailesine ait bir ağaçtır. Bu aile tek bir cinsten oluşmaktadır ve yaklaşık 14 farklı türü vardır (Edwards ve ark., 2002; Shibru, 2002). Bu tür “Shiferaw” “Aleko” diye yöresel isimlerle ve İngilizce’de “Cabbage tree” diye adlandırılmaktadır (Mekonnen ve Gessesse, 1998). *M. stenopetala*, 6-10 m boyunda ve kendi gövde çapı yaklaşık 60 cm olan bir ağaçtır (Edwards ve ark., 2002; Shibru, 2002). 1000-1800m aralığında büyüebilmektedir. Moringa bitkisi tropikal ve subtropikal bölgelerde yetişmekte ve tarihi MÖ 150’ye kadar uzanmaktadır (Arora ve ark., 2013).



**Şekil 5. *Moringa stenopetala* yaprak ve ağacı**

***Besin değeri***

Moringa beslenme ve tıbbi amaçlar için yüzyıllardır kullanımda olmuştur. *M. stenopetala*'nın yaprakları, sebze olarak yenir. Moringa yaprakları portakaldan yedi kat fazla C vitamin, havuçtan dört kat fazla A vitamini süttten dört kat fazla kalsiyum, muzdan üç kat fazla potasyum ve yoğurdun iki katı protein içerir. Moringa yapraklarında tüm temel amino asitler ve diğerleri çok miktarda bulunmaktadır (Mathur, 2005; Steinmüller ve ark., 2002).

**Çizelge 1.100 mg Moringa Yapraklarının amino asit grubu içeriği**

Amino Asitleri	Taze yaprak	Kuru yaprak
Histidin	149.8 mg	613 mg
İzolösin	299.6 mg	825 mg
Lösin	492.2 mg	1,950 mg
Lizin	342.4 mg	1,325 mg
Metiyonin	117.7 mg	350 mg
Valin	374.5 mg	1,063 mg

### *Fitokimya*

Moringa ekstreleriyle yapılan fitokimyasal çalışmalarında flavonoidler, tanenler, alkaloidler, saponinler, polifenoller ve glikozitlerin varlığını ortaya çıkarılmıştır (Arora ve ark., 2013).

### ***Moringa Türlerinin Farmakolojik Etkileri***

Yapraklarının ve köklerinin sulu ekstreleri malarya, hipertansiyon, baş ağrısı, mide rahatsızlıkları, astım ve şeker hastalıkları için tedavi edici olduğuna dair iddialar ve çalışmalar bulunmaktadır (Mekonen ve ark., 1996). Ayrıca *M. stenopetala* visseral layşmanyazis yaygın olduğu yerlerde bir bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır. Bununla beraber *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella* ve *Candida* türüne karşı antimikrobiyal etkisi vardır (Mekonen ve ark., 1998).

### *Antibakteriyal etkileri*

*M.oleifera* (MO) antimikrobiyal bileşenleri çeşitli mikroorganizmalara karşı inhibitör aktivitenin keşfinden sonra onaylanmıştır. MO sulu ekstrelerinin bir çok bakterilere karşı doza bağımlı bir şekilde inhibitör olduğu saptanmıştır, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* da dahil olmak üzere (Saadabi ve Abu Zaid, 2011). MO yağların antibakteriyel aktivitesinin yanı sıra, anti-mantar aktivitesine de sahiptir (Chuang ve ark., 2007). Moringanın 4-(4'-O-asetil-a-L-rhamnopyranosyloxy) benzil izotiyosiyanat, 4-(a-L-rhamnopyranosyloxy) benzil izotiyosiyanat, niyazimisin, benzil izotiyosiyanat ve 4-(a-L-rhamnopyranosyloxy) benzil glukosinolat gibi bileşenler antibakteriyel aktivite bildirilmiştir (Fahey, 2005).

### *Anti-astmatik etkisi*

Moringa bitkisinin alkaloid bileşiklerinin efedrine benzer ve astım tedavisi için kullanılabileceği çok uzun zaman önce bildirilmiştir. Moringa içinde bulunan moringine alkaloidi bronşyolleri rahatlatır (Kirtikar ve Basu, 1975). MO tohum etkinliği ve güvenlik analizi yapmak için yapılan bir çalışmada bronşiyal astım tedavisinde umut verici etki göstermiş ve aynı zamanda astım semptomları ve eşzamanlı solunum fonksiyonlarının iyileşmesine neden olmuş ve şiddetinde belirgin bir azalma göstermiştir (Agrawal ve Mehta, 2008).

### *Antipiretik etkileri*

Moringa türleri biyolojik olarak içerdikleri aktif bileşenlerin anti-inflamatuar etkileri olması nedeniyle antipiretik etkisi olabileceği düşünülmüştür. MO tohumlarının etanol, petrol eteri, eter ve etil asetat ile hazırlanan ekstrelerinin maya ile indüklenen hiperpireksi yöntemiyle antipiretik etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, etanol ve etil asetat ekstrelerinin sıçanlarda belirgin antipiretik etkinlik gösterdiği bildirilmektedir (Hukkeri ve ark., 2006).

### *Antidiyabetik etkinlik*

MO yapraklarının, Wistar sıçanlar ve Goto-Kakizaki (GK) modellenen tip 2 diyabet sıçanlarda kan şekeri konsantrasyonu üzerinde önemli ölçüde azaltıcı etkisi görülmüştür. Antidiyabetik aktivitede polifenollerin hipoglisemik aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmüştür. Moringa yaprakları, kersetin-3-

glikozit, rutin, kampferol, glikozitler ve diğer polifenoller de dahil olmak üzere polifenollerin güçlü bir kaynağıdır (Farooq ve ark., 2012).

#### *Antihipertansif etkileri*

Çok sayıda biyoaktif bileşik içeren Moringa yaprağı kan basıncı üzerinde doğrudan etki göstermektedir. Bu nedenle, kan basıncının dengelenmesi için de kullanılmaktadır. Kan basıncı düşürücü etkisine yol açtığı düşünülen bileşikler nitril, hardal yağı, glikozitler ve tiyokarbamat glikozitlerdir (Anwar ve ark., 2007).

#### *Antioksidan etkileri*

*Moringa olifera* zengin bir antioksidan kaynağıdır. Hint kökenli *M. olifera*'nın metanol ve etanol ekstraktları sırasıyla %65.1 ve %66.8 antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir. Bu etkinin önemli biyoaktif bileşikler olan fenolikler, kuersetin ve kampferolden kaynaklandığı düşünülmektedir (Siddhuraju ve Becker, 2003).

#### *Hepatoprotektif etki*

*M. olifera* çeşitli çalışmalarda anlamlı bir hepatoprotektif aktivite göstermiştir. *M. olifera* etanol ekstraktları karaciğer hasarına karşı önemli bir koruma özelliği olduğunu göstermiştir. Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar [izoniazid (INH), rifampisin (RMP) ve pirazinamid (PZA)] tarafından uyarılan sıçanlarda *Moringa olifera*'nın karaciğer koruyucu etkisi gözlenmiştir (Pari ve Kumar, 2002).

#### *Antitümör etkisi*

*Moringa olifera*'nın güçlü antikanserojen etkiye sahip olduğu ve anti-tümör aktiviteye sahip çok sayıda aktif bileşik içerdiği keşfedilmiştir. MO'nun içerdiği biyoaktif bileşikler arasında, niyazimisin bir tiyokarbamattır ve güçlü bir anti-kanserojen aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Guevaraa ve ark., 1999). Ayrıca, MO içerisinde yer alan niyazimisinin, tümör promotörü Teleosidin B4-kaynaklı ve Epstein-Barr virüsü (EBV) aktivasyonunu ile oluşan tümörü inhibe etmektedir (Murakami ve ark., 1998).

#### *Antispazmodik ve anti-ülser etkiler*

*Moringa* kökü ve yaprakları spazmolitik etkinliğe sahip çok sayıda bileşik içerir. Bu bileşikler, hipotansif ve kalp atım hızını yavaşlatıcı etki ve muhtemelen kalsiyum kanalı blokajı, niyazimisin, niyazinin A, niyazinin B vb ile etkilenen 4-(alfa, L-ramnosil-oksi benzil)-O-metil tiyokarbamat içerir. Bu yüzden spazmolitik aktivitesi olan farklı bileşenlere sahip olması, bu bitkinin halk arasında mide-bağırsak motilite bozukluğu için geleneksel kullanımları desteklemektir (Gilani ve ark., 1994). MO metanolik ekstresi deneysel olarak farelerde asetilsalisilik asit, serotonin ve indometasin ile oluşturulan gastrik lezyonları engellemesinde yetenekli olduğunu görülmüştür (Pal ve ark., 1995).

#### *Kardiyak ve dolaşım uyarıcı etkisi*

Bu çalışmada lyofilize edilen hidroalkolik *M. Oleifera* ekstresinin izoproterenole (ISP) bağlı miyokard enfarktüsü modelinde kalbi koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Kronik *M. oleifera* tedavi sonunda süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, laktat dehidrogenaz ve kreatin kinaz-MB gibi

biyokimyasal enzimlerin önemli bir olumlu modülasyonu görülmüştür. Ancak ISP kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalmış glutasyon miktarında anlamlı bir etki göstermemiştir. Moringa tedavi sırasında myokardiyal dokuda belirgin lipit peroksidasyonu artışını engellemiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, *M.oleifera* ekstresi kalbi koruyucu etkisi yönünden önemli olduğu sonucuna varılmaktadır. Mekanizma olarakta antioksidan, antiperoksidatif ve miyokard koruyucu özelliklerine bağlı olduğunu düşünmektedir (Nandave ve ark., 2009).

### **Toksisite**

*Moringa* kullanımı sırasında meydana gelebilen yan etkilere bakılacak olursa, *M.stenopetala* sulu yaprak ekstresinin farklı dozlarda yapılan deneylerinde 5000mg/kg doza kadar ne toksik etki ne de ölüm gözlenmiştir ve (Ghebreselassie ve ark., 2011; Musa ve ark., 2015). Güney Etiyopya'da yapılan bir çalışmada *M.stenopetala* yapraklarının tüketimi ve guatr prevalansı arasında bir ilişki olduğunu aşırı ve sık tüketimi hipertiroidi nedeni olabileceği ve ağırlaştırıcı faktör olarak bulunmuştur (Abuye ve ark., 1999).

### **Yapılan çalışmalar**

*M. stenopetala*'nın Etiyopya'da halk arasında analjezik aktivitesi için kullanılmakta olduğunu belirtilmektedir (Seid, 2013). Metanol ekstreleriyle yapılan bir çalışmada da, bu bitkinin farklı dozlarında analjezik etkileri olduğu bildirilmiştir (Geremew ve ark., 2015)

Moringa ile ilgili bu bilgilerden yola çıkarak, *Moringa stenopetala* bitkisinin yapraklarından elde edilen %80 metanol ekstresinin olası analjezik etkisinin ve bu etkinin hangi mekanizmalar aracılığı (adrenerjik, serotonerjik ve opioderjik) ile oluştuğunun araştırılması amaçlanmıştır.

## **GEREÇLER**

### **Hayvanlar**

Çalışmalarımızda kullandığımız hayvanlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi'nden her iki cinsten olmak üzere Swiss albino (30-35g) alınmıştır. Fareler 18-25°C'de, iyi havalandırılmış ve 12 saat gece/gündüz aydınlatmalı odalarda barındırılmışlardır. Deneyler öncesinde hayvanlar akşamdan aç bırakılmışlardır. Bu çalışmadaki deneysel prosedürler için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan izin alınmıştır (470-1).

### **Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar**

Asetik asit (Sigma-Aldrich, ABD)

Dipiron (Sigma-Aldrich, ABD)

$\beta$ -karoten (Sigma-Aldrich, ABD)

Gallik Asit (Sigma- Aldrich, ABD)

BHT (Sigma-Aldrich, ABD)

Folin-Ciocalteu reaktifi (Sigma-Aldrich, ABD)

### **Cihazlar**

Hot-Plate (No. 7280, Ugo Basile Instruments, Comerio, Italy)

Hassas terazi (OHAUS)

Sıcak su banyosu (Sigma)

Kronometre (ISOLAB)

## YÖNTEM

### Bitki Ekstresinin Hazırlanması

*Moringa stenopetala* Baker f. kuru yaprakları metanol ekstresinin elde edilmesi için kullanılmıştır (AL-001). Öncelikle kuru yapraklar toz haline getirilmiştir. 150g tartılan yapraklar üzerine 1000 mL % 80'lik metanol eklenerek oda sıcaklığında 72 saat çalkalayıcıda masere edilmiştir. Bu süre sonunda süzgeç kâğıdından süzölmüştür. Süzöntüdeki metanol rotavaporda uçurularak kalan sulu ekstre liyofilize edilmiştir. 22.85 gr (% 15.85 w/v) *Moringa stenopetala* ekstresi elde edilmiştir.

### Alkaloid tayini

**Hager's testi:** 50 mg ekstre 3 mL seyreltik HCl ile karıştırılır ve filtre edilir. 2 mL filtrat üzerine 1 mL Hager's reaktifi (pikrik asit çözeltisi) eklenir. Belirgin sarı çökelek oluşumu alkaloid göstermektedir.

**Dragendorf testi:** Birkaç mL filtrat 1 ya da 2 mL Dragendorf reaktifi (potasyum bizmut iyodür çözeltisi) ile karıştırılır. Belirgin sarı çökelek oluşumu pozitif test sonucudur.

### Karbonhidrat tayini

**Molish's testi:** 100 mg ekstre 5 mL distile su ile çözölür ve filtre edilir. 2 mL filtrat 2 damla % 15'lik  $\alpha$ -naftolün alkolik çözeltisi ile muamele edilir ve iyice karıştırılır. 1 mL konsantre sülfürik asit tüpün kenarından yavaşça ilave edilir. Menekşe rengi halka oluşumu karbonhidrat varlığını göstermektedir.

**Fehling's testi:** 100 mg ekstre 5 mL distile su ile çözölür ve filtre edilir. Filtrat seyreltik 6 mL HCl ile hidrolize edilir ve 2'şer mL Fehling A ve B çözeltisi ile ısıtılarak nötralize edilir. Kırmızı çökelek oluşumu indirgen şeker varlığını göstermektedir.

### Glikozit tayini

**Borntrager testi:** 50 mg ekstre üzerine konsantre HCl eklenir ve 2 saat su banyosunda bekletilir. Filtre edildikten sonra 2 mL filtrat 3 mL kloroform ile iyice çalkalanır. Kloroform tabakası ayrılır ve % 10'luk amonyak çözeltisi eklenir. Pembe renk oluşumu glikozitlerin varlığını göstermektedir.

**Sülfürik asit testi:** 100 mg ekstre 5 mL distile su ile çözölür ve filtre edilir. 1 mL konsantre sülfürik asit 1 ml test çözeltisine eklenir. 2 dk. beklenir. Kırmızımsı renk oluşumu gözlenmiştir.

### Saponin tayini

**Frothing testi:** 50 mg ekstre 20 mL distile su ile çalkalanır. Yaklaşık 2 cm köpük tabakası oluşumu saponinlerin varlığını göstermektedir.

### Fenolik bileşik tayini

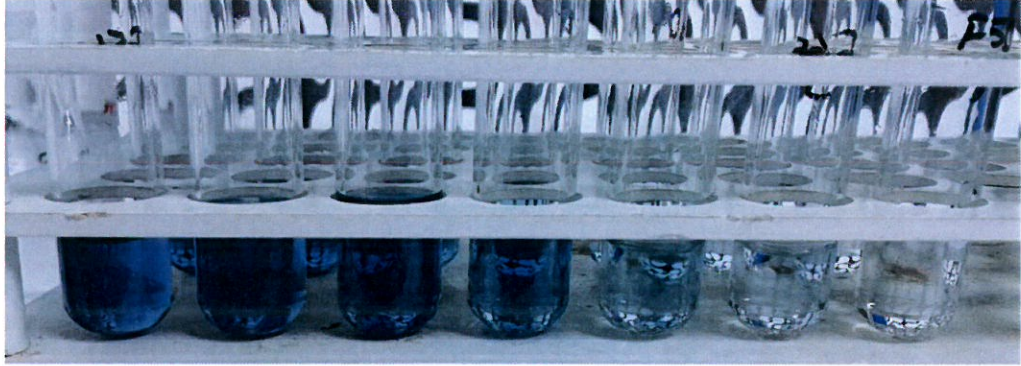
**Kurşun asetat testi:** 20 mg ekstre distile suda çözölür. 3 mL % 10'luk kurşun asetat çözeltisi eklenir. Beyaz çökelti oluşumu fenolik bileşiklerin varlığını göstermektedir.

### **Toplam fenolik madde miktarı tayini**

Folin-Ciocalteu yöntemi toplam fenolik madde içeriğini belirlemek için kullanılmıştır. Toplam fenol gram ekstrede mg gallik asit (mggallik asit/grekstre) olacak şekilde ifade edilmiştir.

Ekstrenin 10, 5 ve 1 mg/mL olmak üzere 3 farklı konsantrasyonu hazırlanmıştır. 50 µL numune üzerine 3,9 mL saf su eklendikten sonra 250 µL Folin reaktifi ilave edilmiştir. 750 µL % 20 (w/v)'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi eklendikten sonra 25 °C'de 2 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. 760 nm'de spektrometrede absorpsanları okunmuştur. Her bir konsantrasyon 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Gallik asit kalibrasyon grafiğinde yerine konularak mg gallik asit/gekstre olarak çizelge 2'de verilmiştir.

Gallik asit kalibrasyon grafiği için 0.1 gr gallik asit 1 mL metanol ile çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltiden 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 ve 0.1 mg/mL konsantrasyonda dilüsyonlar hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon 3 tekrarlı çalışılmıştır. Gallik asit konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorpsan değerleri grafiğe geçirilmiştir (Singleton ve ark., 1999).



**Şekil 6. Gallik Asitin Farklı Konsantrasyonlardaki Toplam Fenol İçeriği (Folin-Ciocalteu yöntemi)**

### **LCMS-IT-TOF Sistem Analizi**

Metanol içinde çözülen numuneler Shimadzu hibrit LCMS-IT-TOF sistemine (Kyoto, Japonya) 0,3 µL enjekte edilerek ESI pozitif ve ESI negatif modunda iyonlaştırılmıştır. Sistemde mobil faz olarak Asetonitril-Su (% 0,1 Formik asit içeren) gradient karışımı kullanılmış ve Shimpack FC-ODS C18 (150 mm x 2 mm, 3µm) kolonda kromatografik ayırım yapılmıştır. Sonuçlar LCMS solution yazılımı kullanılarak alınmış ve değerlendirilmiştir. Analiz sonucu elde edilen kütleler drugbank veritabanı kullanılarak taranmış ve ilgili bileşiklere ulaşılmıştır.

### **Test Maddelerinin Uygulanması**

*M. stenopetalaya* praklarının %80 metanol ekstresi (MSE) serum fizyolojik (SF) içerisinde çözülerek 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda test maddeleri hazırlanmıştır. Test maddeleri farelere oral gavaajla verilmiştir. Kontrol grubuna test maddeleri ile aynı miktarda (0,1ml) SF ve pozitif kontrol grubuna ise hem santralde hem



periferde etkili olduğu bilinen non-steroidal antiinflamatuvar bir ajan olan dipiron (500mg/kg) uygulanmıştır. MSE'nin antinosiseptif etkili olan dozlarından 100mg/kg seçilerek, test maddemizin etki mekanizmasının incelenmesi amacıyla opioid reseptör antagonisti nalokson (5mg/kg) test maddesinden 15 dakika önce, adrenerjik yolağın değerlendirilmesi amacıyla alfa-2 reseptör antagonisti yohimbin (1mg/kg) ve serotonerjik yolağı değerlendirmek için ise 5-HT<sub>2</sub> reseptör antagonisti ketanserin (1mg/kg) test maddesinden 30 dakika önce uygulanmıştır. Çalışmamızda kullanılan antagonistlerin de kontrolleri ve SF varlığında sonuçları alınarak değerlendirilmiştir.

#### **Sıcak Plaka Testi (Hot-Plate)**

Santral ağrı eşiğinin değerlendirilmesinde hala en sık kullanılan yöntemlerden biri olan sıcak plaka testi (hot-plate-No. 7280, Ugo Basile) 1953 yılında Eddy ve Leimbach tarafından geliştirilmiştir. Temel olarak 55-56°C'ye ısıtılmış bir plakadan ve hayvanın ısıtılan yüzey üzerinde hareketini kısıtlamayacak şekilde bir cam pleksiglas silindirden oluşmaktadır. Isıtılmış plaka üzerine konduğunda deney hayvanında ayak tabanını yalama, sıçrama veya yükselme hareketlerinden biri/birkaçı gözlenir. Hayvanların ayaklarının sıcaktan zarar görmesini engellemek için deneyin bitirilme süresi 20 sn olarak belirlenmiştir. Ölçümler, hayvanlara hem madde verilmeden önce hem de madde verildikten 45 dk sonra yapılmıştır (Bastos ve ark., 2006; Kılıç ve ark., 2006).

#### **Kuyruk Daldırma Testi (Tail-immersion)**

Bu yöntemde hayvanın kuyruğunun (ucundan itibaren 3 cm lik kısmı) 52,5±0,2°C sıcaklığındaki su içerisine daldırılarak deney hayvanının verdiği reflekscevabın ölçüldüğu ve spinal düzeydeki analjezini ölçümüne olanak sağlayan bir testtir. Kuyruğun sıcak suya batırılmasından bir kaç saniye sonrasında farenin kuyruğunu bazen de tüm bedenini çekilmesi ile sonlanır (Alviano ve ark., 2004). Ölçümler, hayvanlara madde verilmeden önce ve madde verildikten 45 dk sonra yapılmıştır. Veriler % maksimum olası etki olarak hesaplanmıştır. Hayvanların kuyruklarının sıcaktan zarar görmesini engellemek için deneyin bitirilme süresi 15 sn olarak belirlenmiştir (Aydın ve ark., 2003).

#### **Kıvrınma Testi (Writhing)**

Asetik asit kaynaklı acı kasılması yöntemi hayvanlarda asetik asitin intraperitoneal olarak uygulanmasından sonra meydana gelen bir gerginlik olarak tanımlanır ve bu yöntem analjezik etkinliğin değerlendirilmesi için kullanılabilir bir yol olarak kabul edilmiştir. Test maddelerinin oral olarak uygulanmasından 45dk. sonra %0,6'lık asetik asit uygulaması yapılmış ve 5 dakika bekleme süresinden sonra 10 dakika boyunca hayvanların kıvrınma sayıları kaydedilmiştir (Koster ve ark., 1959).

#### **Verilerin Değerlendirilmesi**

Çalışmamızda elde edilen tüm değerler, tek tek deneysel verilerin aritmetik ortalaması olarak belirlenmiştir. Kontroller ile test maddesi uygulanan hayvanlar arasında görülen farklılıklar One-way ANOVA testi uygulanarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Deney sonuçları olarak elde edilen tüm verilerin istatistik analizleri için GraphPad Prism version 5.0 istatistik programı

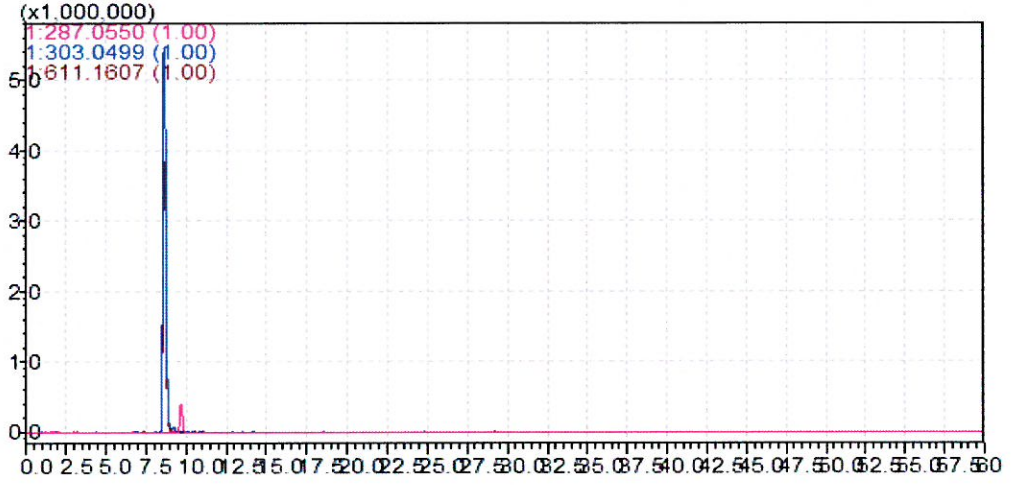
kullanılmıştır. Hot-plate ve tail-immersion testlerinde elde edilen değerler aşağıdaki formülde yerine koyularak %'ye çevrilmiştir:

$$\% \text{ maksimum olası etki} = \frac{[\text{ilaç sonrası reaksiyon zamanı} - \text{ilaç öncesi reaksiyon zamanı}]}{[(\text{cut - off} = \text{test kesme süresi}) - \text{ilaç öncesi reaksiyon zamanı}]} \times 100$$

## BULGULAR

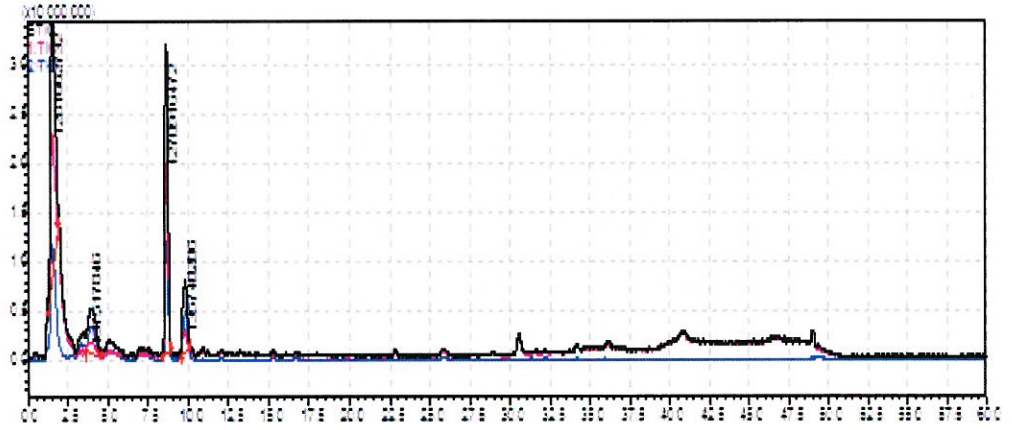
### LCMS-IT-TOF Sistem Analizi

*M.stenopetala* yapraklarının metanol ekstresinin (MSE) metanol içinde çözölen numunelerinin Shimadzu hibrit LCMS-IT-TOF sistemine verilmesi sonucunda yüksek miktarda kersetin ve rutin ayrıca elde edilen verilere göre luteolin ve/veya kamferol içerdiği tesbit edilmiştir (Şekil 10-11). Luteolin yada kamferol içeriklerinin tam ayrıştırılabilmesi için daha farklı analizlere ve ekstrenin fraksiyonlanması gerekmektedir.



Şekil 7. LCMS-IT-TOF Sisteminden Alınmış Kütle Spektrumu.

m/z 303.0487 : Quercetin (303.0499)  
m/z 611.1587 : Rutin (611.1607)



Şekil 8. LCMS-IT-TOF Sisteminden Alınmış Kütle Spektrumu.

m/z 287.0533: Kaempherol/Luteolin (287.0550)

### Toplam Fenol Miktarı Tayini

*M. stenopetala* metanol ekstresinin Folin-Ciocalteu Metodu kullanılarak tayin edilmiş toplam fenolik madde miktarı  $187.5 \pm 12.4$  (mg GAE/g ekstre) olarak hesaplanmıştır (Tablo 2). Yapılan kalitatif analiz sonuçları tablo 3’de verilmiştir.

Çizelge 2. Ekstrenin toplam fenolik madde miktarı

Ekstre konsantrasyonları	mg <sub>gallik asit</sub> /g <sub>ekstre</sub> ± STD
10 mg/ML	941.1±14.0
5 mg/mL	503.9±10.6
1 mg/mL	187.5±12.4

Çizelge 3. Kalitatif fitokimyasal analiz sonuçları

Alkaloit	Karbonhidrat	İndirgen şeker	Glikozit	Saponin	Tanen
Hager’s testi	Molish’s testi	Fehling’s testi	Borntrager testi	Frothing testi	Jelatin testi
+	+	+	-	-	-
Dragendorf testi			Sülfürik asit testi		
+			-		
Fenolik bileşik	Flavonoid	Müsilaaj	Fitosterol	Sabit yağ	Terpen
Kurşun asetat testi	Demir klorür testi	Whistler and BeMiller testi	Libermann-Burchard testi	Spot testi	Salkowski testi
+	+	-		+	+
Demir klorür testi					
+					

### Sıcak Plaka Test (Hot-Plate) Sonuçları

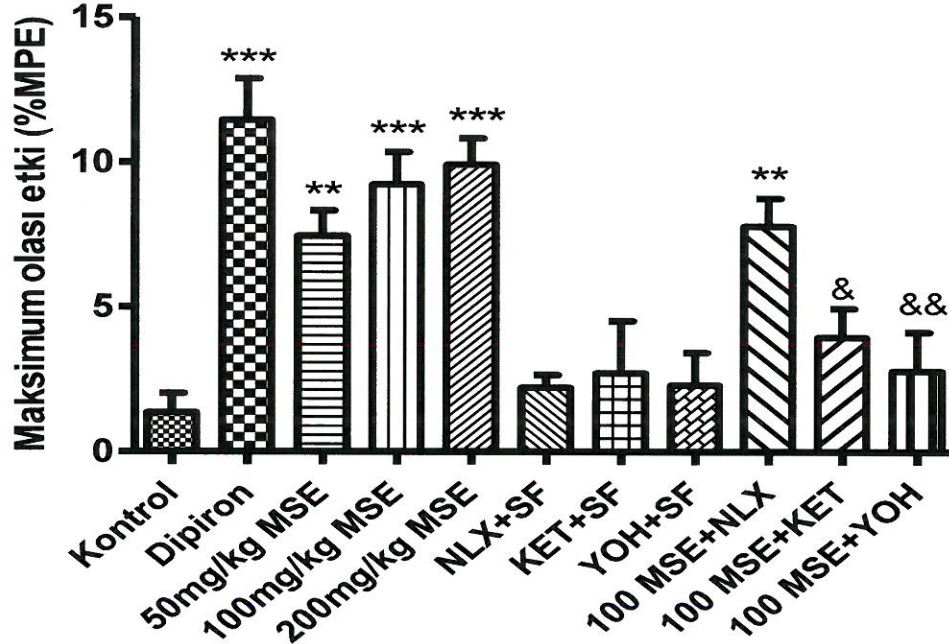
*M. stenopetala* yapraklarının metanol ekstresinin üç farklı dozunda (50, 100 ve 200mg/kg) hem santral hemde periferik analjezik etkinliği değerlendirilmiştir. Şekil 9’da 50, 100 ve 200 mg/kg MSE’nin santral düzeydeki noisepsiyonunun değerlendirilmesi amacıyla yapılan sıcak plaka testinde elde edilen verilere göre hesaplanan maksimum olası etkileri verilmiştir. MSE, her üç dozda da termal uyarana bağlı olan yanıtı kontrole göre anlamlı derecede uzatmıştır (sırasıyla  $P <$

0.01;  $P < 0.001$ ;  $P < 0.001$ ). Pozitif kontrol, dipiron daha önce santral analjezik etki gösterdiği doz seçilerek kullanılmıştır, MSE'nin de özellikle 100 ve 200 mg/kg dozlarda dipirona yakın analjezik etki gösterdiği belirlenmiştir. Aynı testte etkili olan dozlardan 100mg/kg seçilerek antagonistlerin varlığında antinosiseptif etki mekanizması değerlendirilmiştir. 5 mg/kg Nalokson (opioid antagonist) varlığında 100mg/kg MSE'nin analjezik etkinliğinde anlamlı bir geri dönüş olmamıştır. Ketanserin (5-HT<sub>2</sub> reseptör antagonisti-1mg/kg) ve yohimbin ( $\alpha_2$  reseptör antagonisti-1mg/kg) uygulamasında ise analjezik etkide anlamlı geri dönüş olduğu belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ ). Bu nedenle ekstrenin santral analjezik etkisinin bir kısmının serotonerjik ve adrenerjik reseptörler üzerinden gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Opioiderjik sistemin ise bu etkide rol oynamadığı söylenebilir.

#### Kuyruk Daldırma Test (Tail-immersion) Sonuçları

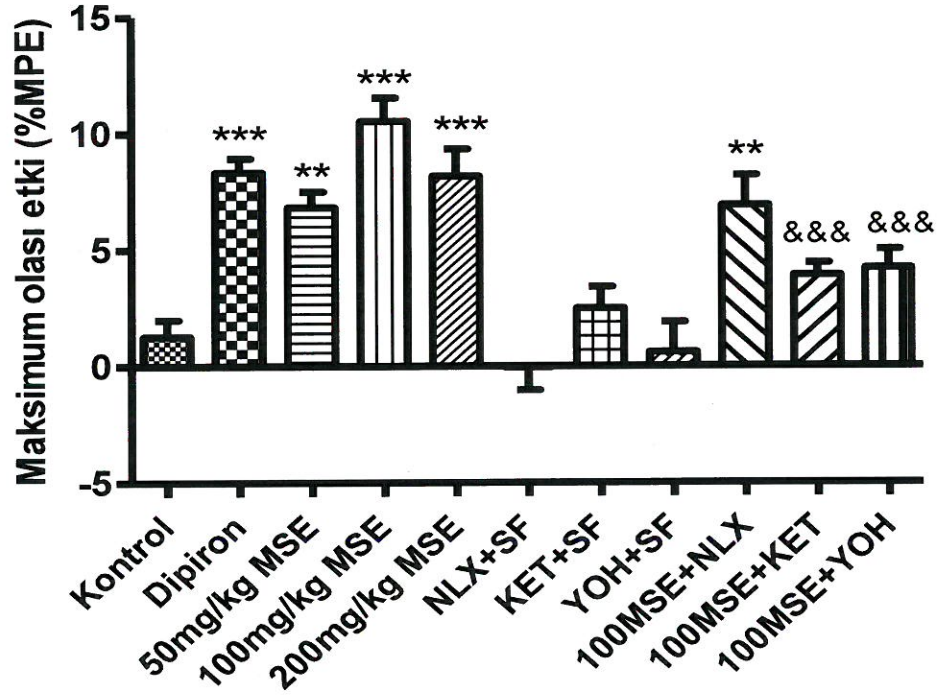
Bir diğer santral analjezik aktivite değerlendirme testlerinden biri olan kuyruk daldırma testi sonuçları şekil 10'da verilmiştir. Sıcak plaka testine benzer olarak MSE 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda anlamlı analjezik etkinlik göstermiştir (sırasıyla  $P < 0.01$ ;  $P < 0.001$ ;  $P < 0.001$ ). Analjezik etki mekanizmasını incelemek amacıyla uygulanan antagonistlerden ketanserin ve yohimbin varlığında ise MSE'nin analjezik etkinliğinde anlamlı bir azalma görülmüştür ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ).

#### MSE Sıcak-Plaka Testi



Şekil 9. Sıcak-Plaka Testinde MSE'nin Olası Maksimum Analjezik Etkisi. MSE: *Moringa stenopetala* metanol ekstresi, Değerler ortalama±SEM. Kontrol grubuna göre anlamlı fark: \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; 100mg/kg MSE'ne göre anlamlı fark: & $P < 0.05$ ; && $P < 0.01$ , (n=7-8).

## MSE Kuyruk Daldırma Testi

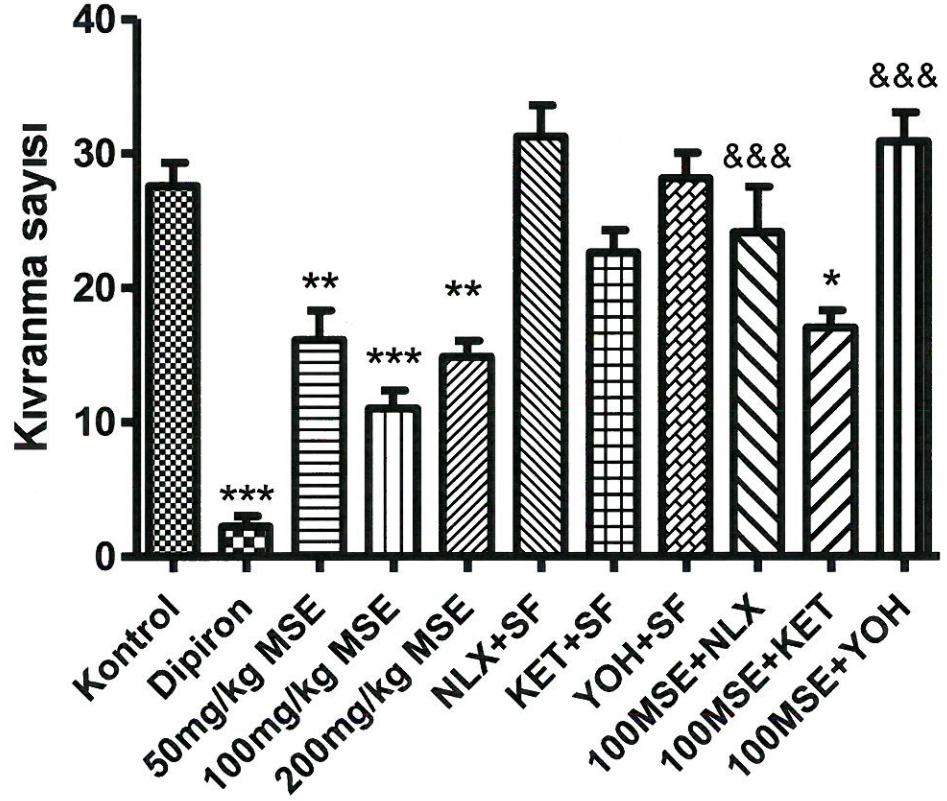


Şekil 10. Kuyruk Daldırma Testinde MSE'nin Olası Maksimum Analjezik Etkisi. MSE: *Moringa stenopetala* metanol ekstresi, Değerler ortalama±SEM. Kontrol grubuna göre anlamlı fark: \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; 100mg/kg MSE'ne göre anlamlı fark: &&& $P < 0.001$ , (n=7-8)..

### Kıvrınma Testi (Writhing Test)

Antinosiseptif ve/veya anti-inflamatuar etkilere sahip olabileceği düşünülen maddelerin taranması için en sık kullanılan deneysel ağrı modellerinden birisi de asetik asitle uyarılan kıvrınma testidir. Asetik asit enjeksiyonu peritoneal inflamasyona neden olmaktadır ve bu da farenin karnını yere sürme ve arka ayaklarını germe hareketi ile sonuçlanmaktadır (Mansouri ve ark., 2013). Bu testte elde edilen sonuçlarda ise MSE uygulanan her üç dozda da anlamlı antinosiseptif etki göstermiştir (sırasıyla  $P < 0.01$ ;  $P < 0.001$ ;  $P < 0.01$ ) (Şekil 11). MSE periferik etkisine aracılık eden mekanizmaları incelemek için ekstreinin enjeksiyonundan önce nalokson, ketanserin ve yohimbin uygulaması yapılmıştır. Bu testte ise MSE'nin antinosiseptif etkisinde nalokson ve yohimbin anlamlı geri dönüş sağlamıştır (sırasıyla;  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ).

## Kıvranma Testi



Şekil 11. Kıvranma Testinde MSE'nin Olası Maksimum Analjezik Etkisi. MSE: *Moringa stenopetala* metanol ekstresi, Değerler ortalama±SEM. Kontrol grubuna göre anlamlı fark: \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; 100mg/kg MSE'ne göre anlamlı fark: &&& $P < 0.01$ , (n=7-8)..

## TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında MSE'nin santral analjezik etkisinin değerlendirilebilmesi için supraspinal analjeziyi değerlendirmek için kullanılan sıcak-plaka testi ile spinal düzeyde analjeziyi değerlendirmede kullanılan kuyruk daldırma testi tercih edilmiştir. Periferik nosisepsiyonun test edilmesi için asetik asit ile indüklenen kıvranma testi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar oral uygulanan MSE'nin test edilen dozlarda hem periferik hem de santral antinosiseptif etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Opioderjik sistemin rolünü incelemek amacıyla uygulanan nalokson (non-selektif opioid antagonist) varlığında MSE'nin santral antinosiseptif etkisinde hem sıcak plaka testinde hem de kuyruk daldırma testinde geri dönüş olmamıştır. Oysa aynı testlerde serotonerjik yolağın rolünü incelemek için ketanserin (5-HT<sub>2</sub> reseptör antagonisti) uygulaması sonucunda her iki testte anlamlı (sırasıyla;  $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ) geri dönüş sağlanmıştır. Kullanılan sıcak plaka ve kuyruk daldırma testlerinde noradrenerjik yolağın etkisine bakıldığında ise yohimbinin her iki testte de MSE'nin analjezik etkisini anlamlı olarak azalttığı görülmektedir (sırasıyla;  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ).

Bir uyarın tarafından nosiseptörlerin uyarılması sonucu ağırlı impuls lar omurilikten beyin sapına ve talamusa, oradan da duyu sal kortekse iletilirler. Ağrının iletimi sırasında omurilik arka boynuzunda inisi inhibitör ağırlı yolaqları tarafından inhi be edilir. Mezensefalondaki periaquaduktal gri cevher (PAG) ve periventriküler bölgedeki nöronları uyarmaları sonucu analjezik sistem harekete geçer. Bu inisi ağırlı yolaqlarında yer alan nörotransmitterler: serotonin, noradrenalin, dopamin ve opioid peptidlerdir (Kayaalp, 2009; Ciranna L, 2006; Pickering, 2013 ve Kesim, 2005). İnhibitör inisi serotonerjik ve noradrenerjik yolaqların antinosisepsiyonda önemli rollerinin oldu ğu bilinmektedir. Spinal inisi yolaqlarda yer alan ara nöronlarda bulunan 5-HT<sub>2a</sub> ve 5-HT<sub>2c</sub> reseptörleri ağırlı inhibisyonunda rol almaktadır. Spinal düzeyde noradrenalin (alfa-1 ve alfa-2 reseptör agonisti) injeksiyonu antinosiseptif etki oluşturmaktadır (Doğrul, 2006; Sommer, 2010). MSE'nin spinal ve supraspinal antinosiseptif etkisine her iki yolağında katkı sağladığı belirlenmiştir.

Tez çalışmamızda kullandığımız bir diğ er test olan kıvranma testi, asetik asitle oluşturulan ve kimyasal uyarıya dayalı bir testtir. Çoğunlukla periferik analjeziyi değerlendirmek için kullanılsa da non-spesifik bir yöntem oldu ğu belirtilmektedir (Chang ve ark, 2011). Asetik asit aracılı kıvranma testi analjezik özelliği oldu ğu düşünölen yeni bileşiklerin incelenmesi için iyi ve önerilen bir testtir. *M. stenopetala* ekstresinin analjezik etkisini kıvranma testinde ketanserinin geri döndürmediği belirlenmiştir. Buna göre MSE'nin spinal ve supraspinal seviyedeki etkisine serotonerjik yolaqları aracılık ederken periferde bu yolağın etkisinin olmadığı görölmüştür. Ancak nalokson ve yohimbin varlığında MSE' i uygulandığında sağlanan geri dönüşler anlamlıdır. Bazı çalışmalarda agonist madde uygulanması sonucunda periferde alfa-2 adrenerjik reseptörlerin nosisepsiyon iletiminin baskılanmasında etkili oldukları belirtilmektedir (Pertovaara, 2006). Bunun yanısıra noradrenalinin periferde inflamasyonla ilişkili hücrelerdeki alfa-2 adrenerjik reseptörleri uyarması sonucunda B-endorfin salınımına ve dolayısıyla periferik opioid reseptörlerin uyarılmasına neden oldukları bildirilmektedir (Binder ve ark., 2004). Çalışmamamızda elde edilen kıvranma testi sonuçlarında yohimbin varlığındaki geri dönüşün daha fazla oldu ğu



görülmektedir. MSE'nin periferik antinosiseptif etkisinde alfa-2 adrenerjik reseptörlerin yanı sıra opioderjik sisteminde katkısının olduğu düşünülebilir.

Flavonoidlerin genel olarak antioksidan, antiinflammatuvar ve analjezik etkinlikleri olduğu pekçok çalışmada gösterilmiştir (Nijveldt ve ark., 2001; Azevedo ve ark., 2013; Velázquez-González ve ark., 2014; Wang, 2014). Çalışmamız kapsamında MSE'nin yapılan fitokimyasal analizleri sonucunda içerisinde çoğunlukla kersetin, rutin ve luteolin ve/veya kamferol olduğu belirlenmiştir. Çalışmamız kapsamında MSE'nin yapılan fitokimyasal analizleri sonucunda içerisinde çoğunlukla kersetin, rutin ve luteolin/kamferol olduğu belirlenmiştir. Kersetin ve rutin de analjezik ve antiinflammatuvar etkileri çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Hernandez-Leon, Fernández-Guasti, González-Trujano, 2016; Kaur, (Singh, 2005). Kaur ve arkadaşlarının (2005) yaptığı çalışmada kersetinin doza bağlı antinosiseptif etkisi olduğu ve bu etkide adrenerjik yolağın rol oynadığı gösterilmiştir. *Pitali paniculata* bitkisinden elde edilen rutin ile yapılan bir çalışmada da rutin doza bağlı antinosiseptif etki göstermiştir (Lapa ve ark., 2009). Sıcak plaka ve kuyruk daldırma testlerinde ki sonuçlara göre MSE'nin içerisinde yer alan bu flavonoidlerin analjezik etkisinde yer aldığı düşünülmektedir.

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Yetiştigi ülkelerde çok yaygın hem besin hemde halk ilacı olarak kullanılmakta olan moringa türlerinden *M. stenopetala* bu tez kapsamında analjezik etkisi ve etki mekanizmaları bakımından incelenmiştir. *M. stenopetala* yapraklarından hazırlanan metanol ekstresi ile yapılan çalışmalar sonunda elde edilen veriler bize bu türün hem santral hem de periferik analjezik etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir. Moringa türlerinin yüksek oranda flavonoid içerdiği bilinmektedir. Bizim çalışmamız kapsamında yapılan analizlerde de bu gösterilmiştir. Çoğu tıbbi bitkinin etkinliğinden içerdikleri biyolojik aktif maddelerin sorumlu olduğu bilinmektedir. MSE'nin güçlü analjezik etkinlik göstermesini birkaç aktif maddenin bir arada bulunması sonucu meydana geldiğini düşünmekteyiz.

Ağrının kontrol altına alınması için başta non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar olmak üzere opioid analjezikler ve ayrıca çeşitli antidepresan ve antiepileptik ilaçlar da kullanılabilir. Ancak bu ilaçların oldukça fazla yan etkilerinin (NSAİİ'nin gastrointestinal yan etkileri, opioidlere tolerans gelişimi gibi) olduğu da bilinen bir gerçektir. Flavonoid yapısındaki maddelerinde analjezik etkinliklerinde benzer mekanizmalar üzerine etki ettikleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. *M. stenopetala* bitkisi ile farklı ekstraktların ve onların fraksiyonlara ayrılması ile elde edilecek olan test maddeleriyle ilave çalışmalar yapılması gerekmektedir. Elde edilecek daha detaylı sonuçlarla bu bitkinin daha etkin ve güvenli bir şekilde ağrı tedavisinde ki yerini alacağını düşünmekteyiz. Yapmış olduğumuz bu çalışmanın yeni ilaç geliştirilmesi için öncü bir çalışma olmasını ümit etmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- Abdu, H., Musa, P., Kumar, V., Asfaw, D., Acute Toxicity Studies of Butanol Fraction of Leaves of *Moringa stenopetala* in Rats, *Asian Pac. J. Health Sci.*, 2(2), 160-164 (2015).
- Abuye, C., Omwega, A.M., Imungi, J.K., Familial tendency and dietary association of goitre in Gamo-Gofa, Ethiopia, *East Afr. Med. J.*, 76 (8), 447-451 (1999).
- Agrawal, B., Mehta, A., Antiasthmatic activity of *Moringa oleifera* Lam: A clinical study, *Indian J. Pharmacol.*, 40, 28-31 (2008).
- Akil, H., Owens, C., Gutstein, H., Taylor, L., Curran, E., Watson S. Endogenous opioids: overview and current issues, *Drug Alcohol Depend.*, 51, 127-40 (1998).
- Alviano, D.S.1., Rodrigues, K.F., Leitão, S.G., Rodrigues, M.L., Matheus, M.E., Fernandes, P.D., Antonioli, A.R., Alviano, C.S., Antinociceptive and free radical scavenging activities of *Cocos nucifera* L. (Palmae) husk fiber aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.*, 92, 269-273 (2004).
- Anwar, F., Lati, F.S., Ashraf, M., Gilani, A.H., *Moringa oleifera* a food plant with multiple medicinal uses, *Phytother. Res.*, 21, 17-25 (2007).
- Arora, D., Onsare, J., Kaur, H., Bioprospecting of *Moringa* (Moringaceae): microbiological perspective, *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 1, 193-215 (2013).
- Aydın, O.N., Ağrı ve Ağrı Mekanizmalarına Güncel Bakış, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 3 (2), 37-48 (2002).
- Aydın, S., Beis, R., Can, Ö.D., Analgesic and antispasmodic activities of 2-(2-nitro-phenyl)-1H-benzimidazole 5-carboxylic acid: evidence for the importance of the 2-(o-substitutedphenyl) group, *Pharmazie.*, 58, 405-408 (2003).
- Azevedo, M.I., Pereira, A.F., Nogueira, R.B., Rolim, F.E., Brito, G.A., Wong, D.V., Lima-Júnior, R.C., de Albuquerque Ribeiro, R., Vale, M.L., The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy, *Mol. Pain*, 9, 53 (2013).
- Barrett, B., Boitano, B., *Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi*. Prof. Dr. Hakkı Gökbel (Edt.), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 149-150, 2015.
- Bastos, G.N.T., Santos, A.R.S., Ferreira, V.M.M., Costa, A.M.R., Bispo, C.I., Silveira, A.J.A., Do Nascimento, J.L.M., Antinociceptive effect of aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* on mice, *J. Ethnopharmacol.*, 103, 241-245 (2006).
- Bevan, S.J., Geppetti, P., Protons small stimulants of capsaicin sensitive sensory nerves, *Trends Neurosci.*, 17, 509-512 (1994).
- Besson, J.M., The Neurobiology of Pain, *Lancet*, 353, 1610-1615 (1999).
- Bichi, M.H., A Review of the Applications of *Moringaoleifera* Seeds Extract in Water Treatment, *IJCER*, 3, 1-9 (2013).
- Binder, W., Mousa, S.A., Sitte, N., Kaiser, M., Stein, C., Schafer, M., Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue, *Eur. J. Neurosci.*, 20 (1), 92-100 (2004).

- Calixto, J.B., A.Beirith, J., Ferreira, A.R., Santos, F.V., Cechinel R.A., Naturally occurring antinociceptive substances from plant, *Phytother. Res.*, 14, 401-418 (2000).
- Caterina, M.J., Gold, M.S., Meyer, R.A., *Molecular Biology of Nociceptors in The Neurobiology of Pain*, Oxford University Press, Stephen Hunt and Martin Koltzenburg, 1-33 (2005).
- Chang, H.Y., Sheu, M.J., Yang, C.H., Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammation of hispolon in mice, *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, 478246, 1-8 (2011).
- Charlton, E.J., *Core Curriculum for Professional Education in Pain* (3rd ed), IASP Press ,Seattle, 7-10 (2005).
- Chuang, P.H., Lee, C.W., Chou, C.Y., Murugan, M., Shieh, B.J., Chen, H.M., Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam., *Bioresour.Technol.*, 98, 232-236 (2007).
- Ciranna, L., Serotonin as a Modulator of Glutamate- and GABA-Mediated Neurotransmission: Implications in Physiological Functions and in Pathology, *Curr. Neuropharmacol.*, 4(2), 101-114 (2006).
- Cockayne, D.A., Hamilton, S.G., Zhu, Q.M., Dunn, P.M., Zhong, Y., Novakovic, S., Malmberg, A.B., Cain, G., Berson, A., Kassotakis, L., Hedley, L., Lachnit, WG., Burnstock, G., McMahon, S.B., Ford, A.P.D.W., Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature.*, 407, 1011–1015 (2000).
- Dray, A., Inflammatory mediators of Pain, *Br. J. Anaesth.*, 75(2), 125-131 (1995).
- Dogrul, A., Coskun, I., Uzbay T., The contribution of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in peripheral imidazoline and adrenoceptor agonist-induced nociception, *Anesth. Analg.*, 103, 471-77 (2006).
- Edwards, J.E., Meseguer, F., Faura, C., Moore, R.A., McQuay, H.J., Single dose dipyrone for acute renal colic pain. *Cochrane Database Syst*, CD003867 (2002).
- Edwards, S., Tadesse, M., Demissew, S., Hedberg, J., Flora of Ethiopia and Eritrea: Mangnoliaceae to flacourtiaceae, *J.E. Afr. Nat. Hist. Soc.*, 2,155-163 (2002).
- Fahey, J.W., *Moringa oleifera: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties, Part 1. Trees Life J.*, 1,5 (2005).
- Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B., Corrêa, F.M., Correa, Central and peripheral antialgesic actions of aspirin-like drugs. *Eur. J. Pharmacol.*, 53,39- 48 (1978).
- Ferreira, S. H., Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia, *Nature.*, 200, 240-243 (1972).
- Fozia, F., Meenu, R., Avinash, T., Abdul Arif, K., and Shaila,F., An overview of promising Healer. Medicinal properties of *Moringa oleifera*, *J. Med. Plant. Res.*, 6(27), 4368-4374 (2012).

- Fürst, S., Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull.*, 48, 129-141 (1999).
- Ghebreselassie, D., Mekonnen, Y., Gebru, G., Ergete, W., Huruy, K., The Effects of *moringa stenopetala* on blood parameters and histopathology of liver and kidney in mice, *Ethiop. j. Health dev.*, 25,51-57 (2011).
- Gilani, A.H., Aftab, K., Suria, A., Siddiqui, A., Salem, R., Siddiqui, B.S., Faizi, S., Pharmacological studies on hypotensive and spasmolytic activities of pure compounds from *Moringa oleifera*, *Phytother. Res.*, 8,87-91 (1994).
- Giordano, J., Towards a core philisophy and virtue based ethics of pain medicine, *pain pract.*, 15, 59-66 (2005).
- Guevaraa, A.P., Vargasa, C., Sakuraib, H., Fujiwarab, Y., Hashimotob, K., Maokab, T., Kozukac, M., Itoc, Y., Tokudad, H., Nishinod, H., An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam., *Mutat. Res*, 440, 181- 188 (1999).
- Güzeldemir , M.E., Ağrı değerlendirme yöntemleri. *Sendrom*,7(6), 11-21 (1995).
- Helen, G., W, Shibeshi, W., Tamiru, E., Engdawork, Experimental Evaluation of Analgesic and Anti-inflammatory Activity of 80% Methanolic Leaf Extract of *Moringa stenopetala* Bak. F. in mice, *Ethiop. J. Health Sci.*, 3, 15-26 (2015).
- Halimton, S., Warburton, J., Bhattacharjef, A., Ward, J., McMahan, S., ATP in human skin elicits a dose related pain response which is potentiated under conditions of hyperalgesia, *Brain*, 123, 1238–1246 (2000).
- Hargreaves, K.M., Ronald, D., Mechanisms of pain and analgesia. In *Management of Pain and Anxiety in Dental Practice*, R. Dionne and J. Phero, eds, Elsevier, New York ,10-15 (1991).
- Hernandez-Leon, A., Fernández-Guasti, A., González-Trujano, M.E., Rutin antinociception involves opioidergic mechanism and descending modulation of ventrolateral periaqueductal grey matter in rats, *Eur. J.Pain*, 20(2), 274-83 (2016).
- Holthusen, H., Amdt, J.O., Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection, *Neurosci. Lett.*, 165, 71-74 (1994).
- Hukkeri, V.I., Nagathan, C.V., Karadi, R.V., Patil, B.S., Antipyretic and wound healing activities of *Moringa oleifera* Lam. in rats. *Ind. J. Pharm., Sci.* 68, 124-126 (2006).
- Hunskaar, S., Fasmer, O.B., Hole, K., Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics , *J. Neurosci. methods.*, 14 (1), 69-76 (1985).
- Jessell, T.M., Iversen, L.L., Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus, *Nature.*, 268, 549-51 (1977).
- Julius, D., Basbaum, A., Molecular Mechanisms of Nociception *Nature.*, 413, 203-210 (2001).
- Kayaalp, S.O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji.11.Baskı, Ankara, Feryal Matbaa., 1126-29, 1137-42, 1151-7 (2005).
- Kaur, R., Singh, D., Chopra, K., Participation of alpha2 receptors in the antinociceptive activity of quercetin, *J. Med. Food*, 8 (4), 529-32 (2005).

- Kennedy, C, Leff, P., How should P2X-purinoceptors be characterised pharmacologically? , Trends Pharmacol. Sci., 16, 168 –174 (1995).
- Kesim, M, Duman, E.N, Kadioglu, M., Yaris, E., Kalyoncu, NI., Erciyes, N., The different roles of 5-HT(2) and 5-HT(3) receptors on antinociceptive effect of paroxetine in chemical stimuli in mice, J. Pharmacol. Sci., 97(1), 61-6 (2005).
- Kılıç, F.S., Sirmagül, B., Öner, S., Erol, K., Putative antinociceptive effect of alpha-tocopherol in mice, The Pain Clinic., 18(1), 57-62 (2006).
- Kirtikar, K.R., Basu, B.D., Indian Medicinal Plants. In: Singh B. and M. P. Singh (eds), Dehradun, 676-683 (1975).
- Koster, R., Anderson, M., Beer, E.J., Acetic acid for analgesic screening, Fed. Proc., 18, 412 (1959).
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Robbins Basic Pathology. 8th edition. Edited by Mitchell R.N. Saunders Elsevier publishing, Philadelphia, 505-506 (2007).
- Lapa, F.D.R., Gadotti, V.M., Missau, F.C., Pizzalatti, M.G., Marques, M.C.A., Dafre, A.L., Farina, M., Rodrigues, A.L.S., Santos, A.R.S., Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in Mice, Basic Clin. Pharmacol. Toxicol., 104(4), 306–315 (2009).
- Long, C., Pain management education in long-term care, J. Pain Manag., 10, 1-8 (2011).
- Main, C.J., Spanswick, C.C., Watson, P.J., The nature of disability In: Main CJ, Spanswick CC, editors. Pain management: an interdisciplinary approach.: Churchill Livingstone, Edinburgh, 403-418 (2000).
- Manning, D.C., Raja, S.N., Meyer, R.A., Campbell, J.N., Pain and hyperalgesia after intradermal injection of bradykinin in humans, Clin. Pharmacol., 50(6), 721-9 (1991).
- Mansouri, M.T., Naghizadeh, B., Ghorbanzadeh, B., Ellagic acid enhances morphine analgesia and attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice, Eur. J. Pharmacol., 741, 272-280 (2014).
- Marchand, S., The physiology of pain mechanisms: From the periphery to the brain., Rheum. Dis. Clin. North Am. , 34 (2), 285–309 (2008).
- Mathur, B. S., Moringa Book, Trees for Life International, St. Louis, USA, (2005)
- Mekonnen, Y., Gessesse, A., Documentation on the uses of *Moringa stenopetala* and its possible antileishmanial and antifertility effects, Ethiop. J. Health Sci., 21, 287-295 (1998).
- Mekonnen, Y., Amare, G., Ermias D., Wendimagegn, M., Birgit, D., The multi-purpose Moringa tree, Ethiop. j. health dev., 10,111-118 (1996).
- Millan, M ., Descending control of pain, Prog .Neurobiol., 66, 355–474 (2002).
- Moore, R.A., Wiffen, P.J., Derry, S., McQuay, H.J., Gabapentin for chronic neuropathic pain and fibromyalgia in adults. Cochrane Database Syst, CD007938 (2011).

- Murakami, A., Kitazono, Y., Jiwajinda, S., Koshimizu, K., Oshigashi, H.A. Thiocarbonate from the leaves of *Moringa oleifera* holds a strict structural requirement for inhibition of tumor-promoter-induced Epstein-Barr virus activation, *Planta. Med.*, 64, 319-323 (1998).
- Nandave, M., Ojha, SK., Joshi, S., Kumari, S., Arya, D.S., *Moringa oleifera* leaf extract prevents isoproterenol-induced myocardial damage in rats: evidence for an antioxidant, antiperoxidative, and cardioprotective intervention, *J. Med. Food.*, 12(1), 47-55 (2009).
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A., Flavonoids, a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am. J. Clin Nutr.*, 74 (4), 418–25 (2001).
- Olesen, J., Thomsen, L.L., Iversen, H., Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches, *Trend in Pharmacol Sci.*, 15, 149-153 (1994).
- Pal, S.K., Mukherjee, P.K., Saha, B.P., Studies on the antiulcer activity of *Moringa oleifera* leaf extract on gastric ulcer models in rats, *Phytother. Res.*, 9, 463-465 (1995).
- Palecek, J., Paleckova, V., Willis, W.D., The roles of pathways in the spinal cord lateral and dorsal funiculi in signaling nociceptive somatic and visceral stimuli in rats, *Pain*, 96, 297- 307 (2002).
- Pari, L., Kumar, N.A., Hepatoprotective activity of *Moringa oleifera* on antitubercular drug-induced liver damage in rats, *J. Med. Food*, 5,171-177 (2002).
- Pasero, C., McCaffery, M., *Pain Assessment and Pharmacologic Management*. St Louis, MO, Elsevier Mosby, 3-7 (2011).
- Pertovaara, A., Almedia, A., *Descending Inhibitory System In: Endogenous Pain Modulation, Handbook of Clinical Neurology*, F. Cervero, T.S. Jensen (Eds), Amsterdam, 179-192 (2006).
- Pickering, G., Moustafa, F., Desbrandes, S., Cardot, JM., Roux, D., Dubray,C., Paracetamol and opioid pathways: a pilot randomized clinical trial, *Fundam. Clin.Pharmacol.*, 27 (3), 339-45 (2013).
- Raja, S.N., Meyer, R. A., Campbell, J. N., Peripheral mechanisms of somatic pain, *Anesthesiology*, 68 (4), 571-590 (1988)
- Ramwell, P.W., Shaw, J.E., Spontaneous and evoked release of prostaglandins from cerebral cortex of anaesthetized cats, *Am. J. Physiol.*, 211, 125–134 (1966).
- Randall, L.O., Selitto, J.J., A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 111, 409-419 (1957).
- Rang, H.P., Bevan, S., Dray, A., Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. In: *The textbook of pain* (Wall PD, Melzack R, eds), Churchill Livingstone, London, 57–78 (1994).
- Ross, E.L., The evolving role of antiepileptic drugs in treating neuropathic pain, *Neurol.*, 5, 1-6 (2002).
- Russo, C.M., Brose,W.G., Chronic pain, *Annu. Rev. Med.*, 49,123–133 (1998).

- Saadabi, A.M., Abu Z.A.I., An in vitro antimicrobial activity of *Moringa oleifera* L. seed extracts against different groups of microorganisms, *Asian J. Basic. Appl. Sci.*, 5, 129-134 (2011).
- Saatçioğlu, A.T., Abdominal Cerrahilerde Epidural Uygulanan Bupivakain İle Levobupivakainin Etkilerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Sisli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği, İstanbul, Türkiye (2008).
- Seid, M., Medicinal and dietary role of *Moringa stenopetala* (Bak.f.) Cuf. In South Ethiopia, *Afr. J. Agric. Sci. Techno.*, 1, 1-6 (2013).
- Shibru, S. A., Wonderful but neglected tree species in Ethiopia: Cabbage tree. *Biological Newsletter*, 1 (2), 6-8 (2002).
- Siddhuraju, P., Becker, K., Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2144-2155 (2003).
- Simon, E., Opioid receptors and endogenous opioid peptides. *Med. Res. Rev.*, 11, 357-374 (1991).
- Simon, D.A., Alrejo, M., LaMotte, R.H., Psychophysical studies of the itch sensation and itchy skin (Allokenis) produced by intracutaneous injection of Histamine, *somatosens. Mot. Res.*, 8, 271-279 (1991).
- Sommer, C., Cytokines and pain. In: Cervero F, Jensen TS, editors. *Handbook of clinical neurology*, Elsevier, New York, 231-248 (2006).
- Sommer, C., Serotonin in pain and pain Control, *Handbook of Behavioral Neurobiology of Serotonin*, Elsevier, USA, 457-466 (2010).
- Stein, C., Clark, J.D., Oh, U., Vasko, M.R., Wilcox, G.L., Overland, A.C., Vanderah, T.W., Spencer, R.H., Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain Res. Rev.*, 60, 90-113 (2009).
- Steinmüller, N., Sonder, K., Kroschel, J., Fodder trees research with *Moringa stenopetala*: a daily leafy vegetable of Konso people, Ethiopia. *Challenges to Organic Farming and Sustainable Land Use in the Tropics and Sub-Tropics*, *Deutscher Tropentag.*, 9-11 (2002).
- Stohs, S.J., Hartman, M.J., Review of the safety and efficiency of *Moringa oleifera*. *Phytother. Res.*, 29 (6), 796- 804 (2015).
- Tracey, D.J., Walker, J.S., Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved?, *Inflamm. Res.*, 44, 407-1 (1995).
- Tilley, S.L., Coffman, T.M., Koller, B.H., Modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes, *J. Clin. Invest.*, 108, 15-23 (2001).
- Jessell, T. M., Tsunoo, A., Kanazawa, I., Otsuka, M., Substance P. depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neuron, *Brain Res.*, 168, 247-259 (1979).



Urch, C.E., Suzuki, R., Pathophysiology of somatic, visceral, and neuropathic cancer pain. Sykes N, Bennett MI, Yuan CS; Cancer Pain: Clinical Pain Management. 2nd Edition Hodder Arnold. London, 3–12 (2008).

Vane, J., Introduction: mechanism of action of NSAIDs, Br. J. Rheumatol., 35, 1 (1996).

Vane, J., Botting, R., Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. FASEB. J., 1, 89-96 (1987).

Velázquez-González, C., Cariño-Cortés, R., Gayosso de Lucio, J.A., Ortiz M.I, De la, O., Arciniega, M., Altamirano-Báez, D.A., Ángeles, L.J., Bautista-Ávila, M., Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Geranium bellum* and its isolated compounds, BMC Complement, Altern. Med., 14, 506 (2014).

Vinay, K., Abul, K.A., Jon, C.A., Robbins Basic Pathology, Kumar V. Saunders (Elsevier), Chicago, 8, 48 (2007).

Vranken, J.H., Dijkgraaf, M.G., Kruis, M.R., van der Vegt, M.H., Hollmann M.W, Heesen, M., Pregabalin in patients with central neuropathic pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a flexible-dose regimen. Pain, 136(1-2), 150-7 (2008).

Wang, Y., Chen, P., Tang, C., Wang Li, Y., Zhang, H., Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius*, J. Ethnopharmacol., 151 (2), 944- 50 (2014).

Wuhrman, E., Cooney, M.E, Dunwoody, C.J., Ekstroweicz, N., Merkel, S., Authorized and unauthorized, dosing of analgesic infusion pumps: Position statement with clinical practice recommendation, J. Pain Manag., 8(1), 4-11 (2007).

Yaksh, T.L., Analgesic actions of intrathecal opiates in cat and primate. Brain Res., 153 (1), 205–210 (1978).

Zhao, Z., Chen, S.R., Eisenach, J.C., Busija, D.W., Pan, H.L., Spinal cyclooxygenase-2 is involved in development of allodynia after nerve injury in rats, Neuroscience., 97, 743–748 (2000).

Zubrzycka, M., Janecka, A., Substance P: transmitter of nociception (Minireview), Endocr. Regul., 34(4), 195-201 (2000).

http-1 İltihabin kimyasal mediatrleri <http://www.slideshare.net/mbolmez/>

2iltihabin-kimyasal-mediatrleri [www.tipfakultesi.org](http://www.tipfakultesi.org) (8.04.2016)

http-2 Cascade of arachidonic acid [http://www.studyblue.com/notes/note/n/](http://www.studyblue.com/notes/note/n/chemical-mediators-and-chronic-inflammation-9-15-11/deck/1200552)

chemical-mediators-and-chronic-inflammation-9-15-11/deck/1200552

(20.03.2016)



T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU ( HADYEK)

**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI**

**TOPLANTI TARİHİ** : 19. 08. 2015  
**TOPLANTI SAYISI** : 87  
**DOSYA KAYIT NUMARASI** : 470-1  
**KARAR NUMARASI** : 470-1  
**ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ** : Doç. Dr. Rana ARSLAN  
**YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR** : Muna JEMAL HUSSEIEN  
Yrd. Doç. Dr. Nurcan BEKTAŞ TÜRKMEN  
**HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI** : Swiss albino (72 adet her iki cins)

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Doç. Dr. Rana ARSLAN'ın araştırma yürütücüsü olduğu 470-1/2015 kayıt numaralı ve "Moringa stenopetala Metanol Ekstresinin Antinositif Etkileri" konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Kevser EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ (Üye)

Prof. Dr. Emel ULUPINAR. (Üye)

Doç. Dr. Engin YILDIRIM (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Nurdan KIRIMLIOĞLU (Üye)

Vet. Hek. Yrd. Doç. Dr. Oya ERALP İNAN (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)



T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU ( HADYEK)

**GEREKÇE**

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Doç. Dr. Rana ARSLAN**'nın araştırma yürütücüsü olduğu 470-1/2015 kayıt numaralı ve "**Moringa stenopetala Metanol Ekstresinin Antinosiseptif Etkileri**" konulu çalışma; tarafımızdan değerlendirilmiştir.

Çalışmada Swiss albino (72 adet her iki cins) kullanılacaktır.

**Deney grupları ve tedavi**

Hazırlanmış olduğumuz Moringa stenopetala Metanol Ekstresi (MSExt) oluşturulacak olan gruplara 0.1 ml uygulanacaktır. Madde uygulamaları tüm deney gruplarında intraperitoneal/oral yoldan verilecektir. Analjezi deneyleri için oluşturulan gruplara sırasıyla 50, 100 ve 200 mg/kg dozlar uygulanacaktır. Öncelikle MSExt seçilen dozlar analjezik etkisi açısından değerlendirilecek ve etkili bulunan dozların etki mekanizmaları araştırılacaktır. Kontrol grubuna 0.1 ml çözücü (SF, %20 DMSO yada %5 Twenn80 vb.) uygulanacaktır. Santral analjezik aktivite mekanizmalarının değerlendirilmesi için nalokson (1 mg/kg; i.p.), ketanserin (0.5 mg/kg; i.p.) ve yohimbine (1 mg/kg; i.p.) madde enjeksiyonundan 15 dk. önce uygulanacaktır (Arslan and Bektas, Am. J. Pharm Health Res 2015;3(6)). Deneylerin sonunda farelere yüksek doz anestezi uygulanarak itlaf edileceklerdir.

**Analjezik Aktivite Deneyleri**

**Hot-plate testi**

Bu test kapsamında kullanılan ve etrafı pleksiglas bir silindir ile sınırlandırılmış olan Ugo Basile (No: 7280) ısı tablası, 56 °C' ye kadar ısıtılacaktır. Hayvanın sıcak zemine bırakıldığı andan, arka ayaklarını çekme, yalama, bacakları üzerinde yükselme veya sıçrama hareketlerinden birinin gözlemlendiği ana kadar geçen zaman ölçülecektir (Eddy ve Leimback, 1953). Hayvanların ayaklarının sıcaktan zarar görmesini engellemek için deneyin bitirilme süresi 20 sn olarak belirlenmiştir.

**Tail-immersion testi**

Hayvanın kuyruğunun ucundan itibaren 3 cm'lik kısmı bir beher içerisinde bulunan 52,5±0,2°C sıcaklığındaki suya daldırılacaktır. Kronometre ile yapılan ölçümler hayvanın kuyruğunun suyun içine daldırıldığı andan, suyun dışına doğru hızlıca çekmesine kadar geçen süreyi kapsamaktadır (Schmauss ve Yaksh, 1984). Hayvanların kuyruklarının sıcaktan zarar görmesini engellemek için deneyin bitirilme süresi 15 sn olarak belirlenmiştir.

**Asetik asit kıvrınma testi**

Hayvanlarda, asetik asitin i.p olarak uygulanmasından sonra karın kaslarında kasılma ile başlayıp daha sonra arka ayakların geriye doğru gerilmesi ve karının yere sürtünmesi ile karakterize bir kıvrınma durumu meydana gelmektedir (Koster ve ark., 1959). Maddenin enjeksiyonundan 45-60 dk sonra, %0,6'lık asetik asit solüsyonu hayvanlara i.p yolla verilecektir. 5 dk' lık bekleme süresinin sonunda, her hayvanda bahsedilen kıvrınma hareketleri 10 dk boyunca gözlenecektir.

Kullanılan yöntemler uluslararası standardı olan yöntemlerdir. Gerekli literatürler verilmiştir. Çalışmanın yapılmasında, Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.