

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**PIRİDOKSİNİN ANTİNOSESİPTİF ETKİSİNDE
NİTRİK OKSİDİN ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Esen Akbulut

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Nurettin Abacıoğlu

ANKARA-1996

Tez çalışmam sırasında bilgisini, tecrübesini esirgemeyen tez hocam Prof. Dr. Sayın Nurettin ABACIOĞLU'na, sağladığı imkanlardan dolayı Prof. Dr. Sayın İlker KANZIK' a, desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Sayın İclal Çakıcı'ya, teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasındaki değerli katkılarından dolayı Uzm. Ecz. Bahar Tunçtan'a ve bölümdeki diğer tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	2
II.1. AĞRI	2
II.1.1. Giriş.....	2
II.1.2. AĞRININ PERİFERİK VE SANTRAL MEKANİZMALARI	4
II.1.2.1. Periferik Ağrı	4
II.1.2.1.1. Ağrı Reseptörleri	4
II.1.2.1.2. Ağrı Sinir Lifleri	5
*Arka Boynuz	6
II.1.2.2. Santral Ağrı	9
*Çıkan Ağrı Yolları	12
*Talamik Çekirdekler	13
*Ağrının İnen Yolları	13
II.1.3. Ağrı Mediyatörleri	14
II.1.4. Deneysel Hayvanlarında Ağrı Oluşturma Metodları	16
II.2. NOSİSEPTİF PROSESLERDE NİTRİK OKSİT'İN ROLÜ	19
II.2.1. Nitrik Oksit	19
II.2.2. NO Sentezi	21

II.2.3. Omurilikte NO ve Nosiseptif Prosesler	23
II.2.4. İnflamatuvar Ağrının Periferik Kontrolünde Nitrik Oksit	27
II.3. NOSİSEPTİF PROSESLERDE VİTAMİN B ₆ GRUBU.....	30
II.3.1. Kimyası	30
II.3.1.1. Genel İzolasyonu	31
II.3.1.2. Yapısal Formüller.....	32
II.3.1.3. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	32
*Kimyasal Özellikler.....	32
*Fiziksel Özellikler.....	33
II.3.2. Genel Bilgiler.....	34
II.3.3. Biyokimyasal Sistemler ve Fizyolojisi.....	39
*Transaminazlar.....	40
*Aminoasit Dekarboksilazlar.....	41
*Triptofan Metabolizması.....	43
*Tirozin ve Fenilalanin Metabolizması.....	44
* γ -Hidroksiglutamat Serin ve Glisin.....	44
*Fosforilazlar.....	45
*Dehidrazlar.....	46
*Rasemazlar	46
*Eritrosit Formasyonu	47

*Hormon İlişkileri.....	47
*Lipid Metabolizması	48
*Aminoasit Absorbsiyonu ve Transportu	49
*Diş Çürümeleri	49
*Oksalüri	49
II.3.4. Farmakoloji ve Toksikolojisi	49
II.3.4.1. Genel	49
III. MATERYAL VE YÖNTEM	54
III.1. MATERYAL	54
Kullanılan Deney Hayvanları	54
Kullanılan Kimyasal Maddeler	54
III.2. YÖNTEM	54
Kıvrınma Aljezi Modeli	54
Tek Doz Uygulamalar	55
Kombinasyon Uygulamaları	55
İstatistiksel Analiz	56
IV. BULGULAR	59
IV.1. Uygulanan Maddelerin Doz-Cevap Eğri Analizleri	59
IV.1.1. Piridoksin	59
IV.1.2. L-Arjinin	60

IV.1.3. L-NG-Nitro Arjinin Metil Esteri (L-NAME)	61
IV.1.4. Metilen Mavisi (MM)	61
IV.II.Kombinasyon Grupları Arası % Antinosiseptif Aktivite	
Bakımından Etkileşmeler	62
IV.2.1. L-Arjinin Kombinasyonu ile Yapılan Karşılaştırmalar....	63
IV.2.2. L-NAME Kombinasyonu ile Yapılan Karşılaştırmalar...	64
IV.2.3. Metilen Mavisi (MM) Kombinasyonu ile Yapılan	
Çalışmalar	64
V. TARTIŞMA	78
V.1. Piridoksin'in Antinosisepsiyonu	78
V.2. L-Arjinin Antinosisepsiyonu ve Piridoksinle Etkileşme	80
V.3. L-NAME Antinosisepsiyonu ve Piridoksinle Etkileşme	86
V.4. Metilen Mavisi Antinosisepsiyonu ve Nosisepsiyonu	
ile Piridoksin Etkileşmeleri	89
ÖZET	92
SUMMARY	93
KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	106

I. GİRİŞ VE AMAÇ:

Gaz halinde küçük reaktif bir molekül olan NO, organizmada hücrelerin çeşitli fonksiyonlarına iştirak etmektedir. Nitrik oksit'in (NO) santral ve periferik sinir sistemindeki sinaptik iletimde rol oynadığına dair yeterince kanıt bulunmamaktadır.

Kan damarlarının gerimini mediyeye ediş, trombosit agregasyonunda inhibisyon yapması, makrofajlarda tümorisidal ajan olarak etki etmesi, hem santral hem de periferik nörotransmitter etkinliğe sahip olması ve glutamat toksisitesini modüle etmesi gibi etkilerinin yanısıra prekürsör, donör veya antagonistlerinin deney hayvanlarındaki nosiseptif proseslerde oluşturdukları değişikliklerin belirlenmesiyle periferik ve santral kaynaklı ağrı mekanizmalarındaki rolleri araştırmacıların dikkatini çekmiştir.

Piridoksin, B₆ vitamini olup, bilinen etkilerinin yanısıra deneysel olarak analjezik etkileri gösterilmiş ve klinik olarak da kullanımı olan bir maddedir.

Bu çalışmanın amacı, farelerde p-BK ile oluşturulan kıvranma aljezi modelinde Piridoksin'in oluşturduğu antinosisepsiyona L-arjinin: NO-sGMP yolağının katkısını incelemektir.

II.GENEL BİLGİLER

II.1. AĞRI

II.1.1. Giriş

Etimolojik olarak ağrı sözcüğü 'ceza, ceza vermek' anlamına gelen 'poine, poene' kelimelerinden türetilmiştir⁷³. Nedeni de, ağrının eski çağlarda kızdırılmış tanrılar tarafından verilmiş bir ceza olarak yorumlanmasıdır. Bugün 'Uluslararası Ağrı Çalışmaları Derneği'nin ilgili komitesince yapılan ağrı tanımlaması genel kabul görmektedir⁵¹. Buna göre ağrı, insanlarda gerçek veya olası bir doku zedelenmesi eşliğinde hoşla gitmeyen duyumsal veya duygusal bir olgu olarak tanımlanmaktadır.

Ağrı doku zedelenmesine yanıt olarak beliren, uyanıklığa ve stimulan kaçıma yönelen, hoş olmayan bir duygudur. Ağrılı uyarılarla ilgili bilgiyi periferden beyne ileten yolak 20. yüzyıldan itibaren anlaşılmaya başlanmıştır⁴⁴.

Ağrı basit bir fiziksel duyumsama değildir. Ağrı hissine, hastaların uyarılara karşı duyusal reaksiyonları ve ruhsal durumları eşlik etmektedir. Ağrıyı tiplendirme ve sınıflandırma çalışmaları çeşitli sonuçlar vermiştir. Ağrı subjektif bir duyu olarak en az beş kategoride sınıflandırılabilir. Buna göre ağrılar niteliklerine, kaynaklarına, sürelerine, şiddetlerine ve nedenlerine göre sınıflandırılabilir. Niteliklerine göre ağrılar, batıcı (miyelinli delta A tipi sinir lifleri aracılığıyla), yanıcı ve sancılı (miyelinsiz C tipi sinir lifleri aracılığıyla) olmak üzere üçe ayrılırlar. Kaynaklarına göre ağrılar somatik, viseral, yansıyan ve psikojenik - fonksiyonel olarak sınıflandırılırlar. Gerek kaynaklarına, gerekse

kaynaktaki nedenlerine bağlı olarak ortaya çıkan ağrı tipleri, tedavi açısından farklı klinik yaklaşımlara gereksinim gösterirler. Ağrıların diğer sınıflama yöntemleri arasında yaygın olarak başvurulan kriterler, onların süre ve şiddetine göre yapılmaktadır. Sürelerine göre ağrılar, akut ve kronik olarak şiddetlerine göre ise kolik, künt ve kemirici tiplerleriyle değerlendirilirler.

Akut ağrının genellikle nedenleri açıklanabilir ve bir koruma fonksiyonu olarak eksternal uyarılara karşı veya internal malfonksiyonun habercisi olarak ortaya çıktıkları klinik olarak bilinmektedir. Akut ağrıda, semptomların çeşitliliğine bağlı olarak otonom sinir sistemi hiperaktivitesi bulunur ve hastalar tarafından da yorumlanabilecek iyi bir başlangıç zamanı vardır. Kronik ağrı ise, dayanıklı ve altı aydan daha uzun süreli bir ağrı kalıbı olarak algılanmaktadır. Otonom sinir sisteminin ağrı kalıbıyla uyum sağlaması ağrıya ilişkin objektif fiziksel sinyallerin ortadan kalkmasına neden olabilir. Kronik ağrısı olan hastalar, bu koşullarda hastalıklarını yorumlayamayabilirler. Ancak sonuçta hastalarda efektif ve davranışsal değişikliklerle beraber gelişen bir depresyon durumu ortaya çıkabilir. Organizmanın hasarı bildirme yolu olan ağrı duygusu, irritasyon bölgesinde önce periferik olarak başlayan ve takiben santral çözümlemeyle sonuçlanan bir dizi zincirleme fizyolojik ve psikolojik reaksiyonu içerir. Bu bakımdan ağrının periferik ve santral komponentlerini bilmek gerekmektedir.

II.1.2.AĞRININ PERİFERİK VE SANTRAL MEKANİZMALARI

II.1.2.1. Periferik Ağrı

Nosisepsiyonun periferik nöronal mekanizmalarında rol oynayan başlıca komponentler ağrı reseptörleri ve ağrı sinir lifleridir.

II.1.2.1.1. Ağrı reseptörleri

Ağrı reseptörleri nosiseptif somatik duyuların iletilmesi sonucunda uyarıyı algılayan ve ağrı sinir liflerinin serbest uçlarında bulunan yapılardır.

Deri ve diğer dokulardaki ağrı reseptörleri çıplak sinir uçlarının oluşturduğu nosiseptörlerdir. Bu reseptörler derinin yüzeysel tabakalarında ve periost, arter duvarı, falks ve tentoryum gibi dokularda yaygın olarak bulunmaktadır. Derin dokularda ise ağrı reseptörlerinin sayısı daha azdır⁶⁴.

Nosiseptörler zararlı ya da yararlı olabilecek mekanik, kimyasal ve termik uyarılara cevap veren, ağrılı uyarılar için özelleşmiş reseptörlerdir. Bu uyarıların ağrısız düzeydekilere cevap veren deri reseptörleri, uyarı ne kadar şiddetli olursa olsun ağrı duyumu oluşturmaz.

Nosiseptörler için yeterli uyarının eşik düzeyi bilinmemesine karşın ağrılı uyarı ile travmatize edilen hücrelerden ağrı mediyatörü olarak adlandırılan histamin, serotonin, kinin peptidler, prostaglandinler gibi endojen humoral maddelerin salıverildiği ve böylece nosiseptör aktivasyonu olduğu gösterilmiştir.

II.1.2.1.2. Ağrı sinir lifleri

Dış uyaran, reseptör membranında depolarizasyona yol açar ve bu sinir impulsuna dönüşür. Bu süreç, transdüksiyon olarak adlandırılır. Sinir impulsu periferik sinir aksonları ile iletilir. Periferik sinir aksonları, cevaplarına, miyelin kapsamlarına ve iletim hızlarına göre 3 sınıfa ayrılır.

1. A-β lifleri: 6-22 μm çaplı kalın miyelinlerdir ve hızla iletilirler (33-75 m/saniye). Düşük şiddetli mekanik stimulus ile uyarılırlar. Uyaran şiddeti arttığında deşarj frekansları artmaz. Bilinci açık bireylerde A-β afferentlerinin elektrikle uyarımı ağrıya yol açmaz.

2. A-delta lifleri: 2-5 μm çaplı ve ince miyelinlidirler. İletim hızları yavaştır ve 5-30 m/saniyedir.

3. C lifleri: Çapları 0.3-3 μm dir ve ince miyelinlidirler. İletim hızları ise 5-30 m/saniyedir.

Ağrıyı ileten aksonların çoğu miyelinsiz C lifleri ile A-delta liflerinden oluşur. A-beta liflerinin oranı daha düşüktür^{64,8,1}.

Somatik duyular özel duyulardan farklı olarak, vücuttan duyuşsal enformasyonu toplayan sinirsel mekanizmalardır. Mekanoreseptif, termoreseptif ve nosiseptif olmak üzere başlıca üç somatik duyu tipi bulunmaktadır. Deri, subkütan doku ve fasiyadaki nosiseptörler yoğun mekanik uyarana yanıt veren mekanoreseptörler, şiddetli ısı ve mekanik uyarıya yanıt veren mekanotermal

nosiseptörler ise mekanik, termal ve kimyasal uyarıya yanıt veren polimodal nosiseptörlerdir^{64,8,1}.

Mekanik nosiseptörler, A-delta yüksek eşikli mekanoreseptörlerdir. Şiddetli mekanik stimulus ile uyarılırlar. Ancak ısı veya ağrı oluşturan kimyasal uyarılara yanıt vermezler. Yüksek eşikli mekanoreseptörlerin alıcı alanları 1 mm²'den küçük 3-20 noktadan oluşur. Bu reseptif alanlar gövdede 1-8cm², yüzde 1-2 mm² yüzeylere dağılmışlardır. Normal ısı ile uyarılmamalarına karşın yineleyen şiddetli ısı uyarımıyla sensitize olurlar.

Polimodal nosiseptif afferentler, 1 g'dan fazla basınç, 45-53°C ısı ve kimyasal maddelerle uyarılabilmektedir. 1-17 mm²'lik 1-2 noktadan oluşan reseptif alanları vardır. Isı ve kimyasal uyarımın şiddeti arttıkça boşalım frekansları artar.

Miyelinli mekanotermal nosiseptörler A-delta liflerinin çıplak uçlarıdır. Reseptif alanları 5 mm²'den küçüktür. Bazıları soğuk ile uyarılabilmektedir^{64,8,1}.

***Arka Boynuz**

Primer afferent nosiseptörler omuriliğe arka kök ile girerler. Lissauer traktusunda yol alırlar ve birkaç spinal segmentte omurilik gri maddesine girerler.

Omurilik gri maddesi sitolojik olarak bir seri laminaya ayrılır. Nosisepsiyonda lamina I, II ve V önemlidir. Lamina I A-delta primer afferent nosiseptörlerin sonlandığı bölgedir. Bu laminadaki hücrelerin çoğu nosiseptif spesifiktir ve noxious rangedeki uyarılara yanıt verirler. Lamina I'e nonnosiseptif

primer afferentlerden de input gelir. Nosiseptif spesifik ve wide dynamic range hücrelerinin büyük bir kısmı kontrlateral orta beyin ve talamusa projekte olurlar.

Lamina II, (Substansiya gelatinosa) primer afferent nosiseptörlerin miyelinsiz C liflerinin sonlandığı bölgedir. Az sayıda A-delta lifi de almaktadır. Lamina II nöronlarının bir kısmı supraspinal bölgelere projekte olurlar.

Lamina V bazı A-delta liflerinden direkt input alır. Burada wide dynamic range (WDR) nöronlar hakimdir. Lamina I ve II'ye uzanan dendritleri vardır. C ve A-delta primer afferent nosiseptörlerden direkt lamina I ve II'den ise indirekt girdi alır^{1,46}.

Vücudun somatik segmentlerinden gelen duyuşsal enformasyon, omurilik arka köklerinden girer, arka kordon sistemi ve spinotalamik sistem halinde ve bu sistemler içindeki üç ayrı demet halinde kortekse doğru uzanır. Arka kordon sisteminde somatik iletiyi, ventral spinotalamik demetler yapar. Bunlar kalın duyuşsal beta A tipi teller olup omurilik arka kökünden girerler. Arka kordona geçerek omurilik boyunca talamusa kadar uzanırlar ve mekanoreseptif somatik duylardan olan dokunma, basınç, vibrasyon gibi taktil duyların taşınmasına aracılık ederler.

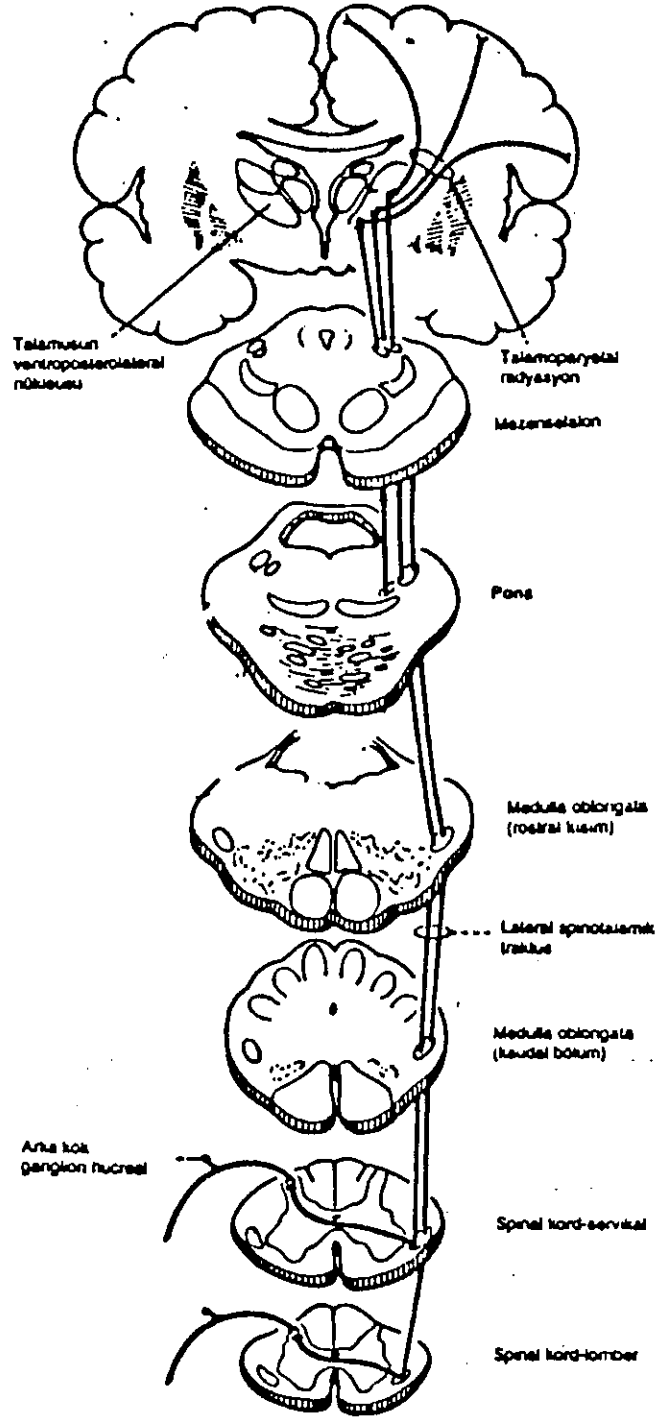
Spinotalamik sistem, somatik duyu iletimiyle ilgili diğer sistemdir. C tipi miyelinsiz ve delta A tipi miyelinli ince duyu telleri ve kolateralleri bu sistemin her iki demetini oluşturmaktadır. Bu sinir telleri, omurilik arka boynuzundan geçerler. Kolateral tarafa çaprazlanarak ön ve yan kordon olarak, omurilik boyunca talamus ve kortekse ulaşırlar. Sistem içerisinde bulunan birinci

demete neospinotalamik yolak (lateral) denir. Nosisepsiyonun direkt yoludur.

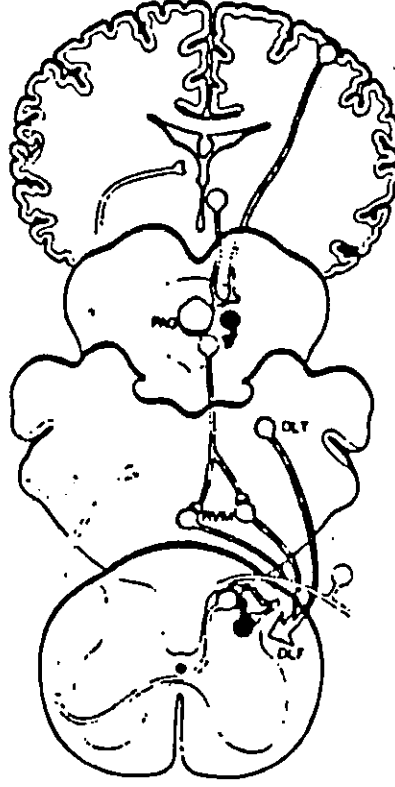
Spinoretiküloensefalik polisaptik yolak sistemin indirekt nosisepsiyon yoludur. Ağrılı uyarım C telleri aracılığıyla iletilir. Bu yolak bulbus ve mezensefalonda retiküler formasyonunda sonlanır. Spinotalamik sistem ağrının yanısıra gıdıklanma ve kaşınma gibi ağrı türevi duymalar ile sıcak ve soğuk ısı duymaları, vücut yüzeyinde çok az lokalize edilen ve şiddet farklarını çok az ayırabilen kaba dokunma basınç duymaları ve cinsel duymaların taşınmasını sağlar. Yukarıda da belirtildiği üzere vücut yüzeyine kuvvetli ağrılı uyarım uygulandığı zaman başlıca iki tip ağrı duyması oluşur. Bunlar delta A tipi liflerdeki nosiseptörlerin aktivasyonu sonucu oluşan hızlı, iyi lokalize edilen batıcı ağrı (Tip 1) duyması ve C liflerindeki nosiseptörlerin aktivasyonu sonucu oluşan yeri belirsiz, künt, yanma duymasıyla beraber giden yavaş, gecikmiş ağrı (Tip 2) duymasıdır. Hızlı batıcı ağrı ile (Tip 1) yavaş gecikmiş ağrı (Tip 2) duymaları beyindeki bilinç merkezlerine farklı yollarla ulaşır ve ayrışmaları da buna göre sözkonusu olur. Yukarıdaki bölümde anlatılan neospinotalamik yol hızlı ağrı lifleriyle taşınan aksiyon potansiyelleri beyine iletmektedir. Bu sinir liflerinin küçük reseptif alanları bulunur ve liflerin fonksiyonu da hızlı ağrı oluşturan yerin kodlanması olarak özetlenebilir. Yavaş ağrı lifleri ise spinoretiküloensefalik polisaptik yolla taşınmaktadır. Bu sistemin kolateralleri ağrı duymasına eşlik eden emosyonel algıları oluşturmak üzere retiküler formasyondan geçer ve bu yol yavaş ağrıyla beraber giden şiddetli hoşnutsuzluktan sorumludur.

II.1.2.2. Santral ağrı

Ağrı duyumsamasındaki santral mekanizmalar periferik ağrı kadar iyi bilinmemektedir. Genellikle ağrı duyumsamasının omuriliğin anterolateral bölümünde santral sinir sistemine taşındığı düşünülmele beraber bu bölümün denerve edilmesi kronik ağrıyı kaldırmada pek başarılı olamamaktadır. Bu girişimle ağrının kaldırılamaması anterolateral traktuslar dışında paralel ağrı yolları varlığına bağlı gibi görünmektedir. Diğer bir olasılık olarak da, kronik ağrı, santral sinir sistemindeki ağrı merkezlerinin spontan aktivitesinden kaynaklanabilir. Bu spontan aktivite, sürekli ağrı girişi yüzünden oluşan yansıyan devreleri ve ağrı girişi dursa da deşarjin durdurulamadığını düşündürmektedir. Diğer yandan spontan aktivite denervasyon, aşırı duyarlılığın sonucunda da oluşabilmektedir. Bu durum bir nöronun normal sinaptik girişi kaldırıldığında dolaşımdaki nörotransmitterlere karşı duyarlılığının artması olarak tanımlanmaktadır. Kronik ağrı tedavisi beyindeki ağrı bölgesinin cerrahi olarak kaldırılması ya da ağrı yollarının aktivitesini ağrı bölgelerine projekte eden inhibitör yolların aktive edilmesiyle azaltma esasına dayanır. Periferik olarak ortaya çıkan ve algılanan ağrının omurilik anterolateral bölümü içerisinde santrale taşınması ve diskriminasyonu ağrı iletiminde esas olan başlıca iki yol aracılığıyla gerçekleştirilir. Bunlar asendan (çıkan) ve desandan (inen) ağrı yollarıdır. Şekil 1 ve 2 bu yolları tanımlamaktadır.



Şekil 1. Lateral spinothalamik traktus. Ağrının çıkan yolları



Şekil 2. Ağrının inen yolu: Frontal korteks ve hipotalamustan orta beyinde perakvaduktal gri maddeye (PAG), PAG'dan rostral ventral medullaya (RVM) ve RVM'den dorsalateral pontin tegmentuma (DLT) ve dorsalateral funikulus (DLF) yoluyla omurilik arka boynuzuna ulaşır.

* Çıkan Ağrı Yolları

Nosiseptif bilgiyi beyin sapı ve talamusa aktaran arka boynuz nöronlarının aksonları spinal gri maddede orta hatta çaprazlaşırlar ve anterolateral ak maddede yukarı doğru yol alan spinotalamik traktusa katılarak aşağıdan gelen lifleri lateralle iterler.

Lamina I hücrelerinden yükselen aksonların %80i spinotalamik traktusa katılmadan spinal kordun dorsolateral bölümünde yer alır. Bu aksonların çoğu beyin sapı düzeyinde sonlanırlar ve bilinçli ağrı algılamasında görevli değildirler. Ağrıyı azaltmak için yapılan geleneksel kordotomide bu aksonlar korunur. 6-18 ay ağrının geri dönüşü dorsolateral yolun işlevi olabilir.

Anterolateral nosiseptif yol iki sisteme ayrılabilir. Direkt spinotalamik sistem ağrıyla ilgili ayırıcı duyuyu talamik düzeye iletir. Spinoretikülotalamik sistem ise beyin sapında sonlanır. Medullanın retiküler formasyonunda nükleus gigantosellülerise ulaşırlar. Dorsolateral arta beyinde periakvaduktal gri madde nükleus küneiformis ve parabrakiyal bölgede sonlanırlar.

Retiküler formasyondaki somatosensöriyel sonlanmalar topografik dağılım göstermezler ve duyu ayırımını ve lokalizasyonunu sağlamazlar. Uyanıklığın sürdürülmesinde veya otonomik yanıtların yönlendirilmesinde rol oynadıkları düşünülmektedir^{1,46}.

*** Talamik Çekirdekler**

Spinotalamik traktus talamusun kaudal ucunda medial ve lateral demetlere ayrılır. Topografik olarak lateral demet posterior grupta ventroposterolateral (VPL) çekirdekte sonlanır. VPL çekirdeğin lezyonlarında analjezi elektrikle uyarımında ise ağrı ortaya çıkar. VPL nükleus arka boynuzun I ve V'inci laminalarından input almakta ve nosiseptif spesifik ve WDR nöronları içermektedir. Bu nöronların aksonları somatosensöriyel kortekse projekte olurlar.

Spinotalamik traktusun medial demeti talamusun intralaminar çekirdeklerinden santral lateral ve busmedius nükleuslarına projekte olurlar. Submedius spinal kordun lamina I nosiseptif nöronlarından girdi alır ve orbitofrontal kortekse projekte olur. Santral lateral çekirdeğe inputlar spinal derin laminalardan gelir. Bu nöronların geniş karmaşık reseptif alanları vardır ve vücudun iki tarafından gelen uyarılarla eksite olurlar. Santral lateral nükleus ayrıca medüller retiküler formasyondan da afferentler alır. Santral lateral nükleus korteksin çeşitli bölgelerine lifler yollar.

*** Ağrının İnen Yolları**

Arka boynuzdaki hücreler beyinden gelen inhibitör etki altındadır. Orta beyinde periakvaduktal gri maddenin uyarımı analjeziye yol açmaktadır. Bu analjezi serotonin ve dopamin konsantrasyonuna bağlıdır ve monoaminlerin azalmasıyla analjezi ortadan kalkmaktadır. Noradrenalin artışı ise analjezik etkiyi önlemektedir. Periakvaduktal gri madde hücreleri rostral ventral medullanın çekirdeklerinde ilk sinapslarını yaparlar. Daha sonra omuriliğin dorsal boynuzuna özellikle de V'inci laminaya ulaşırlar. Bu bölgelerin üçünde de yüksek yoğunlukta

endojen opiyat peptidler ve opiyat reseptörleri bulunmaktadır. İnen rafe spinal nöronların çoğu serotonin içerir. Sığanlarda rafe magnus nöronlarının servikal omurilikde sonlanan bölümünün %80-90ını lumbosakral korda projekte olanların ise %50-80ini serotonin içermektedir. Bu hücrelerin aksonları dorsolateral fasikülüs ile aşağı inerler ve arka boynuzun I II ve Vinci laminalarında sonlanırlar. Rafe spinal yol serotoninergik etkiyle ağrıyı inhibe etmektedir.

Ağrı modülasyonunda rol oynayan bir diğer desandan yol ponsta lokus seruleustan başlayan ve arka boynuzda noradrenergik innervasyonla analjezi sağlayan sistemdir^{46,29}.

Endojen ağrının gerek iletim gerek diskriminasyon ve gerekse kontrolünün sağlandığı spinal yol ağrıda kapı kontrol teorisi olarak da anılmaktadır.

II.1.3. Ağrı mediyatörleri

Ağrı mediyatörleri endojen nosiseptif ve inflamatuvar cevabın nöronal iletilmesinde etkin olan humoral maddelerdir. Aljezik mediyatörler ve hiperaljezik ağrı mediyatörleri olmak üzere başlıca iki kategoride sınıflanmaktadır. Aljezik mediyatörler duyuşal sinir uçlarındaki nosiseptörleri stimüle ederler. Bu grup endojen maddeler otakoid, amin ve peptidlerden oluşurlar. Hiper-aljezik ağrı mediyatörleri ise nosiseptörlerin duyarlılaşmasına (fonksiyonel up regülasyon) neden olup ağrı yapıcı etkiyi güçlendirir. Prostaglandin, prostasiklin, prostaglandin E₂ gibi eikazonoidler bu tipte olan ağrı mediyatörlerindendir.

Doku zedelenmesi ve inflamasyonu izleyen hiperaljezi, kısmen nosiseptörlerin duyarlılaşmasına dayanır. Dokunun zedelenmesi, inflamasyona aracılık eden veya hızlandıran bazı kimyasal maddelerin lokal olarak saliverilmesine sebep olur. Bu kimyasal maddeler prostaglandinler, lökotrienler, histamin, bradikinin, serotonin, tromboksan, PAF (trombosit aktive edici faktör) ve serbest radikallerdir. Bu maddelerin saliverildiği yerler, mast hücreleri, damar yatakları ve diğer hücrelerdir. Sırasıyla önce histamin, kısa süre sonra bradikinin ve daha sonra da prostaglandinler ve diğer eikazonoidler salınır. Bu endojen aljezik maddeler travma, inflamasyon, artrit, eklem tümörleri ve kronik iskemi nedeniyle oluşan hiperaljezi ve ağrıda rol oynarlar. Endojen maddelerin oluşturduğu uyarıcı etki, kısmen nosiseptif sinir membranı üzerindeki direkt etkilerine, kısmen de vazodilatasyon veya vazokonstriksiyon şeklindeki vasküler etkileri nedeniyle lokal kapiller dolaşımı ve permeabiliteyi arttırmalarına bağlıdır^{9,46}.

Nöron dışı dokulardan saliverilen aljezik maddelerin yanısıra bazı nosiseptif sinir uçlarının P maddesi denilen bir polipeptid içerdiği ve bu maddenin de inflamasyon ve ağrıda rol oynadığı gösterilmiştir. Sinir liflerinin uyarılması, periferik sinir uçlarından P maddesi salınımı sonucu kapiller permeabilite artışı, lokal ödem ve vazodilatasyona sebep olur. Akson refleksi ve sempatik reflekslere bağlı olmayan zararlı bir uyarıya bağlı lokal reaksiyonlar, periferik sinir uçlarından P maddesi saliverilmesiyle açıklanmaktadır. Ayrıca eklem, kornea, diş pulpası gibi dokularda da çeşitli duyarlıklarda nosiseptörler mevcuttur^{9,46,40}.

Son yıllarda nosiseptörlere spesifik bir peptid olan CGRP (kalsitonin geni ile ilgili peptid) 'nin insanda güçlü bir vazodilatasyon oluşturduğu öne sürülmüştür. CGRP'nin infeksiyon bölgesinde uzun süreli vazodilatasyon oluşturması, nörojenik vazodilatasyon mediyatörlerinden biri olabileceğini düşündürmektedir. Ancak aljezi potansiyeli bilinmemektedir⁹.

İnterlökin-8 ve tümör nekroze edici faktör (TNF- α) nosiseptörlerin duyarlılaşmasına sebep olan diğer endojen mediyatörlerdendir^{12,11}.

Son yıllarda nosiseptörlerin duyarlılıklarının siklik AMP ve siklik GMP arasındaki denge tarafından kontrol edildiği, endotel kökenli gevşetici faktörlerden (EDRF) biri olarak tanımlanan nitrik oksit (NO) stimülasyonuna bağlı olarak siklik GMP düzeylerini yükselttiği, bu nedenle de ağrı mekanizmalarında rolü olabileceği gösterilmiştir.

II. 1.4. Deney hayvanlarında ağrı oluşturma metodları

Başta ağrı tanımlaması yapılırken, ağrının potansiyel doku hasarıyla seyreden duyuşsal ve emosyonel hoş olmayan ve yanısıra, zararlı bir uyarıdan otomatik olarak geri çekilmeyi sağlayarak koruyucu bir fonksiyon gösteren subjektif bir duygu olduğu ifade edilmişti. Bu tanımlama insanlardaki ağrının anlaşılabilmesi açısından doğru olmakla beraber deney hayvanları için yetersizdir. Hayvanlarda ağrıyla ilgili sözel tanıtım olamayacağı için ağrı tanımlaması ancak fizyolojik veya davranışsal değişikliklerin bir yansıması olarak ayırdedilebilmektedir. Deney hayvanları, aynı veya benzeri ağrılı uyarılarda, insanlarda oluşan motor davranış ve fizyolojik cevapların aynılarını sergiler¹⁷.

Ağrı, gerek tanımlaması ve gerekse ölçülmesi zor olan bir prosestir. Bu bakımdan, deney hayvanlarında oluşturulan bir ağrı modeli hayvanın vücudunda rahatsız edici bir uyarıya karşı tepki reaksiyonu cinsinden ölçülebilmektedir. Bu tepki reaksiyonları otonomik, farmakolojik yanıtlar olabildiği gibi davranışsal değişikliklerin skorlanması biçiminde de tanımlanabilmektedir.

Hayvanlarda uygulanan nosiseptif uyarının tipine göre yöntemler 4 kategoriye ayrılırlar. Bunlar

1. Mekanik uyarı testleri
2. Termal uyarı testleri
3. Elektriksel uyarı testleri
4. Kimyasal uyarı testleridir.

Hayvanlarda bir davranış incelenmesi modelinde kullanılacak ağrı oluşturucu uyarının seçimi son derece önemlidir. Bu uyarıcının başlıca nitelikleri şöyle sıralanabilir:

1. Uyarıcıyla doğal, hızlı başlayıp hızlı seyreden ve skorlanabilecek (sayılabilecek) bir uyarı oluşması,
2. Uyarının, primer afferent sinir liflerinin sınırlı gruplarını eksite etmesi ve ağrılı uyarının bulunduğu bölgede seçici olarak duyarlı olan reseptörleri aktive etmesi,
3. Acı veren uyarının, ağrı duyarlık bölgesinde doku hasarına neden olmaması

Tablo 1. mekanik, termal, elektriksel ve kimyasal uyarı testleriyle ilgili bilgileri özetlemektedir.

Tablo 1. Deneysel Ağrı Modelleri					
Kategori	Öğütlen Analjezi Modeli	Tipleri	Deneysel hayvanı	Uygulama ve süresi	Cevap
Mekanik	Narkotik	Kuyruk sırtışırma (Tail chip)	Fare	Kuyruk köküne arler pensi, 30 dakika	Farenin görüye dönüp pensi çıkarma çabası
		Randall Solhito	Fare, sıçan	Pence plantlar yüzeye veya kuyruk köküne basıncı	Hayvanda ağrıya karşı çarpınma veya cıyaklama
Termal uyarı	Narkotik	Sıcak plak (Hot plate)	Fare, sıçan	Sıcak plak üzerine hayvan pencelerinin lenması, 40-60 sn	Hayvanın zıplaması, pencelerini yalaması
		Isıya karşı refleks çekme a) Radyan (Tail tick) b) Sıcak/ soğuk ihkil banyo	Sıçan, fare, tavşan	Kuyruk veya kulak, 2-4 sn Kuyruk	Kuyruk veya kulak, ısı kaynağından refleks çekme Kuyruğu ihkil banyodan refleks çekme
Elektriksel uyarı	Narkotik	Minimum uyaran voltajına tolerans	Fare, sıçan, kobay, maymun, köpek	Kulak, kornea, gasserian gangliyon, diş pulpası	Minimum elektrik uyarıma karşı tolerans
		Kimyasal uyarı	Non-narkotik/ Narkotik	Kıvrıma-kramp testi (Writhing test)	Fare, sıçan

II. 2.NOSİSEPTİF PROSESLERDE NİTRİK OKSİT'İN ROLÜ

II.2.1 Nitrik oksit

Damar endotelinden gevşetici bir faktörün salınımı, ilk kez 1980 yılında Furchgott ve Zawadzki tarafından noradrenalin ile kastırılan sıçan aorta halkalarının asetil kolin ile stimülasyonu sonrasında gözlenmiştir²³. Endotel tabakasının mekanik ya da enzimatik olarak uzaklaştırılmasından sonra ortadan kalkan bu cevaba endotel hücrelerinden salıverilen humoral bir faktörün aracılık ettiği gösterilerek bu madde 'Endotel Bağımlı Gevşetici Faktör-EDRF' olarak tanımlanmıştır²⁴.

EDRF yarı ömrü 3-50 sn arasında değişen oldukça labil bir maddedir²⁴. Çeşitli türlerin izole arter ve ven preparatları ile mikrodamarlarında yürütülen çalışmalar asetil kolinin yanısıra kalsiyum iyonoforu A23187, adenosin difosfat (ADP), bradikinin, P maddesi, histamin, trombin, arakidonik asit, serotonin, noradrenalin ve lökotrienler gibi birçok maddenin EDRF aracılığı ile gevşeme oluşturduğunu göstermiştir²⁴. Bu gevşemelerin kullanılan agoniste, incelenen damar yatağına ve prepreparatın izole edildiği türe göre değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir²².

İlk kez Furchgott tarafından damar endotelinden EDRF'nin salınımı 'sandviç biyoesevi' metodu ile gösterilmiştir. Bu modelde EDRF'yi taşıyan intakt endotelli donör aort şeridi ile dedektör roldeki endotelsiz şerit intima tabakaları yüzyüze gelecek şekilde yerleştirilmiştir. EDRF'nin salınımı ve yapısının aydınlatılmasına yönelik bir başka çalışma da intakt aort endoteli üzerinden

gelen perfüzyon sıvısının, endoteli çıkarılmış vasküler halkaların süperfüze edilmesinde kullanıldığı kaskad biyoesey sistemidir. Bu preparatlarda donör aortun asetil kolin ile stimülasyonu sonucu alıcı dokularda gevşeme meydana gelmiştir^{25,67}.

Bu tip tekniklerin kullanılması, EDRF'nin çok kısa ömürlü bir madde olduğunu ve oksijenlenmiş tuz solüsyonunda yarı ömrünün saniyelerle ifade edildiğini ortaya çıkarmıştır. EDRF'nin etkilerinin hemoglobin, metilen mavisi ve dithiothreitol hidrokinon gibi ajanlarla inhibe edildiği ve ayrıca bu etkilere guanilat siklazın stimülasyonunun ve bunun sonucu olarak intraselüler s-GMP düzeyinin yükselişinin aracılık ettiği bilinmektedir⁶⁵.

Çeşitli teknikler kullanılarak süperoksit anyonlarının (O_2^-) EDRF'nin yıkılmasını hızlandırdığı süperoksit dismutaz enziminin (SOD) ortama ilavesi ile de yıkımın yavaşladığı gösterilmiştir⁵³.

EDRF'nin trombosit agregasyonunu da inhibe ettiği, agreg edilmiş trombositlerin disagregasyonuna neden olduğu ve her iki etkisinde de prostasiklin ile sinerjik davrandığı gösterilmiştir. Ayrıca EDRF endotel tabakasında ekstraselüler matrikste ve kollajen fibrillerde de trombosit adezyonunu inhibe eder^{63,61}.

EDRF'nin yapısı üzerinde yapılan araştırmalar yoğunlaştıkça gözlenen farmakolojik etkilerin çoğunun nitrik oksit (NO) ile benzer olduğunu ortaya koymuştur. 1987 yılında Ignarro ve arkadaşları³¹ EDRF'nin NO veya benzeri bir bileşik olabileceğini öne sürmüşlerdir. Kaskad biyoesey sisteminde salınımı

indüklenen EDRF ile dışardan uygulanan NO'nun benzer farmakolojik profil göstermeleri benzer yarı ömür süresine sahip olmaları³¹, trombosit agregasyonunu ve adezyonunu inhibe ederek, agregate olan trombositleri disagrege etmeleri, bu iki maddenin aynı olduğu görüşünü ortaya koymuştur⁶². Palmer ve arkadaşlarının kemiluminesans metodu ile endotel hücre kültürlerinden NO salınımı göstermeleri ise bu görüşü güçlendirmiştir⁶⁰. Bu yöntem ile damar endotelinden EDRF'nin etkilerine karşılık gelecek miktarda NO salıverildiği gösterilmiştir.

Öte yandan bazı kimyasal bulgularda EDRF'nin tek başına NO olmadığını NO'nun yanısıra benzer farmakolojik özelliklere sahip nitrozo bileşiğinin muhtemelen S-nitrozotollerin de EDRF cevabına aracılık ettiği bildirilmektedir³².

II.2..2 NO Sentezi:

Eski çalışmalar NO_2^- , NO_3^- ve hidroksilamin gibi bileşiklerin NO kaynağı olduğunu öne sürüyorlardı. 1988'de bir amino asit olan L-arjinin, NO'nun vasküler endotel hücrelerinden sentezinin prekürsörü olarak gösterildi. Deneyden önceki 24 saat L-arjinin yokluğunda kültürü yapılmış endotel hücreleriyle yapılan çalışmalar bu hücrelerden EDRF salıverilmesinde bradikinin ve A23187'nin meydana getirdiği bir azalma olduğunu ve bunun L-arjinin ile geri döndürülebildiğini, fakat D-arjininle etkilenmediğini göstermiştir. Buradan da NO oluşumunun yalnızca serbest L-arjinine bağımlı olduğu sonucuna varılmıştır⁵⁴.

(¹³N) L-arjinin ile mass spektrofotometresi kullanılarak yapılan çalışmalarda NO'nun L-arjininin terminal guanido nitrojen atomundan oluştuğu gösterilmiştir. Başka çalışmacılar da endotel hücrelerinden L-arjinin tarafından NO₂⁻ oluşturulduğunu rapor etmişlerdir.

Endotel homogenatları NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) bağımlı ve L-NMMA (N^G monometil L-arjinin) ile inhibe edilen bir mekanizma ile L-arjininden sitrüllin oluşturmaktadır. L-arjinini anyon değiştirici kromatografi ile tüketilmiş endotel sitozolünde L-arjinin bağımlı bir siklik GMP artışı görülmüş ve bu artışın aynı zamanda konsantrasyon bağımlı NADPH gereksinimli olup hem (³H) sitrüllin üretimi, hem de s-GMP artışı, L-NMMA tarafından inhibe edilmiş, D-NMMA tarafından ise edilememiştir. Tüm bu bulgular, NO ve sitrüllinin aynı enzimatik reaksiyonun ortak ürünü olduğunu ortaya koymuştur. Ek olarak (³H) sitrüllin oluşması ve s-GMP artışının Ca⁺² şelatörleriyle inhibe edilmiş olması, NO sentaz adı verilen enzimin Ca⁺² bağımlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca endotel hücre sitozolünde NO sentezinin kalmazulin bağlayıcı peptidler ve antagonistlerle inhibe edilmiş olması ve bu etkinin kalmazulin ile geri döndürülmüş olması endotel hücrelerde NO sentetazın Ca⁺² bağımlı stimülasyonuna kalmazulinin aracılık ettiğini ortaya koymuştur^{54,28}.

¹⁸O₂ ve mass spektrofotometresi kullanılarak yapılmış çalışmalarda bu enzimin hem NO hem de sitrülline moleküler oksijen kattığının gösterilmiş olması, bu enzimin bir dioksijenaz olduğunu ortaya çıkarmıştır⁴¹.

II.2.3 Omurilikte NO ve Nosiseptif Prosesler:

Nitrik oksit'in (NO) santral ve periferik sinir sistemindeki sinaptik iletimde rol oynadığına dair yeterince kanıt bulunmaktadır. NO'nun SSS'deki en önemli etkileri sinaptik plastisite ve uzun dönem potensiyasyonudur (Long Term Potentiation-LTP).

Gaz halinde küçük reaktif bir molekül olan NO nöronal membranlardan kolaylıkla geçer ve yarı ömrü milisaniye ile saniye arasında değişir. Bu özelliklerin sonucu olarak NO'nun retrograd transmitter olarak etki ettiği düşünülmektedir. Retrograd transmitter konsepti şöyle tanımlanmaktadır: Reseptör aktivasyonu post-sinaptik nöronda NO yapımı ile sonlanmakta ve bu hızla presinaptik nörona diffüze olarak eksitabilite modülasyonu ile sinaptik bağlantılarda artış yapmaktadır.

NO'nun retrograd transmitter olması dışında yapıldığı nörona etki etme olasılığı veya yapıldığı hücreden komşu bir glia veya diğer nöronlara diffüze olarak etki etme olasılığı veya enterik sistemde olduğu gibi klasik bir nörotransmitter olma özelliği bulunmaktadır. Halihazırda NO'nun SSS'nin farklı bölgelerindeki bu mekanizmaların tümü bazıları veya hiçbirleriyle etki edip etmediği kesin değildir⁵:

NO'yu oluşturan enzimin (Nitrik oksit sentaz-NOS) çoklu (multiple) biçimlerinin bulunduğu son zamanlarda anlaşılmıştır. SSS içinde intraselüler Ca^{+2} ile aktive edilen kalmodulin duyarlı bölgeye gereksinim gösteren konstitutif NOS'un yanısıra Ca^{+2} 'a gereksinim duymayan endotoksin ve sitotoksinlerle

indüklenebilen NOS'un bulunduğu da kanıtlanmıştır³⁸. Oluşum farklılıklarına rağmen her iki NOS da kofaktör olarak NADPH tetrahidrobiopterin (TBH4) ve flavinlere (FAD/FMN) gereksinim gösterirler ve her ikisi de NO ve L-sitrülin yapımında substrat olarak L-arjinin ve moleküler oksijen kullanırlar.

NOS'un kofaktör olarak NADPH'ya gereksinim göstermesi nedeniyle uzun enzim çalışmaları sonucunda NADPH-diaforazın bir NOS biçimi olacağına dair kanıtlar bulunmakta olup bu biçimin substrat olarak L-arjinine gereksinimin bulunmadığı ve Ca⁺/kalmodulin bağımlı olmadığı ifade edilmektedir. Bu veriler NADPH-diaforazın bir NOS biçimi olmakla beraber NO yapımında etkisinin bulunmadığı ve NOS gibi aynı şekilde yönlendirme veya düzenlenmesinin bulunmadığını düşündürmektedir⁶⁸.

Bazı araştırmacılar çalışmalarında serebellar N-metil D-aspartat (NMDA) reseptör alt tiplerinin aktivasyonunda s-GMP'nin labil bir madde olan NO aracılıklı yapımının arttığını gözlemişlerdir. Şöyle ki, NMDA reseptör aktivasyonu NO yapımında artışla sonuçlanmaktadır. Bu da etki yerinden diffüze olarak solubl guanilat siklazı aktive etmekte ve intraselüler s-GMP içeriğinin artışına sebep olmaktadır. Bunu takiben SSS'nin serebellum ve hipokampus gibi pek çok bölgesinde ve çeşitli nöronal hücre dizisinde NMDA aktivasyonunun NO veya NO içeren özelliklerinin yapımı aracılığı ile Ca⁺ bağımlı s-GMP artışına sebep olduğu anlaşılmıştır. Bununla beraber NMDA reseptör aktivasyonu ile oluşturulan intraselüler Ca⁺ miktarının aynı nöronda sentezlenen NO aracılıklı GC-S (soluble guanilat siklaz) aktivasyonunu önlemeye yeterli olduğu gösterilmiştir^{38,80}. Bu halde NO'nun komşu nöron veya gliaya (muhtemelen

retrograd biçimde presinaptik olarak) diffüze etmesi gerektiğini ve burada GC-S'nin aktive olması sonucu intraselüler s-GMP artışının olacağı hipotezi teklif edilmiştir. NOS ve s-GMP ko-lokalizasyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesindeki eksiklik^{80,3,57} ve ekstraselüler NO'yu bağlayan hemoglobinin LTP'yi önlemesi bu hipotezi desteklemektedir.

NMDA reseptör aktivasyonuna ilişkin pek çok etki nihai olarak NO yapımı ile medye edilir. NO da omurilikteki hiperalejide anlamlı rol oynamaktadır. Bununla beraber bugüne değin NO'nun omurilikte nasıl fonksiyon gösterdiği veya tam olarak ne rol oynadığına ilişkin bu ifadeyi destekleyen az kanıt bulunmaktadır.

Kültürde dorsal kök gangliyon nöronlarında NO'nun oluşabileceğine ilişkin kanıt bulunduğu varsayılmaktadır. Yanısıra NOS ve NADPH diaforazi işaretlenmiş nöronların neonatal ve yetişkin arka kök gangliyonlarında lokalize olduğu in vivo ve invitro olarak gösterilmiştir^{57,2,75}. Bu veriler ışığında NO'nun dorsal kök gangliyonlarında yapıldığı ve salıverildiği, bunun da nöronların hem periferik ve hem de santral terminallerinde olduğu varsayılmaktadır. Morris ve arkadaşları, arka kök gangliyonlarındaki nöronlar ile uydu hücreler (glla) arasında bir sinyal sistemi rolü oynadığını varsaymışlardır. Bununla beraber bu nöronların santral ve periferik terminallerinde de NO'nun potansiyel bir role sahip olduğuna dair kanıt bulunmaktadır. Periferde N^G nitro L-arjinin metil esteri (L-NAME) veya N^G-monometil L-arjinin (L-NMMA) gibi NOS antagonistlerinin uygulanması intraplantar bradikinin, fosfolipaz A₂ veya P maddesi enjeksiyonuyla

oluşan ödemi bloke etmekte^{30,10,77} ve NO yapımının aktivasyonunda antinosisepsiyon oluşturmaktadır¹⁶.

NO'nun NMDA reseptör aktivasyonu ile ilgili pek çok etkiye aracılık ettiği düşünülürse, L-arjinin uygulamasının endojen NO yapımında artışa sebep olacağı ve bunun da NMDA'nın oluşturduğuna benzer zaman aralığı ve boyutunda tail-flick refleksinde fasilitasyon oluşturabileceği beklenmiştir. Bunu destekleyen bir çalışmadaki bulgularla i.t. L-arjininin (D-arjinin değil) NMDA benzeri hızlı geçici doz bağımlı termal hiperaljezi oluşturduğu gösterilmiştir⁴⁹. Bu sonuçlar noksiyus ısıyla kuyruk geri çekme cevabının NMDA'ca oluşturulan termal refleks fasilitasyonunda NMDA, NO ve s-GMP'nin aracılık ettiğini kuvvetle göstermiştir.

Omurilikte NMDA'ca oluşturulan termal hiperaljezi serebellumdaki benzer bir dizi olaya sebep olmaktadır. NMDA reseptör aktivasyonu intraselüler Ca^{2+} içeriğinde artış yapmakta, bu da NOS'un kalmodulin duyarlı bölgesini aktive ederek serbest L-arjininden NO yapımına yol açmaktadır. NO yapıldığı yöreden presinaptik komşu nöronlar veya gliaya diffüze olmakla buralarda GC-S'yi aktive ederek intraselüler s-GMP içeriğinde artışa sebep olmaktadır.

Sonuç olarak, NO yapımı ve takip eden etkileri ile interfere eden ilaçların yeni ve yararlı terapötik analjezikler olarak etki gösterme olasılıkları bulunmaktadır. Tüm bu sonuçlar, NO'nun sinaptik transmisyon ve özellikle omurilikteki nosiseptif yapılanmalara katkı sağlayan yeni ve entrikalı nörotransmitterlerin ilki olduğu izlenimini vermekte ve bu sisteme ait

bilgilerimizdeki artışın önümüzdeki yıllarda kronik ağrının mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olacağı hususunu teyid etmektedir^{61,74}.

II.2.4 İnflamatuvar Ağrının Periferik Kontrolünde Nitrik Oksit^{16,15}:

Akut inflamasyon, lokal mikrovaskülatörden sıvı ve proteinlerin ekstravazasyonu ve inflamatuvar bölgeye polimorfonükleer lökositlerin akümüasyonu sonlanan ödem oluşumuna sebep olan kimyasal mediyatörlerin salıverilmesine bağlıdır.

Dokuda yabancı materyalin varlığında veya harabiyetinde makrofajlar alarm hücresi olarak etkinlik gösterir ve sitokinler veya klasik inflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesi aracılığıyla yabancı bir maddenin veya zararın varlığını sinyallerler.

Bütün inflamatuvar ağrı tiplerinde ağrı reseptörlerinin duyarlılaşması ortak kaynaktır.

Ağrı reseptörlerinin fonksiyonel up-regülasyonu klinik olarak hiperaljezi diye adlandırılır.

Hiperajjezi ile ilgili moleküler olaylar tamamen anlaşılmiş olmakla beraber intraselüler s-GMP ve Ca^{+2} konsantrasyonlarındaki artışın nosiseptörlerin fonksiyonel up-regülasyonu ile ilgili olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır.

Bunun yanısıra duyarlılaşmış nosiseptörlerde bir down-regülasyon oluşturan sistem de bulunmaktadır. Devam etmekte olan hiperajjezide lokal olarak dibütiril s-GMP veya nöronal guanilat siklazı stimüle eden maddelerin

(karbakol veya NO jeneratörleri) uygulaması direkt blokaj meydana getirmektedir.

İnflamatuvar ağrıyı periferik olarak kontrol eden ajanlar üç tipe ayrılır:

a) TİP I (Nosiseptör aktivasyonunun inhibisyonu):

Bunlar açık ağrıyı, up-regüle nosiseptörlerin aktivasyonunu inhibe ederek önlerler. İnhibisyon, reseptör düzeyinde antagonizma veya eksitatör uyarıdan kaçınmayı sağlama ile olur. Antihistaminik ve lokal anestezipler tip-1 ajanlardır.

b) TİP II (Hiperalejinin önlenmesi):

Hiperaleji gelişimi, nosiseptör s-AMP/Ca⁺² artışı sağlayan inflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesinin inhibisyonu veya reseptör düzeyinde antagonizma oluşturan tip-2 (antaljik) ilaçlarla önlenir. Bunlar arakidonik asit/siklooksijenaz ürünleri olan PGE₂ ve PGI₂ ile semptomimetik aminlerdir. Örneğin nonsteroidal antiinflamatuvar (NSAİ) ilaçların analjezik etkileri, lokal olarak salıverilen prostaglandinlerin sentezini bloke etmeleriyle dolayısıyla ağrı reseptörlerinin duyarlılaşmasını engellemeleriyle açıklanır.

c) TİP III(Hiperalejinin direkt blokajı):

i. Down regülatörler (periferik opiyatlar):

Dipiron, diklofenak

ii. İndirekt down regülatörler (Endojen periferik opiyat salıvericiler):

Klonidin

Bu maddenin analjezik etkilerinin araştırılmasında, opiyat benzeri bir madde salıvermesine bağlı bir analjezi indüklediği gösterilmiştir.

Nosiseptörler upregüle edildiğinde (süregiden hiperaljezi) nosiseptör hiperaljezisini önleyen ilaçlar (antaljikler) analjezi oluşturmazlar. Diğer bir deyişle s-AMP/Ca⁺² akümüasyonu bir hiperaljezik mediyatör tarafından tetiklendiğinde Ca⁺² salıverilmesini önleyen veya s-AMP aktivitesini inhibe eden ilaçlar analjezik etki göstermezler.

Nosiseptörlerde direkt down-regülasyon oluşturan analjeziklerin, bunu L-arjinin: NO/ s-GMP yolağı aracılığıyla oluşturduğuna dair artan kanıtlar elde bulunmaktadır⁵⁰. Bu da nitrik oksit sentaz (NOS) antagonistleri ile periferik analjezik etkinin düşürülmesi ve guanilat siklaz aktivasyonunun inhibitörlerince de ortadan kaldırılması ile demostre edilmektedir. Yine bu maddelerin analjezik etkileri s-GMP'yi inaktive eden fosfodiesterazın spesifik inhibitörleri ile potansiye edilmektedir. Opiyatlar parsiyel opiyat agonistleri ve opiyat agonistleri inflamatuvar hiperaljeziyi bloke etmektedir ve opiyatların etkileri, özgün reseptör antagonistleri ile bloke edilmektedir.

Ferreira grubu tarafından yenilerde nosiseptörlerde down-regülasyon oluşturan ilaçların (periferik etkili opiyatlar ve dipiron) ağrı duyusal nöronlarında L-arjinin: NO/ s-GMP yolağını stimüle ettiği gösterilmiştir^{15,18}. Analjezik olarak bu maddelerin saf siklooksijenaz inhibitörlerine göre daha hızlı etki başlatması ve sempatomimetik aminler gibi PG dışı mediyatörlerce indüklenen hiperaljezi durumunda yararlı olma avantajları bulunmaktadır. Şaşırtıcı olan, süregiden hiperaljezinin dipiron veya morfin tarafından downregülasyonundan sonra çok

zayıf bir uyarı bile önceki şiddetli hiperaljezik durumu eski haline koymaktadır. Bu olaya periferik ağrının hafızası (peripheral memory of peripheral pain) denmektedir.

Opiyatların ve asetilkolinin lokal etkilerinin benzerliğine bağlı olarak araştırmacılar L-arjinin: NO/ s-GMP yolağında morfine bağlı periferik analjezide rolü olup olmadığını incelemişlerdir. Bir çalışmada, Randal-Sellito sıçan pençe basınç testinin bir modifikasyonu kullanılmıştır. Bu yöntemle morfin analjezisinin L-NMMA, L-NIO veya metilen mavisi tarafından inhibe edildiği, MY5445 ile de potansiyelize edildiği gözlemlenmiştir.

II. 3. NOSİSEPTİF PROSESLERDE VİTAMİN B₆ GRUBU

Vitamin B₆ terimi, klasik olarak piridoksine atfedilen bir isimdir. Bununla beraber 'B₆'nın, vitamin B₆ aktivitesi gösteren çeşitli kimyasal bileşiklere ad verilmesi daha doğrudur.

II.3.1. Kimyası:

Terminolojik olarak, piridoksin tanımlaması altında yer alan başlıca B₆ grubu vitaminler, bir alkol ürünü olarak piridoksol, aldehit yapıda olan piridoksal ve bir amin yapıda olan piridoksamin'dir.

Bu maddeler, serbest baz veya hidroklorür tuzları halinde, suda ve alkolde çözünebilen renksiz kristallerdir. Normal sıcaklığa rezistans gösterirler. Alkali çözeltilerde ve ultraviyole ışığında dekompoze olurlar. Piridoksin hidroklorür 204-206°C olan ergime noktasında dekompoze olma özelliğine sahiptir.

II.3.1.1. Genel İzolasyonu:

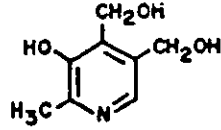
Vitamin B₆'nın izolasyonu çalışmaları ve spesifik kimyasal özellikleri ilk kez Birch ve György tarafından gösterilmiştir. Bu araştırmacıların orjinal incelemelerinin yanısıra, izolasyona ait çeşitli bağımsız raporlar da bildirilmiştir.

İzolasyon metodları, çeşitli araştırmacılar tarafından, piridoksinin aşağıdaki özelliklerine bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bunlar:

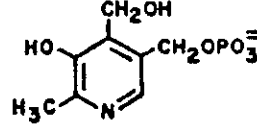
1. Fuller toprağı veya kömüründe absorsiyon
2. Etanol veya asetonda çözünlülük
3. Asit ve alkali hidrolizine stabilite
4. Ağır metal tuzlarıyla çökmede sorun
5. Bir asetil türevi oluşumu
6. Fosfotungustik asitle çökme

Araştırmacılar B₆ kaynağı olarak izolasyonda, pirinç, kepek ve mayayı kullanmışlardır⁸.

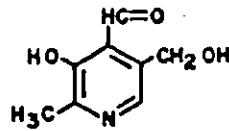
II.3.1.2. Yapısal Formüller:



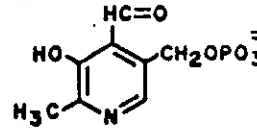
Piridoksin (PN)



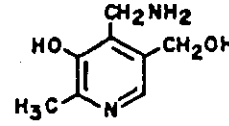
Piridoksin 5'-fosfat (PNP)



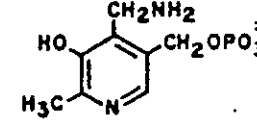
Piridoksal (PL)



Piridoksal 5'-fosfat (PLP)



Piridoksamin (PM)



Piridoksamin 5'-fosfat (PMP)

Şekil 3. Vitamin B₆ Vitaminerler

II.3.1.3. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri:

* Kimyasal özellikler:

Piridoksin, stabil, hidroksilli, zayıf azot bazı özellikleri gösterir. Birch ve György'nin yaptığı çalışmalarda piridoksin, kurşun, cıva, gümüş veya platin gibi ağır metal tuzları ve pikrik asit dışında, sadece fosfotungustik asitle çökmüştür. Nitröz asitle inaktive olmamıştır. Mineral asitler veya sulu

alkaliiler, hidrolitik ajanlar, sıcak veya soğuk vitamene etki etmez. Etil nitrit ve Fehling çözültisi gibi ajanların etkisine karşı dayanıklıdır. Piridoksin demir klorür ile bir fenolik madde gibi reaksiyona girerek, kırmızımsı kahverengi renk verir. Alkali çözültide piridoksin, 2, 6- diklorokinon kloromidle hemen maviden kırmızımsı kahverengiye dönüşen renk verir. Bu, vitamin için renk reaksiyonu testinin de esasını oluşturur.

*** Fiziksel özellikler:**

Piridoksin hidroklorür, $C_8H_{11}NO_3.HCl$, renksiz kristaller halindedir. Erime noktası olan $204-206^{\circ}C$ 'te dekompoze olur. Serbest baz halindeki $C_8H_{11}NO_3$, $160^{\circ}C$ 'te erir. Bileşik optikçe aktiftir. Baz ve hidroklorür formları dekompoze olmadan hemen süblime olurlar.

Hidroklorür çözültisi suda kolayca çözünür fakat alkol ve asetonda az çözünür. Baz halde metanolde çözünür ve metanol çözültisinde etil eterle çökmez.

Piridoksin nötr ve alkali çözültilerde, ışıpta, hızlı bir biçimde bozunur . $0.1N HCl$ 'de ise çok az bozunur.

Piridoksinin tautomerik özellikleri, hidrojen iyonu konsantrasyonunun değişmesiyle ultraviyole absorpsiyonundaki değişikliklerle gösterilmektedir. Piridoksinin pK (baz) değeri 6.2×10^{-10} olarak bulunmuştur.

II.3.2 Genel Bilgiler:

Niasin gibi vitamin B₆ da bir piridin türevidir. Vitaminin altı major biçimi tanımlanmıştır. Piridoksin (PN) primer alkol yapıda, piridoksal (PL) aldehit ve piridoksamin (PM) aminometil grubu içeren amin yapısında bir maddedir. Bu bileşikler piridin çekirdeğindeki 4 numaralı karbon atomunda bulunan sübstütiyenlere bağlı olarak birbirlerinden farklılaşmaktadırlar. Piridoksin, tüm B₆ vitaminleri için bir jenerik tanımlayıcı olarak kullanılabilir. Major yapıların (piridoksin, piridoksal, piridoksamin) 5'-fosforile türevleri sırasıyla, piridoksin- 5'- fosfat (PNP), piridoksal- 5'- fosfat (PLP) ve piridoksamin- 5'- fosfat (PMP) tir. Bu fosforile türevler, B₆ vitaminlerinin dokularda bulunan şekillerini tanımlar. PLP, primer olarak karaciğerde sentez edilir ve B₆ vitaminlerinin plazmada bulunan biçimlerinin % 50'sinden fazlası PLP bileşiği olarak saptanmaktadır. PLP, dolaşımında albumine bağlı olarak bulunur.

B₆, karaciğer ve iskelet kaslarında sınırlı miktarda depo edilir. İskelet kaslarında bulunan PLP'nin % 90'ından fazlası, glikojen fosforilaz enzimiyle birleşmiş vaziyettedir. Karaciğerde PLP bağlayıcı proteinler de bulunmaktadır. B₆ eksikliği olan bir diyet uygulanması durumunda, hastalarda üç haftadan kısa süre içerisinde vitamin B₆ yetmezliği oluşmaktadır. Vitamin B₆'nın temel atılım ürünü 4- piridoksik asit (4 PA) tir.

Bütün B vitaminlerinin olduğu gibi B₆ vitaminlerinin de kaynağı karaciğer, maya, tahıllar, meyva ve bitkilerdir. B₆ içeren besin maddelerine sıcaklık uygulanması, B₆ düzeylerinde önemli oranda düşme meydana getirir. Yetişkinlerde diyet uygulaması vitamin B₆ yetmezliğine benzer tablolar ortaya çıkarabildiği gibi ilaçla indüklenen yetmezliklere de sık olarak rastlanmaktadır. Alkoliklerin % 50'sinden fazlasında hipovitaminz görülebilmektedir.

Estrojen içeren oral kontraseptiflerin kullanımında, plazma piridoksal fosfat düzeylerinde düşme görülebilmektedir. Bu hipovitaminz, oral kontraseptif kullananlarda görülen mental depresyon, glukoz toleransında yetmezlik ve malaizanın sebebi olarak sayılmaktadır. Vitamin için önerilen günlük miktar, yetişkin erkeklerde 2.2. mg ve kadınlarda ise 2 mg'dır. Gebelik ve laktasyonda günlük önerilen doz 2.5 mg'a çıkmaktadır.

Günlük alınımlar dozu diyetle alınan protein miktarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. B₆ yetmezliği görülen klinik durumlar arasında, egzema, seboreik dermatit, glossit, stomatit ve sinir sistemine ilişkin hiperirritabilite ve hiperakuzi gibi bozukluklar, anormal EKG kalıpları ve konvülziyonlar mikrositik-hipokromik anemi ve immnodepresyon örnek olarak sayılabilmektedir. Piridoksinin plazma değerleri 3.6-18 ng/ml arasında değişebilmektedir.

Metabolik olarak aktif olan B₆ vitamini piridoksal fosfattır (PLP). Bütün B₆ bağımlı enzimler PLP'yi koenzim olarak kullanırlar. PLP amino asit metabolizmasına iştirak eden 50'den fazla enzimin koenzimi olarak rol oynar. Piridoksal fosfat donör amino asidin α -amino grubuyla kondanse olup Schiff's bazı veya aldimin oluşmasına sebep olur. Bu donör amino asidin dekarboksilasyonunu sağlayarak onun amin formuna dönüşümüne veya α -ketoasidin α karbonuna amino grubu transferiyle yeni bir amino asidin oluşumuna olanak verir.

B₆ bağımlı amino asit dekarboksilazlar arasında en önemli enzim histidin dekarboksilazdır. Bu enzim histidinden histamine dönüşümü katalizler. Yanısıra aromatik amino asit dekarboksilaz, dopadan (dehidroksi fenilalanin) dopamine ve 5-hidroksitriptofandan serotonine (5 HT) dönüşümü sağlayan önemli B₆ bağımlı amino asit dekarboksilazlardandır. Bir diğör örnek ise, glutamik asit dekarboksilaz olup bu B₆ bağımlı enzim glutamik asidi, nörotransmitter δ -aminobütirik aside (GABA) dönüştürmektedir.

L-dopa, parkinson hastalığında kullanılan bir ilaç olup B₆'nın L-dopa uygulanan hastalarda oluşturduğu antagonist etki, bu ilacın santral sinir sistemi dışındaki yani onun hedef dokusundan dışarda B₆ tarafından dekarboksilasyonundaki artışa bağlanmaktadır. L-dopa alan parkinsonlu hastaların vitamin B₆ mega dozlarından kaçınması gerekmektedir.

Piridoksal fosfat aynı zamanda aminoasitlerin yan zinciri modifikasyonunu sağlayan enzimlerin katalitik etkileri bakımından da gereksinme duyulan bir maddedir. Şöyle ki PLP transaminasyon, deaminasyon, desülfürasyon, dekarboksilasyon, rasemizasyon, dönüşüm ve aminoasit metabolizmasında sentez reaksiyonları bakımından fonksiyon gösteren bir koenzimdir. Ek olarak B₆'ya, triptofandan nikotinamide dönüşümde, hem ve diğer porfirinlerin sentezinde, glikojenoliz olayında, sfingolipid sentezinde ve linoleik asitten prostaglandinlerin prekürsörü olan arakidonik aside dönüşümde de gereksinme duyulur.

B₆ yetmezliği en çok alkolikler arasında görülmektedir. Çünkü alkoliklerde barsak absorpsiyonunda bozulma oluşmaktadır. Yanısıra gebe kadınlarda yükselen estrogen düzeylerine bağlı olarak triptofan metabolizmasında bozukluk oluşmaktadır. Bebek mamalarıyla beslenen infantlarda mamaların yüksek sıcaklıkta otoklavlanmasına bağlı olarak B₆ yetmezliği gelişebilmektedir. İzoniazid, hidralazin, penisilamin, sikloserin, deoksipiridoksin ve L-dopa alan hastalarda da vitamin B₆ yetmezliği görülmektedir.

Genetik olarak vitamin bağımlı bozukluklarda, B₆ mega vitamin tedavisi, başarılı sonuçlar oluşturmuştur. Piridoksin bağımlılığı enzim yetersizliğine veya PLP için apoenzim afinitesindeki düşmeye atfedilen enzim aktivitesi azalmasının sonucu olarak değerlendirilmektedir.

Vitamin B₆'ya cevap veren başlıca klinik bozukluklar arasında hemosistinüri, sistatyonüri, ksantürenik asidüri, hiperoksalüri ve infantil konvülsiyonlar bulunmaktadır. Günlük olarak 1000 mg'lık oral dozların uygulanmasında herhangi bir advers yan etki bildirilmemiştir. Buna karşılık 2-6 g'lık B₆ mega dozlarıyla duyusal nöropati geliştiği bildirilmiştir.

Vitamini ani olarak kesmenin, yetmezlik semptomları oluşturduğu da gözlemlenmiştir. Vitamin B₆ 'ya ilişkin en önemli klinik laboratuvar tayini ekzojen PLP varlığında ve yokluğundan in vitro olarak PLP bağımlı eritrosit transaminaz aktivitesinin ölçülmesiyle sağlanabilmektedir. PLP'yi koenzim olarak kullanan aspartat transaminaz (AST) veya alanin aminotransferazın (ALT) in vivo ansaturasyonunun, PLP eklendikten sonra hemolizat örneklerinde tayini diğer bir yöntemi oluşturmaktadır. AST için 1.5'tan az ve ALT için 1.25'ten az olan oranlar, enzimin normal saturasyon düzeylerini ve bu anlamda da yeterli B₆ düzeylerini tanımlamaktadır. Vitamin B₆ yetmezliği durumlarında belirtilen enzimler koenzim tarafından in vivo olarak satüre edilemediğinden aktivite oranları sırasıyla 1.5 ve 1.25'in üzerine çıkmaktadır.

Nutrisyonel B₆ tayinine ilişkin daha eski bir yöntem triptofan yükleme testidir. 2-5 g'lık triptofan alımından sonra toplanan 24 saatlik idrarda ksantürenik asit atılımı ölçülmektedir. Vitamin B₆ yetmezliğinde kinüreninaz aktivitesi düşmekte kinürenin ve 3- hidroksikinürenin akümülyasyonu oluşmaktadır.

Ksantürenik asit dahil triptofan metabolitlerinin ekskresyonunda bir artış oluşmaktadır. Metiyonin yükleme testinde de benzer bir protokol uygulanmakta ve kullanılan B₆ düzeyinin tayin edilebilmesi için sistatyonin atılım miktarı hesap edilebilmektedir. Vitamin miktarıyla ilgili yaygın kullanılan diğer metodlar arasında mikrobiyolojik ve florometrik eseyler bulunmaktadır. B₆ düzeylerinin direkt tayiniyle ilgili vitaminlerin fotosensitivite göstermesi sebebiyle zorluklar içermektedir. YBSK'nın rutin kullanıma girmesiyle B₆ vitaminlerinin idrardaki 4-piridoksik asit düzeyleri veya vitaminlerin plazma düzeylerini hızlı olarak analiz etmek mümkün olmuştur. Diğer yandan streptococcus faecalis'ten elde edilen PLP bağımlı enzim tirozin dekarboksilazın radyoenzimatik direkt tayini de PLP düzeylerini yansıtmaktadır^{46,9}.

II.3.3. Biyokimyasal Sistemler ve Fizyolojisi:

Daha önceki çalışmalarda protein ağırlıklı diyetle beslenen hayvanlarda piridoksine gereksinimin arttığı gözlenmiştir. Bu piridoksal fosfatın, transaminaz koenzimi oluşunun bir sonucudur. Gunsalus ve arkadaşları, çeşitli aminoasitlerin dekarboksilasyonu için gerekli olan koenzimi piridoksal fosfat olarak tanımlamışlardır. Diğer yandan, pek çok enzim sistemlerinin piridoksal fosfata gereksinim duydukları da rapor edilmiştir, fakat bazıları tam olarak aydınlatılamamıştır.

Enzim sistemlerindeki piridoksal fosfat fonksiyonlarının mekanizması üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Organizmada amino asitler, piridoksal (veya PLP) ve uygun bir metal varlığında piridoksal fosfat bağımlı enzimlerle katalizlenen bir dizi reaksiyona maruz kalırlar.

Nonenzimatik piridoksal fosfat-katalize sistemlerdeki metal iyonuna gereksinim, enzimatik sistemlerde görülmemektedir. Piridoksal fosfat enzimlerindeki protein (apoenzim), nonenzimatik reaksiyonların metal gereksinimlerini yerine getirmektedir. Monoamin oksidaz dışında, piridoksal fosfat bağımlı enzimlerden kristal biçiminde elde edilenler özgün, saf etkileri bakımından metal iyonuna gereksinim duymamaktadır. Sığır plazmasından elde edilen monoamin oksidaz ve bezelye fidelerinden elde edilen saf amin oksidaz, bakır ve piridoksal fosfat içermektedir. Kristal monoamin oksidaz, enzimatik aktivite için gerekli olan, Cu^{++} 'in 4 atomunu içermektedir. Enzim molekülünde bakır iyonlarının piridoksal fosfatla ilişkisi bir şelat oluşumdur. Metiyonin ve çeşitli aminoasitlerin oksidatif dekarboksilasyonunda, kristalin peroksidazın, aktivite için piridoksal fosfat ve Mn^{++} 'ye gereksinim duyduğu gösterilmiştir.

*** Transaminazlar:**

Transaminazlar, piridoksal fosfat-katalize enzimlerin major bir grubunu oluşturmaktadır. Amino asit transaminasyonlarının büyük

çoğunluğu, doğada geniş olarak bulunan bu enzimlerle katalizlenir. Glutamat oksalasetat transaminaz olarak da bilinen aspartat transaminaz, kalpte en yüksek konsantrasyona ulaşarak memeli dokulardaki transaminazlar içinde en bol bulunanı olarak saptanmıştır.

*** Aminoasit Dekarboksilazlar:**

Piridoksal fosfat bağımlı tanımlanan ilk enzimlerdir. Bu enzimler, glutamik asit dekarboksilaz, sistein sülfirik asit dekarboksilaz ve aromatik L-amino asit dekarboksilaz memeli dokularda büyük öneme sahip ve mikroorganizmalar arasında da yaygındır. Udenfriend ve arkadaşlarının çalışmaları memeli enzimleri olarak tirozin dekarboksilaz, histidin dekarboksilaz (mast hücresi histidin dekarboksilaz dışında) 5-hidroksitriptofan dekarboksilaz, dopa dekarboksilaz ve triptofan dekarboksilaz, -tek enzim olarak aromatik L-aminoasit dekarboksilazi göstermiştir. Mikroorganizmalarının birçoğunda bulunan L-aspartat-4-karboksilyaz *Achromobacter* sp'den kristalize halde izole edilmiştir ve piridoksal fosfatın rolü çalışılmıştır.

Glutamik asit dekarboksilazla ilgili bilgilerimizin çoğu, beyin metabolizmasındaki çalışmaların sonucudur. Periferik sinirlerde ve santral sinir sisteminde konvülziyonların ve morfolojik değişikliklerin oluşumu, hayvanlarda B₆ vitamini eksikliği veya antivitamin B₆ bileşenlerinin uygulanması, beyin metabolizmasında yapılan çalışmaların sayısını

arttırmıştır. Konvülsiyon yapıcı ajanların birçoğu, sinir sisteminde bulunan piridoksal fosfat bağımlı enzimlerin katalitik etkisini inhibe ederek etki gösterir. Sinir sisteminin metabolizmasında, B₆ vitamininin katılımı ile ilgili çalışmalar glutamik asit mertabolizması, formasyonu, fonksiyonu ve γ -aminobütirik asit (GABA) üzerinde odaklanmıştır. γ -aminobütirik asit- α -ketoglutarat transaminaz ve piridoksal fosfat bağımlı enzim, γ -aminobütirik asiti, süksinik semialdehide çevirirken glutamik asit dekarboksilaz, santral sinir sisteminde glutamik asitten γ -aminobütirik asit formasyonunu katalize eder. Roberts ve arkadaşlarının çalışmaları, piridoksin eksikliğinde, glutamik asit dekarboksilazın, γ -aminobütirik asit- α -ketoglutarat transaminazdan daha etkili olduğunu göstermiştir. γ -aminobütirik asit uygulanması, vitamin B₆ eksikliğini geçici bir süre için kontrol edebilmektedir.

Serotonin, adrenalin ve noradrenalin piridoksal fosfat bağımlı enzimlerce sentezlenen bileşiklerdir. Serotonin, 5-hidroksitriptofandan, aromatik-L-amino asit dekarboksilazın (5-hidroksitriptofan dekarboksilaz) etkisiyle sentezlenir; bütün aminleri oksitleyen monoamin oksidazla da metabolize edilir. Sığır plazmasından elde edilen pembe kristalize monoamin oksidaz enzim molünün iki mol piridoksal fosfat içerdiği bulunmuştur. Histamin gibi diaminlerin sentezi için, piridoksal fosfat bağımlı enzimlere gereksinim vardır. Aortik amin oksidazın etkisi için bakır ve piridoksal fosfata gereksinim duyduğu gösterilmiştir. Kobay

plazmasında, benzilamin oksidazın, piridoksal fosfat içerdği de rapor edilmiştir.

*** Triptofan Metabolizması:**

Triptofanın, niasin prekürsörü olması ve ksantürenik asitin tanımlanması, bu amino asitin metabolizmasına gösterilen ilgiyi arttırmıştır. B₆ vitaminiyle etkileşmesi gösterilmiş olan triptofan metabolizmasının, major yolları ve ayrıntıları Henderson ve arkadaşları, Gholson ve arkadaşları ve Coursin'in çalışmalarında bildirilmiştir.

Gösterildiği üzere, piridoksal fosfat, kinürenin transaminaz kinüreninaz, aromatik-L-amino asit dekarboksilaz (5-OH-triptofan dekarboksilaz) triptofanaz ve monoamin oksidaz enzimleri için önemli bir koenzimdir. Bunun için B₆ vitamini eksikliği olduğunda triptofan metabolizmasında niasin metabolitleri ve miktarları idrarda azalabilirken, triptofan, özellikle ksantürenik asit, kinürenin ve 3-hidroksikinürenin anormal metabolitlerinin idrardaki atılımında artış oluşturur. B₆ vitamin eksikliği olan hayvan ve insanlara DL- veya L-triptofan uygulanması ksantürenik asit atımını artırır. Kinürenin transaminasyonu oluşturan enzim piridoksal fosfat bağımlıdır. Piridoksin eksikliği olan sıçanlarda idrarda 6-hidroksikinürenik asit atılımı rapor edilmiştir. Triptofan metabolizmasının, estrojen alanlarda ve ovulasyon kontrolü için steroid

hormon kullanan kadınlarda değiştiği gözlenmiştir. Oral piridoksin uygulanması, oral steroid kullanan kadınların idrarında, triptofan metabolitlerinin anormal atılımını düzeltmektedir.

*** Tirozin ve Fenilalanin Metabolizması:**

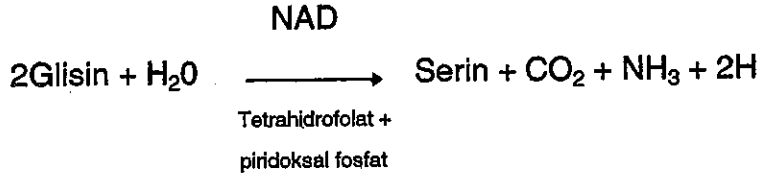
Tirozin ve fenilalanin noradrenalin ve adrenalin gibi önemli fizyolojik bileşiklerin artmasını sağlayan piridoksal fosfat bağımlı enzimleri içeren çok sayıda yolakla metabolize edilir.

Ek yolaklar norepinefrin ve epinefrin azalmasını rapor etmiştir. Bu metabolik reaksiyonlarla ilgili yetersizlikler belirli genetik defektler veya doğuştan metabolizma bozukluğu oluşturur ve alkaptonüri (homogentizik asit) fenilketonüri (fenilpürvik asit) ve tirozinozis (p-hidroksifenil pirüvik asit) gibi durumlarla sonuçlanır. Tirozin, tiroksin prekürsörü olarak hizmet eder, fakat piridoksal fosfatın biyosentezinde direkt rolü araştırılmamıştır.

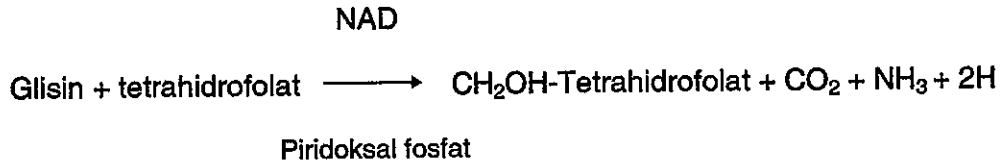
*** γ -Hidroksiglutamam Serin ve Glsin:**

Kekker ve Maitra, sıçan karaciğerinde γ -hidroksiglutamamı glioksalat ve alanine çeviren piridoksal fosfat-bağımlı enzim sistemini rapor etmişlerdir.

Serin biyosentezi tetrahidrofolata ve nikotinamid adenindinükleoide (NAD) ek olarak piridoksal fosfata gereksinim duyan enzimleri içeriir. Serin sentezi aşağıdaki gibi yürümektedir:



Glisin dekarboksilasyonu, piridoksal fosfat, tetrahidrofolat ve NAD içerir. Glisin dekarboksilasyonu aşağıdaki reaksiyon çerçevesinde gelişir.



Gene, glisin çeşitli piridoksal fosfat bağımlı enzim sistemleriyle biyosentezlenir.

* Fosforilazlar:

Tavşan kası, istakoz kası ve insan kası fosforilaz a (aktif form) piridoksal fosfat içerir. İnaktif yarı molekül fosforilaz b, 2 mol piridoksal fosfat içerirken, insan iskelet kası fosforilaz a'sı (molekül ağırlığı 500,000) 4 mol piridoksal fosfat içerir. Fosforilaz fosfataz enzimi, fosforilaz a'yı 2 molekül fosforilaz b'ye çevirir. Fosforilaz kinaz revers reaksiyonları katalizler. İnsan ve tavşan iskelet kası fosforilazları aynı görünmesine rağmen, tavşan kalp kasındaki fosforilasyon, tavşan iskelet kası fosforilazından farklılık göstermektedir. Fakat hepsi piridoksal fosfat içermektedir. İstakoz kası fosforilaz a ve b'nin molekül ağırlıkları aynı gibi görünmektedir.

Kas glikojen fosforilazları a ve b, saflaştırılmış ve kristalize edilmiştir. Ancak bunların, tipik piridoksal fosfat içeren enzim aktivitelerden tamamen yoksun olduğu bulunmuştur. İskelet kasının total fosforilaz aktivitesi, B₆ vitamin eksikliği olan sıçanlarda azalmıştır. Çalışmalar piridoksal fosfatın karaciğer fosforilazı için koenzim olamayacağını da göstermektedir.

*** Dehidrazlar:**

Dehidrazlar (deaminazlar) doğada geniş olarak bulunur. Bunlar, serin, treonin ve homoserin katabolizmasında önemlidir. Homoserin dehidraz, treonin dehidraz ve serin dehidrazın koenzim olarak piridoksal fosfata gereksinim duyduğu gösterilmiştir. Homoserin dehidraz, sıçan karaciğerinden kristal formda izole edilmiştir. Buna benzer olarak serin dehidraz, serini deamine eder ve serin ve homosisteinden sistayiyoninin sentezini sağlar. Treonin, O-fosfohomoserin, piridoksal fosfat bağımlı enzim treonin sentetazın etkisiyle biyosentezlenebilir. Treonin dehidraz, treonin allotreonin ve treonin aldolaz piridoksal fosfat gereksinim gösterir. Sonuçta, bu enzimlerin her biri için piridoksal fosfat koenzimdir.

*** Rasemazlar:**

Piridoksal fosfat bağımlı rasemazların mikroorganizmalarda varlığı, bu organizmaların D-aminoasitleri kullanması veya sentezlenmesine olanak sağlar. D-aminoasitler (D-glutamik asit, D-alanin ve D-aspartik asit)

çeşitli mikroorganizmaların kapsüller materyalinde oluşan normal hücresel bileşenlerdir. Oluşumları çeşitli rasemazların varlığıyla sağlanabilir. Bu rasemazların varlığı metiyonin veya D-alaninin formasyonuna olanak sağlar. İnsan ve diğer memelliler amino asitlerin D izomerlerini kullanabilir. Ancak, bu kullanım direkt rasemizasyon içermez. Rasemazlar memeli dokularda gösterilmemiştir.

*** Eritrosit Formasyonu:**

Deney hayvanları ve insanda B₆ vitamini eksikliğinin eritrosit formasyonuna etkilerine dair birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar, piridoksal fosfatın, porfirinin biyosentezine direkt olarak iştirak ettiğinin belirlenmesiyle de açıklığa kavuşmuştur. Piridoksal fosfat bağımlı enzim δ -aminolevulat sentetaz, glisin ve süksinatın, α -amino- β -ketoadipik aside dönüşümüne iştirak eder. Bu maddede bir karbondioksit kaybederek hemen δ -aminolevulinik aside döşür. Sonuç olarak, δ -aminolevulinik asit protoporfirin ve heme dönüşen porfobilinojen prekürsörü şeklinde etki göstermektedir. B₆ vitamininin protoporfirin biyosentezinde önemli rolü oynamasına benzer olarak, çok sayıda çeşitli bitki ve mikrobiyal klorofiller içeren diğer porfirinlerin formasyonunda da öneme sahiptir.

*** Hormon İlişkileri:**

B₆ vitamini eksikliğinin, büyüme hormon, gonadotropik hormonlar, adrenal, tiroid, insülin, gonadal hormonlar, nörohormonlar ve hipofiz gibi

çeşitli endokrin aktiviteler üzerinde etkiye sahip oldukları rapor edilmiştir. Nörohormonların ve katekolaminlerin (serotonin, histamin, δ -aminobütirik asit, adrenalin, noradrenalin, dopamin gibi) B₆ vitaminiyle ilişkileri olduğu da gösterilmiştir. Piridoksin eksikliği tiroid aktivitesinin azalmasıyla sonuçlanır. Ters olarak, tiroksin uygulamasının da çeşitli piridoksal fosfat bağımlı enzim sistemlerinin etkilerini azalttığı gösterilmiştir. B₆ vitamini streste, elektrolit dengesinde, enerji üretiminde ve su metabolizmasında görevlidir fakat bu mekanizmalar çok iyi anlaşılammıştır. B₆ vitamininin hormonlarla ilişkisine ait bulgular Hertz Morgan Meites ve Nelson ve Hsu tarafından derlenmiştir.

*** Lipid Metabolizması:**

B₆ vitamininin lipid metabolizmasında görev yaptığı bilinmektedir. B₆ vitamini eksikliğinin, plazma ve kırmızı kan hücrelerindeki etkilerine dair de çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar özellikle, piridoksinin, linoleattan arakidonik aside dönüşümdeki veya diğer lipid metabolizmalarındaki rollerini içermektedir. Ancak diğer çalışmalar, esansiyel yağ asitleri sentezinde veya benzer etkilerde piridoksinin rolünün kanıtlanmasında yetersiz kalmışlardır. Eldeki kanıtların birçoğu B₆ vitamininin, hormonlara aracılık edebildiğini veya protein ve karbonhidrat metabolizmasında değişiklik oluşturabildiğini ve yağ metabolizmasında sekonder bir etki oluşturduğunu göstermektedir.

*** Aminoasit Absorbsiyonu ve Transportu:**

Birçok çalışmada B₆ vitamininin aminoasit absorpsiyonu ve transportundaki olası fonksiyonları araştırılmıştır. Buna dair kanıtlar elde edilebilmiş olmasına rağmen piridoksal fosfatla ilgili spesifik enzim sistemleri gösterilebilmiş değildir.

*** Diş Çürümeleri:**

Diş çürümeleri üzerine B vitaminlerinin etkileri çalışılmış ve insanda B vitamini uygulamaları ile diş çürümesi insidansında azalma bildirilmiştir.

*** Oksalüri:**

İnsanda ve deney hayvanlarında, piridoksin eksikliğinde oksalüre görülmüştür. Piridoksin uygulaması üriner oksalik asit düzeyini azaltmıştır. İnsan ve hayvanlarda üriner oksalik asit, askorbik asit, glisin, serin, alanin ve diğer bileşiklerin metabolizmasından endojen olarak tüketilmiştir. Normalde bu bileşikler düşük oksalat formasyonunu yükselten yollarla metabolize edilmiştir⁹.

II.3.4. Farmakoloji ve Toksikolojisi:

II.3.4.1. Genel:

Piridoksin, Piridoksal ve Piridoksamin gastrointestinal kanaldan absorbe olur ve hızla metabolize edilir. B₆ vitamini dokularda Piridoksal ve

Piridoksamının primer 5-fosforilli türevleri şeklinde geniş oranda dağılır. Piridoksinin idrarla değişmeden atılım yüzde oranı anlamlı bir varyasyon göstermektedir. Bu oran vitaminin yüksek dozlarıyla artmaktadır. Sığıçanda piridoksin uygulanmasının (57-80mg) idrarda değişmemiş olarak atılımı %50-70 olarak saptanmıştır. Köpekte test edilen dozlarının ancak % 20si (25-500mg) idrarda piridoksin şeklinde atılmıştır. İnsanda piridoksin ter veya feçesle önemsiz miktarı atılmaktadır. Büyük dozda piridoksin alınımı piridoksal veya piridoksamının atılımında artışına yol açar, fakat piridoksal veya piridoksamının, piridoksine dönüşümünü gösteren bir kanıt yoktur. Hayvanlarda B₆ vitamininin bilinen atılım metaboliti sadece 4-piridoksik asittir. Bu bileşiğin oluşumunu azaltan yolak B₆ koenziminin hidroliziyle serbest vitaminlere dönüşümdür. Sonraki nonspesifik aldehit oksidazla oksitlenerek 4-piridoksik asite çevrilir. Bu metabolitlerin köpek idrarında görülmediği rapor edilmiştir, fakat insanda B₆ vitamininin üç formunun alınımından sonra % 70-90 atıldığı saptanmıştır. 4-piridoksik asitin veya B₆ vitamininin idrardaki değişmemiş biçimlerinin miktarı diğer metabolik yolakların olasılığı ileri sürülerek verilen dozun % 31-70 kadarını kapsamaktadır. Tritium işaretli piridoksinin insana veya sığıçana belirli dozlarla uygulanması metabolit radyoaktif materyalin önemli miktarlarının idrarda izlenmesini sağlamıştır.

Piridoksinin farmakodinamik etkileri azdır ve insanda yokluğu gösterilmiştir. Piridoksinin normal hayvanların sıvı dengesine, oksijen

tüketimine, kardiyovasküler dinamiğe veya beyne etkisi yoktur. Levine ve arkadaşları, izole tavşan atriumunda piridoksinin kronotropik ve inotropik etkilerini göstermişlerdir.

Bu bulgular, dokuların potasyum ve sodyum içeriğindeki değişikliklere, B6'nın iyon transportu sağlayarak iştirak ettiği biçiminde yorumlanmıştır.. Piridoksinin intrasisternal injeksiyonu kedilerde santral anasljezik etki ve sedasyon oluşturmuştur.

Piridoksinin toksisitesi oldukça düşüktür. 1g/kg'a kadar dozlar sıçanlarda, tavşanlarda ve köpeklerde tolere edilebilmiştir. Piridoksin hidroklorürün medyan letal dozları hayvanlarda aşağıdaki şekilde tayin edilmiştir:

Fareye (545-600mg/kg), kediye (560mg/kg) ve sıçanlara (530-657mg/kg) intravenöz injeksiyon, sıçana (3.0-3.7g/kg) ve fareye (2.45g/kg) oral uygulama tonik konvülsiyonlar; sonrasında, fare ve sıçanda ölüm oluşturmuştur. 1g/kg'dan büyük dozlar sıçan, tavşan ve köpeklere uygulanmıştır. Her türde de motor koordinasyon ve 2-3 gün içinde righting refleksi bozukluğu ile başlayan şiddetli tonik konvülsiyon gelişimi ve paralizi ile, ölüm gibi spesifik karakteristik belirtilere sebep olmuştur. Otopsiler adrenal kortekste meydana gelen hemorajilerle adrenal büyüme olduğunu göstermiştir. 2-6g/kg piridoksin uygulanmış köpek ve sıçanların nörohistolojik incelenmesinde omurilik posterior kolonu ve bazı

durumlarda posterior kök, posterior ganglion ve periferik sinirlerde dejenerasyon ortaya çıkarmıştır. Piridoksinin sıçanlara (25mg/kg) köpeklere (20mg/kg) ve maymunlara uzatılmış günlük uygulanması dokulardaki toksik veya patolojik değişikliklere sebep olmuştur.

Fareler tekrarlı 100mg/kg intravenöz injeksiyonları tolere etmiştir. İnsanda, toksik etkiler piridoksinin aylık periyotlar temelindeki günlük uygulamalar biçiminde incelenmiştir. Ters etkiler, piridoksin uygulanmış ensefalitli iki hastada gözlenmiştir. Bir hastada şiddetli tutarık bozukluğu oluşmuş ve ensefalografik bozulma gözlenmiştir.

Piridoksaminin de toksisitesi de düşüktür. 320mg/kg intraperitoneal injeksiyonlar farede toksik etkiler oluşturmuştur. Piridoksaminin, sıçanda, farede ve kedide tayin edilen medyan letal dozları, oral, subkütan veya intravenöz uygulandığında piridoksine benzerdir. Piridoksal, piridoksin veya piridoksamin kadar toksiktir.

Piridoksinin çeşitli türevleri antivitamin aktivite göstermektedirler ve 4-deoksi-piridoksinin piliçte, sıçanda ve insanda toksik olduğu gösterilmiştir.

Toksisite B₆ vitamini eksikliğinde artar. Bu analog apoenzim, piridoksal fosfatın bağlanma yerleri kompetitif inhibitörü olan deoksi-piridoksin fosfata dönüştürür. Daha az miktar 4-deoksi-piridoksin piridoksinin ve piridoksalın fosforilasyonunu fosfokinazla inhibe eder.

Sıçandaki konvülziyonlar, toksopirimidin ve 2'-metilpiridoksin injeksiyonuyla oluşturulmuştur. Bu bileşiklerin fonksiyonu, B₆ vitamin antagonisti gibidir ve etkiler piridoksinle ortadan kaldırılabilir.

B₆ vitamini Parkinson sendromu tedavisinde de başarıyla kullanılmıştır. Bu terapötik etki hastaların bazal gangliyonunda dopamin içeriğinde dikkate değer azalmayla ilişkilidir. Piridoksin hayvanlarda ve insanda yüksek radyasyon dozlarına karşı koruyucu etki göstermiştir. Mide bulantısı ve kusmaya bağlı radyasyon üzerindeki supresif etkisi bilinmektedir. B₆ vitamini çocuklardaki diş çürümelerini önlemek için de tavsiye edilir⁹.

III. MATERYAL VE YÖNTEM:

III.1 MATERYAL:

Kullanılan Deney Hayvanları:

Deneylerde kullanılan 16-24 gram ağırlığındaki her iki cinsten albino fareler serum çiftliğinden sağlanmıştır.

Kullanılan kimyasal maddeler:

p-Benzokinon (p-BK)	(I. C. I.)
Morfin HCl	(TMO-İstanbul)
Piridoksin HCl	(AKPA)
L-arjinin	(Sigma)
L- N ^G -nitro-arjinin metil esteri (L-NAME)	(Sigma)
Metilen mavisi (MB-1)	(Sigma)

III.2 YÖNTEM

Kıvrınma Aljezi Modeli:

Analjezik aktivite tayininde, p-Benzokinon (p-BK) tarafından oluşturulan kıvrınma (Writhing) testi kullanılmıştır. Farelerde aljezi oluşturmak amacıyla p-BK, serum fizyolojik içinde 0.2 mg/ml olacak şekilde çözülerek 0.25 cc hacminde intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmıştır. Kontrol grubuna p-BK uygulamasından 15 dakika önce 0.05 cc serum fizyolojik uygulanmıştır. Deney gruplarına ise

p-BK injeksiyonundan önce yapılan tek veya kombinasyon uygulamaları ile dozlar aşağıdaki protokol uyarınca subkütan olarak yapılmıştır.

Tek Doz uygulamalar:

Uygulamadan 15' önce: Morfin HCl (0.13 mg/kg), Piridoksin HCl (0.43 mg/kg), L-Arjinin (0.32, 5, 50 mg/kg), L-NAME (75 mg/kg), Metilen mavisi (5, 40 mg/kg)

Kombinasyon uygulamaları:

L-Arjinin + Piridoksin (0.32, 5 ve 50 + 0.43 mg/ kg)

L-NAME + Piridoksin (75 + 0.43 mg/ kg)

MM + Piridoksin (5 ve 40 + 0.43 mg/kg)

Kombinasyon uygulamalarında da maddelerin verilış zaman sırası, tek uygulamalardaki biçimde yapılmıştır.

p-BK, hazırlanışını takiben renkli şişede saklanmış ve haftalık olarak yenilenmiştir. Diğer maddelere ilişkin dilüsyonlar da stok çözeltilerden, günlük olarak fizyolojik tuz çözeltilisinde çözüme suretiyle hazırlanmıştır.

p-BK injeksiyonundan sonra 30 dakika süreyle hayvanlar gözlenmiş ve kıvranma sayıları kaydedilmiştir. Kıvranma sayıları için farelerde gözlemlenen başlıca davranış karakteristikleri şunlardır:

- i) Hayvanın bedenini gererek karını konkavlaştırması,
- ii) Konkav karınla bir tarafa bükülmesi,
- iii) Arka ayaklarda tek veya her iki taraflı tonik ve/ veya klonik gerimle sürüklenme ve toplanma

Bu karakteristiklerin tümünün veya karakteristiklerden herhangi bir tanesinin görülmesi, skorlamada bir '+' değer olarak kabul edilmiştir.

Kıvrınma sayısı üzerinde test maddelerinin gösterdiği inhibitör etki, % koruma veya % antinosiseptif aktivite olarak değerlendirilmiş ve bu '%' değer, aşağıdaki formül uyarınca hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Antinosiseptif aktivite } (\% \text{ Koruma}) = 100 - (D / K \times 100)$$

D: İlaç uygulamasından sonra kıvrınma sayısında gözlenen değişiklik

K: Tek başına p-BK uygulamasından sonra elde edilen ortalama kıvrınma sayısı

İstatistiksel Analiz

a) Kontrol ve deney gruplarında gözlenen kıvrınma sayısı, ortalama \pm ortalamaların standart hatalarının ortalaması şeklinde ifade edilmiştir.

b) Piridoksin ED₅₀ değeri ve bunun güven sınırları probit regresyon ile hesaplanmıştır.

c) Kıvrınma sayılarının % antinosiseptif aktivite olarak hesaplanmasında her bir bireysel hayvan değeri, ortalama kontrol değerine bölünerek hesaplanmış ve sonuçta % koruma değerleri dağılımın yaygınlık ölçüsü olarak, ortalamaların standart hatası cinsinden de ifade edilebilmiştir.

d) Açısal (\arcsin, \sin^{-1}) transformasyon: % Antinosiseptif aktivite için hesaplanan % değerler daha sonra ARCSIN (açısal) transformasyona tabi

tutulmuştur. Nedeni aşağıda anlatılmıştır. Arcsin transformasyon uygulama nedeni:

* İstatistiksel teori açısından '%' değerler veya orantılar normal dağılımdan ziyade binomiyal dağılım özelliği gösterirler.

* Özellikle yüzdelerik değerlerin alt ve üst sınırlarında (% 0-30 ve % 70-100) normaliteden büyük ölçüde sapış bulunur.

* Fakat her yüzdelerik veya orantı değerinin kare kökü **ARCSIN** değerine (**Sinusu \sqrt{x} olan açı**) transforme edilirse her bir veri normale yakın bir dağılım gösterme özelliğine kavuşur.

* Parametrik testlerin (varyans analizi, student t testi) uygulamasında veriler açısından yerine getirilmesi gereken temel koşullar şunlardır:

i) Her bir gruptaki verilerin rastgele olarak normal dağılımdan çekilmiş olma koşulu,

ii) Örnek populasyonların eşit varyanslara sahip olma koşulu (Homoskadasite)

iii) Faktör düzeyleri etkilerinin additif olma koşulu (Lineerite)

* Sonuçta yukarda anlatılan koşulların yerine gelmesi, yani dağılımın normalize edilmesi çerçevesinde parametrik testlerin uygulanabilirliğinin ortaya çıkışı sağlanmış olur.

* Açısal transformasyonun yerine getirilmesi için her bir % antinosiseptif aktivite değerine uygulanan formül şudur:

$$X = \arcsin \sqrt{X}$$

e) Gerek kıvrınma sayıları ve gerekse % antinosiseptif aktivite değerlerinin istatistiksel anlamlılık testleri için tek yönlü ANOVA uygulanmıştır.

i) Varyans analizinde kontrol grubu ile gruplar arasında farklılık olduğunda (kıvrınma sayılarının karşılaştırılması) grupların ikişerli karşılaştırılması için Duncan) çoklu sınır testi kullanılmıştır.

ii) Varyans analizinde gruplar arasında farklılık olduğunda (% antinosiseptif aktivitelerin karşılaştırılması) grupların ikişerli karşılaştırılmasında Newman Keuls veya Benferroni testleri kullanılmıştır.

f) Tek yönlü varyans analizleri gerek PCS- V4.1 (Tallarida & Murray, 1991) ve Graphpard Instat V1. 13(1980) paket programları ile yanısıra, Newman Keuls Duncan testleri PCS- V4. 1, Benferroni testi ise Graphpard Instat programları yardımıyla çözümlenmiştir.

IV. BULGULAR

- Bu çalışmada farelerde para-benzokinon (p-BK) ile oluşturulan kimyasal aljezi modelinde piridoksinin (Vitamin B₆) oluşturduğu antinosiseptif etkide L-arjinin: NO yolunun katkısı araştırılmıştır. Piridoksinin etkisi morfin, L-NAME, L-arjinin ve metilen mavisi ile etkileşimleri düzeyinde incelenmiştir. Tablo 2. toplu değerleri göstermektedir.

- Farelerde p-BK injeksiyonundan sonra elde edilen ortalama kıvranma sayısı kontrol grubu için 42.75 ± 2.1 (n=20) olarak bulunmuştur. Kontrol grubuna p-BK injeksiyonundan 30 dakika önce 0.5 cc subkütan serum fizyolojik injeksiyonu yapılmıştır.

- Bu araştırmada laboratuvarımızda daha önce yapılan tez ve araştırmalarda saptanmış olan morfin ED₅₀ değeri [0.13(0.08-0.2) mg/kg] bu çalışma için de esas alınmıştır. Piridoksin, L-NAME, L-arjinin ve metilen mavisi için doz-cevap eğrileri çalışılmış ED₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

IV.1. Uygulanan Maddelerin Doz-cevap Eğri Analizleri

IV.1.1) Piridoksin

Farelerde p-BK ağrı uyararı olarak kullanılmış ve kontrol kıvranma sayısı 42.75 ± 2.1 (n=20) olarak saptanmıştır. Piridoksin farelere sırasıyla 0.0625, 0.250, 0.5 ve 1 mg/kg dozlarda sk olarak verilmiştir. Tüm doz düzeylerinde (n=10) hayvana uygulama yapılmıştır.

Farelerde sırasıyla elde edilen kıvranma sayıları ve % antinosiseptif aktiviteler toplu olarak Tablo 3'de ve şekil 4'de gösterilmiştir. Piridoksin için 0.0625-1.00mg/kg dozlar arasında elde edilen doz-cevap eğrisi probit regresyonla analiz edildiğinde ED₅₀değeri 0.43 (0.19 - 0.93) mg/kg olarak hesaplanmıştır. ED₅₀ değeri olan 0.43 mg/kg'lık uygulama yapılan grupta kıvranma sayısı 19.7±2.62 (n=10) ve % antinosiseptif aktivite de 47.74±3.86 olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan piridoksinin antinosiseptif aktivite potansi morfinle karşılaştırıldığından morfenden 4.22 kez daha az potent olduğu hesaplanmıştır.

IV. I. 2) L-Arjinin

Farelerde p-BK aljezik uyaran olarak kullanılmış ve kontrol kıvranma sayısı 42.75±2.1 (n=20) olarak saptanmıştır. NO donörü olan L-arjinin doz-cevap eğrisi için sırasıyla 0.125 (n=20), 0.25 (n=10), 0.5 (n=15), 1.0 (n=10), 5.0 (n=10), 10 (n=20), 20 (n=15) ve 40.0 (n=10) dozlarda farelere uygulama yapılmıştır. Sonuçlar toplu olarak Tablo 4 ve şekil 5 de gösterilmiştir. Uygulanan doz aralıklarında L-arjinine ilişkin iki farklı etki kalıbı görülmüş olup 0.125-5.0 mg/kg arası dozlarda farelerde antinosisepsiyon oluşurken 10.0-40.0 mg/kg arası dozlarda nosisepsiyon gözlenmiştir. Antinosisepsiyonun gözlendiği doz aralıklarında 0.125-0.25 mg/kg dozlar için % analjezik aktivite bakımından benzer değerler (% 37.64-39.89, p<0.05) elde edilmiştir. Diğer yandan 10-40 mg/kg'lık L-arjinin uygulaması yapılan doz aralıklarında sırasıyla -5.10±9.86, -25.33±9.89 ve -36.52±12.74'lük aljezi potansiyalizasyonu görülmüştür. Bu potansiyalizasyonlara ilişkin kıvranma sayıları da sırasıyla 45.3, 55.06 ve 61.2

olup bunlar p-BK kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında $p < 0.05$ istatistiksel anlamsızdır. Bu cevaplara bakıldığında L-arjinin için literatürde de belirtildiği üzere dual bir etki kalıbının bulunduğu görülmektedir.

Diğer taraftan daha önce yapılan tez çalışmalarında L-arjinin için 50 mg/kg dozda $\% 36.8 \pm 7.7$ ($n=13$) analjezik aktivite hesaplanmıştır. Bu çalışmada da 50 mg/kg'lık doz çalışılmış ve ilginç olarak L-arjinin için yine analjezik aktivite gözlenmiştir. Bu değer $\% 17.0 \pm 4.29$ ($n=15$) dur. Bunun dışında herhangi başka bir doz düzeyi çalışılmamıştır.

IV. I. 3) L-N^G-Nitro-Arjinin Metil Esteri (L-NAME)

Aljezik uyaran olarak p-BK farelerde 42.75 ± 2.1 ($n=20$) kontrol kıvranma sayısı oluşturmuştur. Bir nitrik oksit sentaz inhibitörü olan L-NAME farelere 18.75 ($n=10$), 37.5 ($n=10$), 75.0 ($n=10$) ve 150 ($n=5$) mg/kg dozlarda uygulanmış ve sırasıyla $\% 35.97 \pm 6.76$, $\% 38.11 \pm 4.62$, $\% 33.28 \pm 6.46$ ve $\% 79.65 \pm 4.61$ antinosisepsiyon oluşturmuştur. İlk üç doz arasında doz bağımlı herhangi bir istatistiksel fark görülmemiştir. Daha önceki çalışmalarda kullanılan 75 mg/kg'lık doz düzeyi bu çalışmada da kombinasyon dozu olarak kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 5 ve şekil 6'da gösterilmiştir.

IV.i. 4) Metilen mavisi (MM)

Farelerde p-BK ile indüklenen aljezi için 42.75 ± 2.1 ($n=20$) kontrol kıvranma sayısı gözlenmiştir. Metilen mavisi birincil olarak guanilat siklaz inhibitörü (GS-I) etkisinin yanısıra ikincil olarak nitrik oksit sentaz inhibisyonu da

oluşturmaktadır. Bu madde farelere her grupta 10 hayvan olacak şekilde 6 farklı dozda uygulanmıştır. Doz düzeyleri sırasıyla 5, 10, 20, 40, 80 ve 160 mg/kg olarak seçilmiştir. 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarda antinosiseptif aktivite sırasıyla % 76.52 ± 4.87 , 51.00 ± 3.59 ve 26.29 ± 10.28 olarak saptanmıştır. Buradaki ilginç gözlem doz bağımlı antinosiseptif aktivitede azalmadır. 40 mg/kg dozda daha önceki çalışmalarda da gözlenen ve p-BK kıvranma sayısı ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı olan aljezi potansiyalizasyonu saptanmıştır. Bu değer % 35.82 ± 7.36 'dır. Metilen mavisi için 80 ve 160 mg/kg dozlarda ise sırasıyla % 33.84 ± 8.09 ve % 87.5 ± 1.66 'lık antinosisepsiyon gözlenmiştir. Bu bulgular metilen mavisi için de bir dual etkinliğin bulunduğunu telkin etmektedir. Toplu sonuçlar Tablo 6 ve şekil 7 'de gösterilmiştir.

IV. II. Kombinasyon Grupları Arası % Antinosiseptif Aktivite Bakımından Etkileşmeler

Kontrol p-BK grubunun oluşturduğu kıvranma sayısına oranlanarak hesaplanan % antinosiseptif aktiviteler ile bunların normal dağılıma uygunluğunu sağlamak için yapılan arcsin (\sin^{-1}) transformasyonunda hesaplanan değerler toplu olarak tablo 3'de gösterilmiştir.

Gruplar arasındaki % antinosiseptif aktivite bakımından fark üç alt grup temelinde incelenmiştir. Bunlar NO prekürsörü olan L-Arjinin nitrik oksit sentaz inhibitörü olan L-N^G-nitro-arjinin metil ester (L-NAME) ve guanilat siklaz nitrik oksit sentaz inhibitörü olan metilen mavisi (MM)'dir. Bu maddelerin piridoksinle olan kombinasyonları değerlerinin piridoksinin tek başına oluşturduğu antinosiseptif aktivite değerinden farkları karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalarda

% antinosisseptif aktivite değeri olarak arcsin transformasyon değeri alınmıştır. Bunlara ilişkin veriler tablo ve şekillerde gösterilmiştir.

IV. 2.1) L-Arjinin kombinasyonu ile yapılan karşılaştırmalar

L-Arjinin doz-cevap eğrileri incelendiğinde 0.125-5.0 mg/kg arasında bir antinosisseptif aktivite gözlenmiştir. Bu aralıktan 0.32 ve 5 mg/kglık doz düzeyleri seçildiğinde sırasıyla % 60.47±1.49 ve %61.77±17.82'lik kıvranma inhibisyonu gözlenmiştir. Bu değerler arası fark $p<0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamsızdır. Aynı doz düzeylerindeki L-arjinin 0.43 mg/kglık piridoksin ile kombine olarak uygulandığında (n=10) elde edilen değerler sırasıyla % 54.18±2.66 ve % 66.22±1.78 bulunmuş ve bu değerlerin tek başına L-arjinin değerlerinden $p<0.05$ istatistiksel anlamlı bir fark göstermediği de hesaplanmıştır. L-arjininin 50 mg/kglık tek başına olan dozu farelerde % 17.0±4.29'lük antinosisepsiyon sağlarken 0.43 mg piridoksin ile kombine dozu bu aktiviteyi % 37.65±1.63'e yükseltmiştir. Bu da piridoksinin L-arjinin etkisini 2.2 kez daha potansiyalize ettiğini göstermekte ve bu artışın $p<0.01$ düzeyinde istatistiksel anlamlı olduğu hesaplanmaktadır. Aynı kombinasyona ilişkin aktivite düzeyi piridoksinin tek başına oluşturduğu % 47.74±3.86'lık antinosisepsiyon düzeyi ile karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel bir anlam içermediği görülmektedir. Diğer yandan L-arjinin 40 mg/kglık doz tek başına % -35.52±12.74'lük bir nosiseptif potansiyalizasyon oluştururken 0.43 mg/kg'lık piridoksin ile bu doz düzeyi kombine edildiğinde $p<0.01$ düzeyinde istatistiksel anlamlı olan bir tersine dönüş oluşmakta vitamin B₆ aljeziyi inhibe edip aktivite profilini % 4.1±9.32'lik bir antinosisepsiyona çevirmektedir. Bu da L-arjininin

oluşturduğu aktiviteye vitamin B₆'nın katıldığını kanıtlamaktadır. Sonuçlar Tablo 7 ve şekil 8'de gösterilmektedir.

IV.2.2) L-NAME kombinasyonu ile yapılan karşılaştırmalar

L-NAME 18.75, 37.5 ve 75 mg/kg'lık dozlarda sırasıyla % 25.97±6.76, 38.11±4.62 ve 33.28±6.46'lık antinosisepsiyon oluşturmuştur. Cevapların doz bağımlı olmaması nedeniyle daha önceki çalışmalarda kullanılan 75 mg/kg'lık doz düzeyi piridoksinle kombine edilerek denenmiştir. Piridoksin tek başına % 47.74±3.86'lık bir antinosisepatif aktivite oluştururken 75 mg/kg'lık L-NAME ile kombine edildiğinde bu aktivite % 63.66±1.1'e yükselmekte ve diğer bir ifadeyle 1.33 kez daha potansiyalizde olmaktadır. Bu artış p< 0.05 istatistiksel anlamlı olup L-NAME'in vitamin B₆ aktivitesini artırıcı yönde etkidiğini göstermektedir. Sonuçlar Tablo 8 ve şekil 9'da gösterilmektedir.

IV.2. 3) Metilen mavisi (MM) kombinasyonu ile yapılan çalışmalar

Metilen mavisi 5, 10 ve 20mg/kg'lık dozlarda sırasıyla %76.52±4.87, 51.0±3.59 ve 26.29±10.28'lik antinosisepatif aktivite oluşturmaktadır. 40mg/kg'lık dozda ise antinosisepsiyon % -35.82±7.36'lık bir nosisepsiyona dönüşmektedir. Bu etkiler artan dozlarda guanil siklazın inhibe olduğunu ve buna nitrik oksit sentazın inhibisyonunun da iştirak etmesiyle aktivite kalıbının nosisepsiyona dönüştüğü izlenimini vermektedir. 80 ve 160 mg/kg'lık dozlarda tekrar ortaya çıkan antinosisepatif aktivitenin L-arjinin: NO kaskadından bağımsız başka bir yolla oluştuğunu speküle etmek olasıdır. Piridoksin ile yapılan kombinasyonlarda 5 ve 40 mg/kg'lık metilen mavisi dozları için elde edilen nosisepsiyon, sırasıyla % 60.43±2.5 ve % 39.44±2.22'dir. 5 mg'lık metilen mavisi ve piridoksin için elde

edilen yanıt piridoksinin tek başına oluşturduğu yanıtla (% 47.74±3.86) karşılaştırıldığında fark istatistiksel anlam içermemekle birlikte piridoksin ve 40 mg/kg'lık metilen mavisi cevabında aktivite nosisepsiyondan antinosisepsiyona $p<0.001$ düzeyinde anlamlı olarak dönüşmüştür. Bu da piridoksinin L-Arjinin: NO kaskadındaki enzim aktivitelerine katkı oluşturduğunu göstermektedir. Sonuçlar Tablo 9 ve şekil 10'da gösterilmektedir.

TABLO 2. Farede p-BK ile İndüklenen Kıvrınma Aljezi Modelinde Piridoksinin Oluşturduğu Antinosiseptif Aktivitenin Morfin, L-Arjinin, L-NAME ve Metilen Mavisi ile Etkileşmeleri

	n ²⁾	Kıvrınma sayıları	% Antinosiseptif Aktivite ³⁾
p-BK (Kontrol)	20	42.75±2.10 ¹⁾	-
Piridoksin (0.43 mg/kg)	10	19.70 ±2.62	47.74 ±3.86
Morfin (0.13 mg/kg)	20	17.95 ±1.40	49.80± 1.94
L-Arjinin (50 mg/kg)	15	36.86 ±1.70	17.00± 4.29
L-NAME (75 mg/kg)	10	28.10± 3.96	33.28 ±6.46
MM (5mg/kg)	10	4.40±2.31	76.52±4.87
MM (40 mg/kg)	10	53.10±6.08	-35.82±7.36
Piridoksin + Morfin (0.13mg/kg)	10	5.70±0.91	69.12±1.79
Piridoksin + L-Arjinin (50 mg/kg)	10	26.70±1.15	37.65±1.63
Piridoksin + L-NAME (75 mg/kg)	10	8.50±0.65	63.66±1.10
Piridoksin + MM (5 mg/ kg)	10	10.80±1.48	60.43±2.50
Piridoksin + MM (40 mg/ kg)	10	25.40±1.61	39.44±2.22

¹⁾Ortalama ± ortalamaların standart hatası (X± OSH), ²⁾ denek sayısı, ³⁾ % antinosiseptif aktivite açısız (arcsin) transformasyon değerleri,

Tablo 3. Farede p-BK ile İndüklenen Abdominal Konstriksiyonda Piridoksin'in Antinosiseptif Aktivite Doz-Cevap Eğrisi

Piridoksin (mg/kg)	n	Kıvrınma Sayısı	% Antinosiseptif Aktivite
0.0625	10	36.00±1.71 ¹⁾	19.34±5.10
0.125	10	33.80±2.15	24.13±4.70
0.250	10	24.70±2.76	39.83±4.16
0.500	10	17.80±2.74	50.46±4.03
1.000	10	6.10±1.21	68.79±2.43
0.43 (ED ₅₀)	10	19.70±2.62	47.74±3.86

n: Deney hayvanı sayısı , 1) Ortalama (\bar{x})± Ortalamanın Standart Hatası (OSH)

Tablo 4. Farede p-BK ile İndüklenen Abdominal Konstriksiyonda L-Arjinin Antinosiseptif Aktivite Doz-Cevap Eğrisi

L-Arg Doz (mg/kg)	n	Kıvrınma Sayısı	% Antinosiseptif Aktivite
0.125	10	26.20±4.07 ¹⁾	37.64±4.28
0.250	10	25.00±2.70	39.89±2.74
0.500	15	14.06±3.12	58.04±5.41
1.000	15	14.40±2.84	57.48±4.95
5.000	10	12.90±4.19	61.77±7.82
10.000	20	45.30±4.77	-5.10±9.86
20.000	15	55.06±4.53	-25.33±9.89
40.000	10	61.20±6.30	-36.52±12.74
0.320	10	10.50±0.98	60.47±1.49
50.000	15	36.86±1.70	17.00±4.29

n: Deney hayvanı sayısı , 1) Ortalama (\bar{x})± Ortalamanın Standart Hatası (OSH)

Tablo 5. Farede p-BK ile İndüklenen Abdominal Konstriksiyonda L-NAME Antinosiseptif Aktivite Doz-Cevap Eğrisi

L-NAME Doz (mg/kg)	n	Kıvrınma Sayısı	%Antinosiseptif Aktivite
18.75	10	26.0±3.47 ¹⁾	35.97±6.76
37.50	10	26.7±2.93	38.11±4.62
75.00	10	28.1±3.96	33.28±6.46
150.00	5	2.4±1.28	79.65±4.61

n: Deney hayvanı sayısı, 1) Ortalama (\bar{x})± Ortalamanın Standart Hatası (OSH)

Tablo 6. Farede p-BK ile İndüklenen Abdominal Konstriksiyonda Metilen Mavisı (MM) Antinosiseptif Aktivite Doz-Cevap Eğrisi

Metilen mavisı Doz (mg/kg)	n	Kıvrınma Sayısı	% Antinosiseptif Aktivite
5	10	4.4±2.31 ¹⁾	76.52±4.87
10	10	17.0±2.45	51.00±3.59
20	10	29.8±4.66	26.29±10.28
40	10	53.1±6.08	-35.82±7.36
80	10	24.9±3.79	33.84±8.09
160	10	0.4±0.26	87.50±1.66

n: Deney hayvanı sayısı, 1) Ortalama (\bar{x})± Ortalamanın Standart Hatası (OSH)

Tablo 7. Farede p-BK ile İndüklenen Abdominal Konstriksiyonda Piridoksin ve L-Arjinin'in Antinosiseptif Aktivite Oluşturan Tek ve Kombine Cevapları

Doz:mg/kg	n	Kıvrınma Sayısı	% Antinosiseptif Aktivite
p-BK (Kontrol)	20	42.75±2.10 ¹⁾	
Piridoksin (0.43)	10	19.70±2.62	47.74±3.86 [□]
L-Arjinin (0.32)	10	10.50±0.98	60.47±1.49*
L-Arjinin (5.00)	10	12.90±4.19	61.77±7.82 ⁺
L-Arjinin (50.00)	15	36.86±1.70	17.00±4.29 [°]
Piridoksin + L-Arj (0.32)	10	14.50±1.66	54.18±2.66*
Piridoksin + L-Arj (5.00)	10	7.20±0.94	66.22±1.78 ⁺
Piridoksin + L-Arj (50.00)	10	26.70±1.15	37.65±1.63 ^{°□}

n: Deney hayvanı sayısı , * p< 0.05 istatistiksel anlamlı. 1) Ortalama (\bar{x})± Ortalamanın Standart Hatası (OSH)

Tablo 8. Farede p-BK ile İndüklenen Abdominal Konstriksiyonda Piridoksin ve L-NAME'in Antinosiseptif Aktivite Oluşturan Tek ve Kombine Cevapları

mg/kg	n	Kıvrınma Sayısı	% Antinosiseptif Aktivite
p-BK (Kontrol)	20	42.75±2.10 ¹⁾	
Piridoksin (0.43)	10	19.70±2.62	47.75±3.86*
L-NAME (75.0)	10	28.10±3.96	33.28±6.46 ⁺
Piridoksin - L-NAME (75)	10	8.50±0.65	63.66±1.10 ^{*+}

n: Deney hayvanı sayısı , * p< 0.05 istatistiksel anlamlı. 1) Ortalama (\bar{x})± Ortalamanın Standart Hatası (OSH)

Tablo 9. Farede p-BK ile İndüklenen Abdominal Konstriksiyonda Piridoksin ve Metilen Mavisi'nin Antinosisseptif Aktivite Oluşturan Tek ve Kombine Cevapları

Doz:mg/kg	n	Kıvrınma Sayısı	%Antinosisseptif Aktivite
p-BK (Kontrol)	20	42.75±2.10 ¹⁾	
Piridoksin (0.43)	10	19.70±2.62	47.74±3.86*
Metilen mavisi (5)	10	4.40±2.31	76.52±4.87*
Metilen mavisi (40)	10	53.10±6.08	-35.82±7.36*
Piridoksin + Metilen mavisi (5)	10	10.80±1.48	60.43±2.50
Piridoksin + Metilen mavisi (40)	10	25.40±1.61	39.44±2.22*

n: Deney hayvanı sayısı , * p< 0.05 istatistiksel anlamlı. 1) Ortalama (\bar{x})± Ortalamanın Standart Hatası (OSH)

Nosisepsiyona Dönüş:

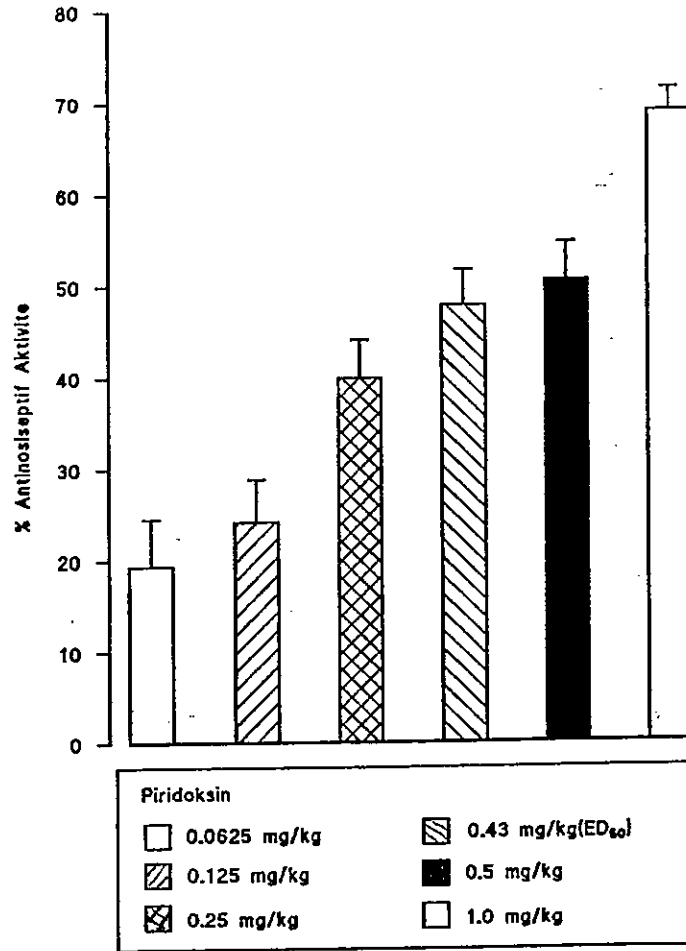
Bu etkiler, artan dozlarda, guanil siklazın inhibe olduğunu ve buna nosisepsiyon inhibisyonunun da iştirak etmesiyle aktivite kalıbının nosisepsiyona dönüştüğü izlenimini vermektedir.

80 mg/kg-160 mg/kg dozlardaki antinosisepsiyon, L-Arginin : NO kaskadından başka bir yolla oluşmuş olabilir.

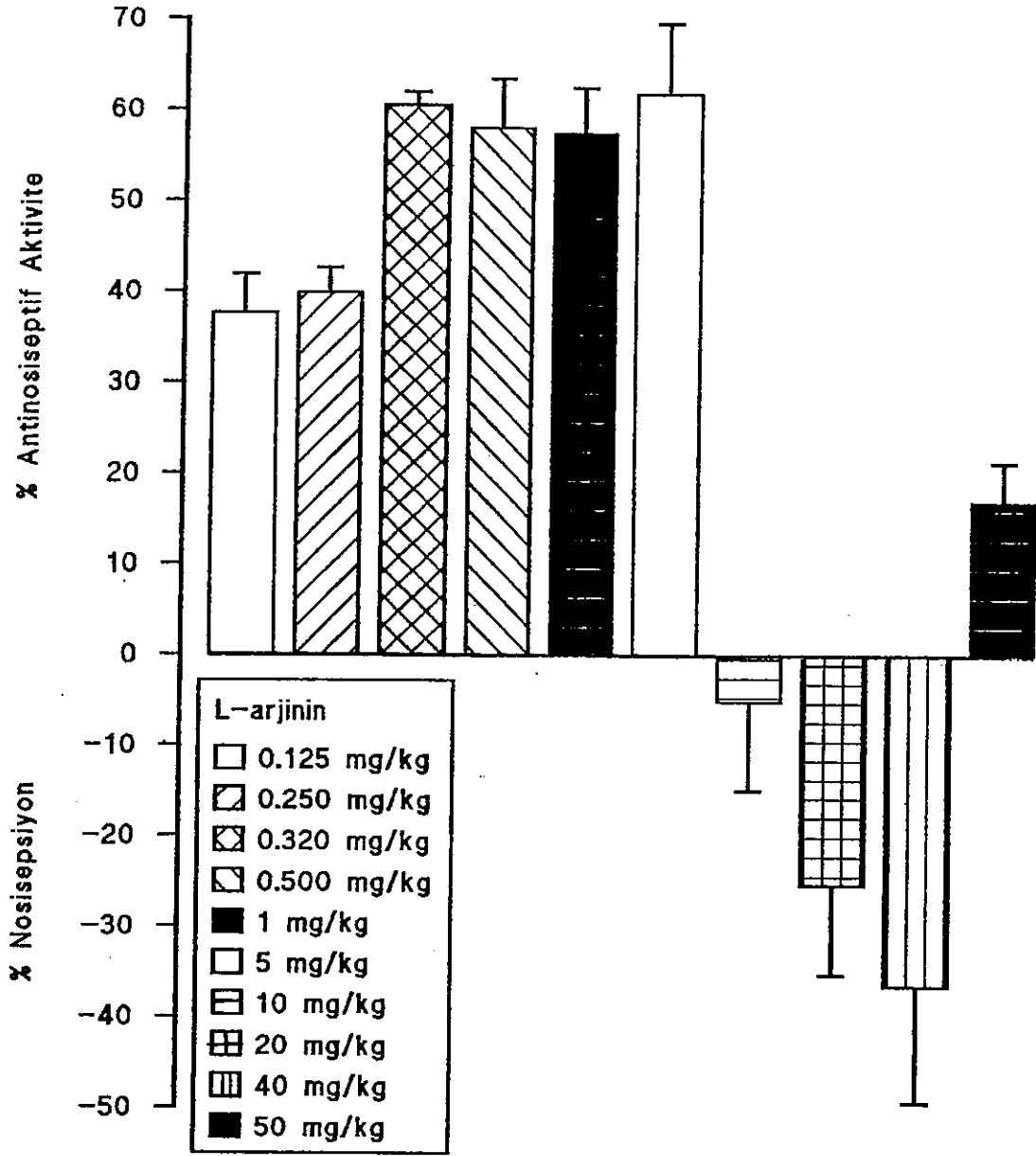
Piridoksinle yapılan kombinasyonda, 5-40 mg/kg'lık metilen mavisi dozları için elde edilen antinosisepsiyon, %60,43 ve %39,44'tür.

5 mg'lık metilen mavisi ve piridoksin için alınan cevap, tek piridoksin ile alınan yanıtla karşılaştırıldığında anlamlı değildir.

Piridoksin + 40 mg/kg metilen mavisi cevabında, nosisepsiyon aktivitesi antinosisepsiyona anlamlı olarak dönüşmüştür. Bu da piridoksinin, L-Arginin : NO kaskadındaki enzim aktivitelerine katkı oluşturduğunu göstermektedir.

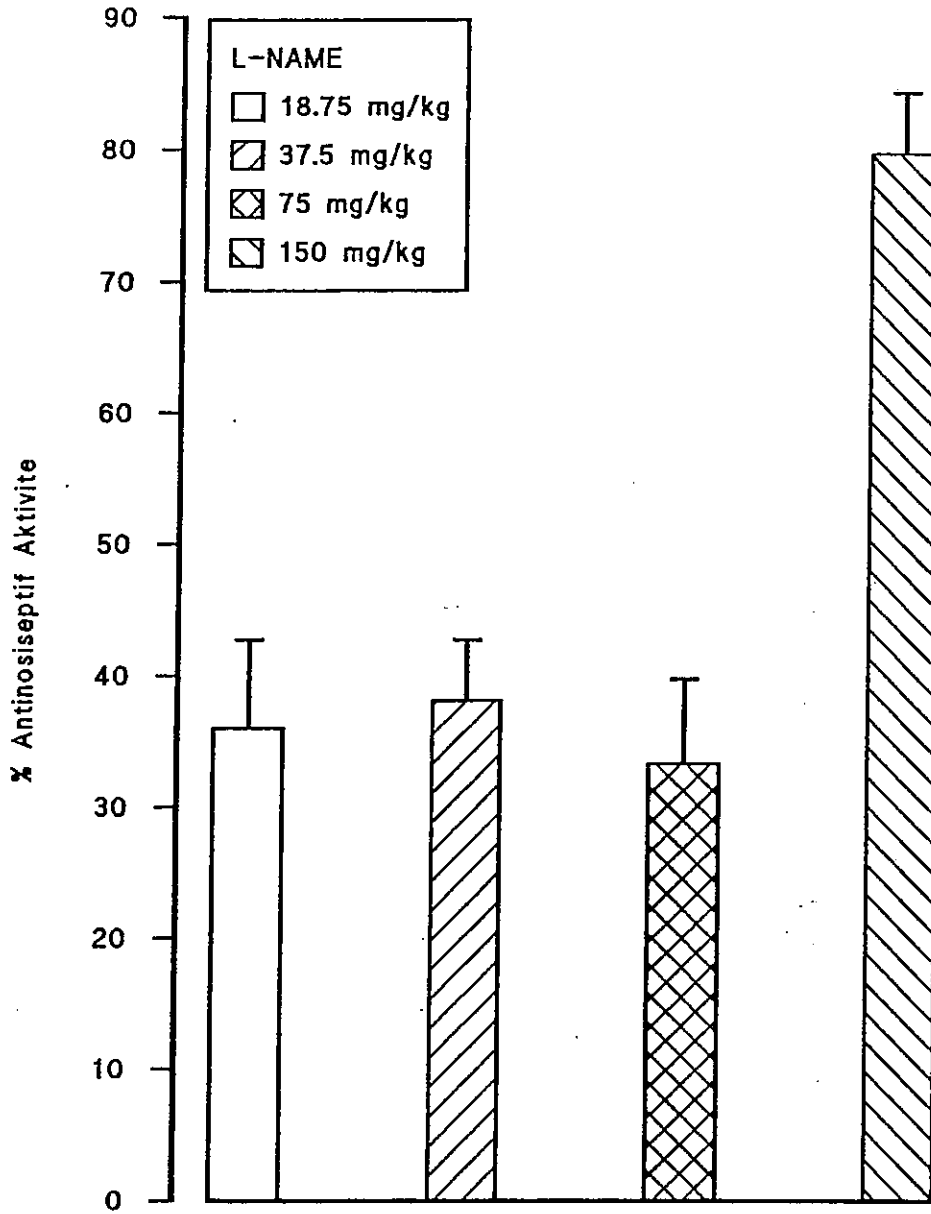


Şekil 4. p-BK ile İndüklenen Fare Abdominal Konstriksiyonunda Piridoksin İçin Antinosiseptif Aktivite Doz-Cevap Eğrisi

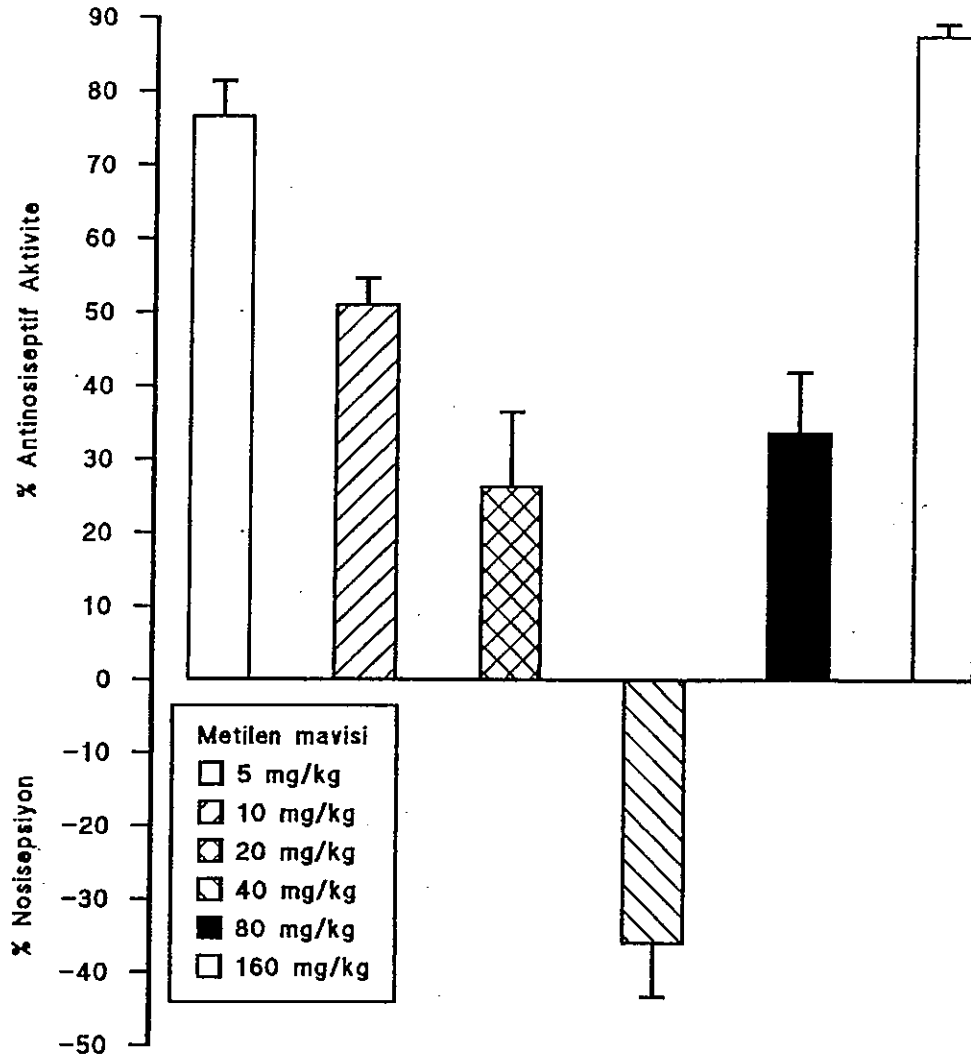


Şekil 5. p-BK ile İndüklenen Fare Abdominal Konstriksiyonunda

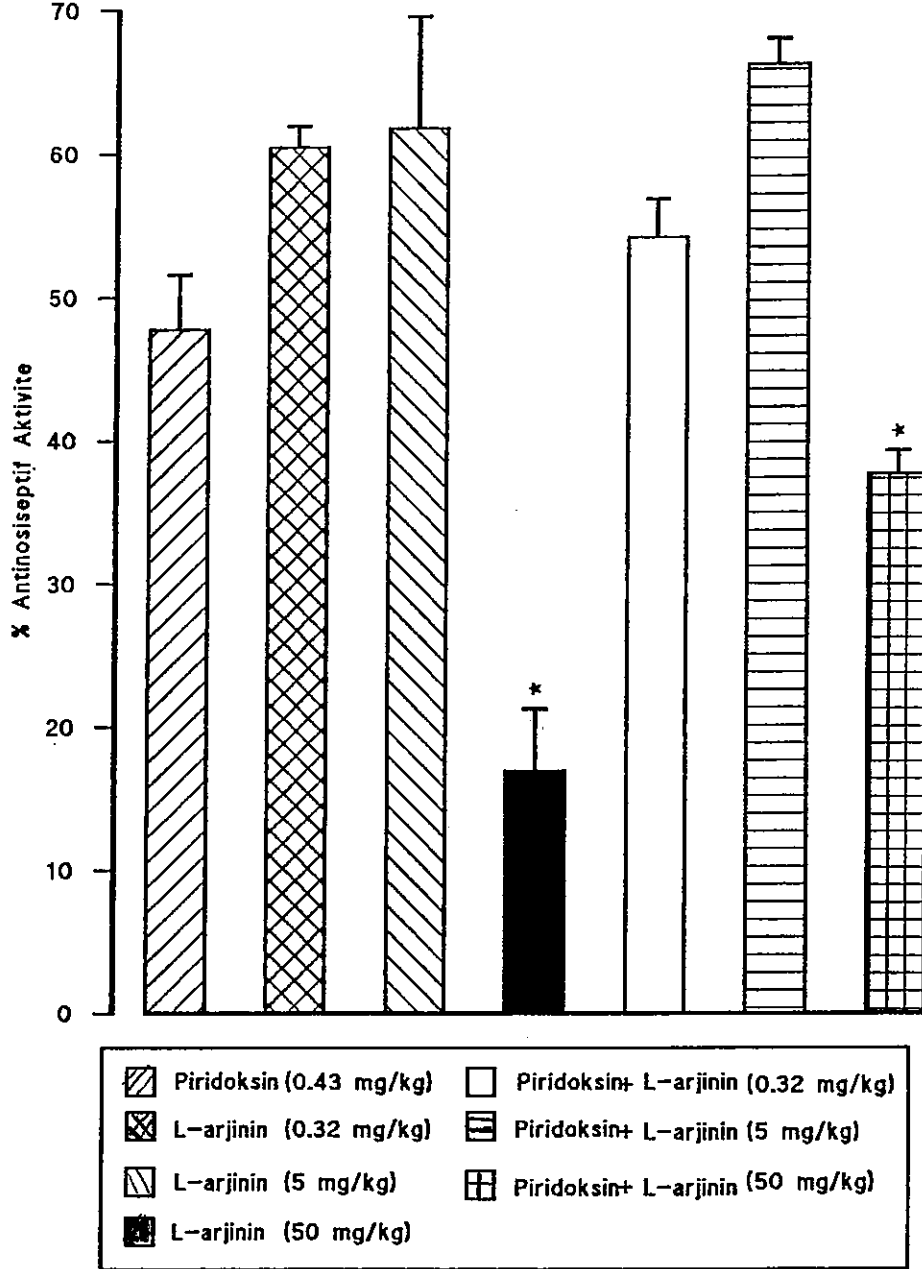
L-Arjinin İçin Antinociceptif Aktivite Doz-Cevap Eğri



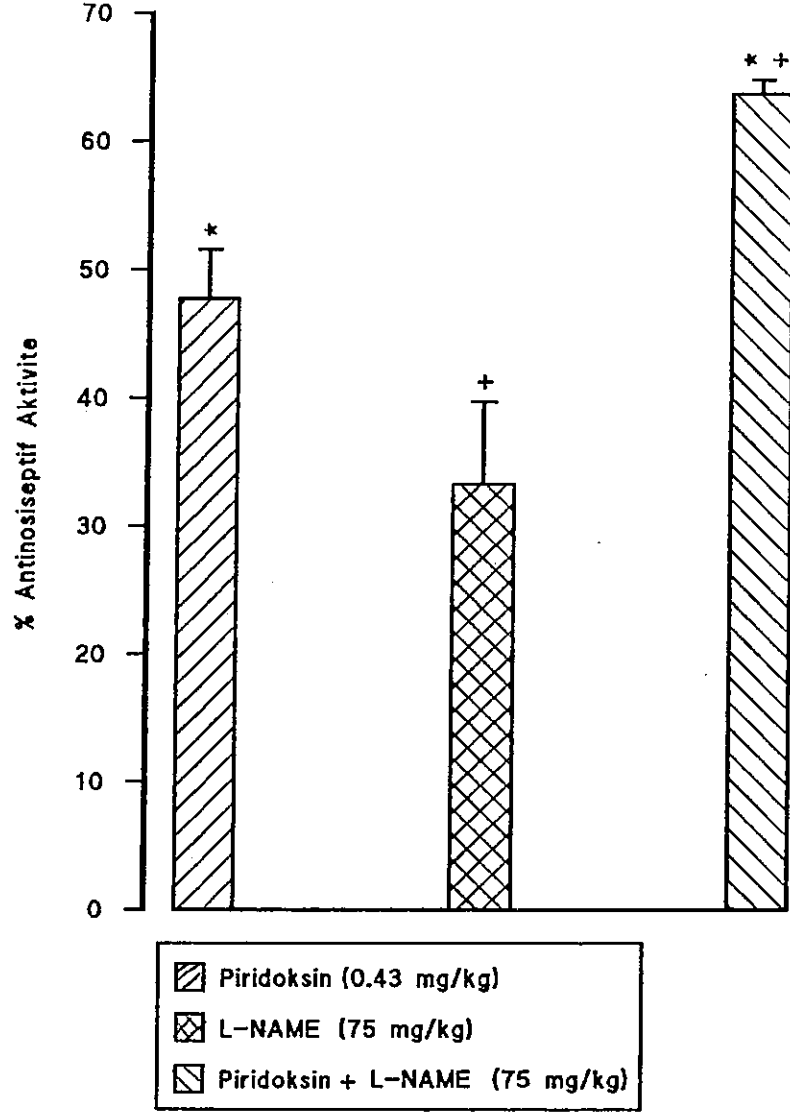
**Şekil 6. p-BK ile İndüklenen Fare Abdominal Konstriksiyonunda L-N^G
-Nitro Arjinin Metil Ester (L-NAME) İçin Antinosiseptif Aktivite
Doz-Cevap Eğrisi**



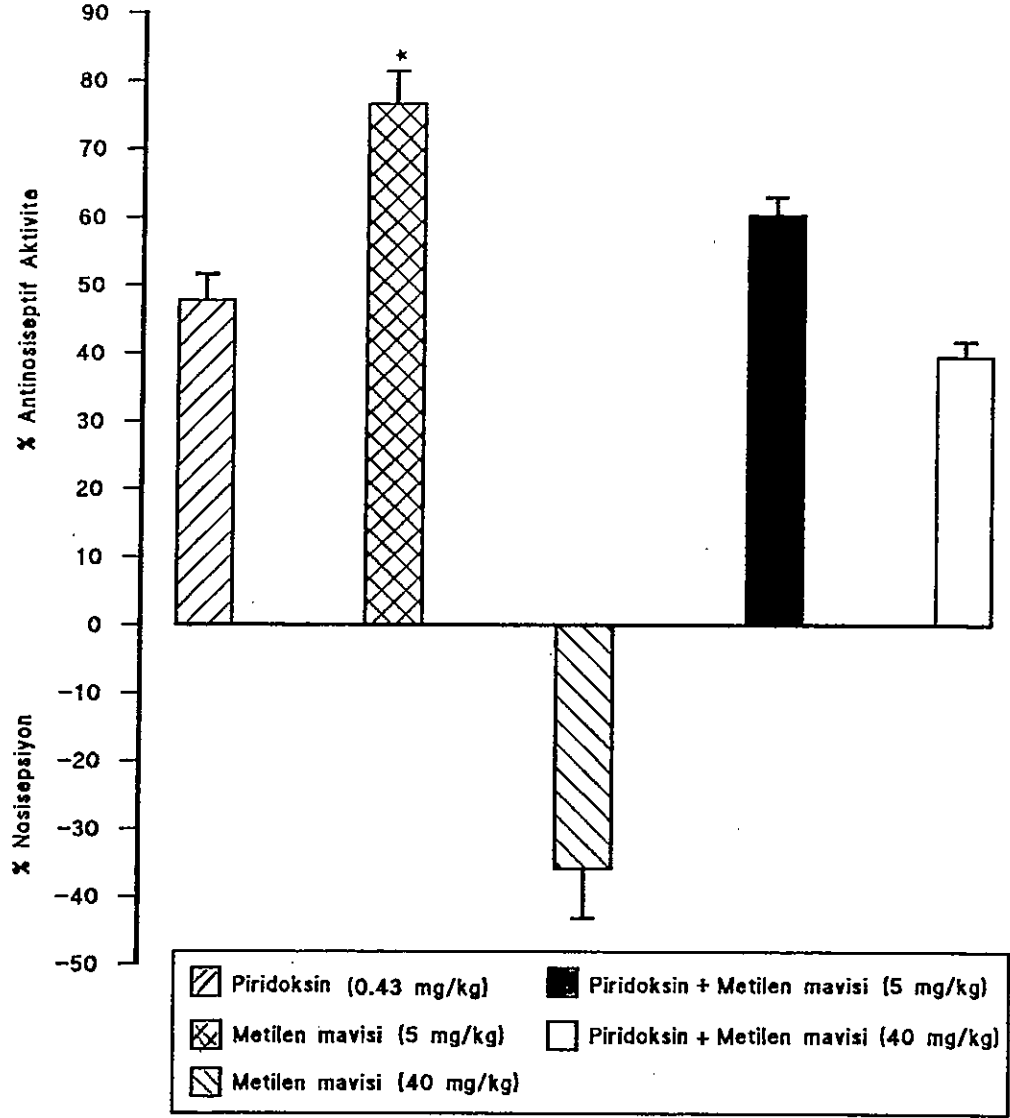
Şekil 7. p-BK ile İndüklenen Fare Abdominal Konstriksiyonunda Metilen Mavisi (MM) için Antinospasmodik Aktivite Doz-Cevap Eğrisi



Şekil 8. p-BK ile İndüklenen Fare Abdominal Konstriksiyonunda Piridoksin ve L-Arjinin'in Tek Olarak ve Kombinasyonlarının Oluşturdukları % Antinospasmodik Aktivite. * p<0.05 düzeyinde L-Arjinin (50 mg/kg) ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı



Şekil 9. p-BK ile İndüklenen Fare Abdominal Konstriksiyonunda Piridoksin ve L-NAME'in Tek Olarak ve Kombinasyonlarının Oluşturdukları % Antinociceptif Aktivite. * $p < 0.05$ düzeyinde L-NAME (75 mg/kg) ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı



Şekil 10. p-BK ile İndüklenen Fare Abdominal Konstriksiyonunda Piridoksin ve Metilen Mavisi'ın Tek Olarak ve Kombinasyonlarının Oluşturdukları % Antinociceptif Aktivite. * $p < 0.05$ düzeyinde Metilen Mavisi (5 , 40 mg/kg) ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı

V. TARTIŞMA:

V.1.) Piridoksin'in Antinosisepsiyonu:

Piridoksinin koenzimatik formlarının birçok biyokimyasal reaksiyona iştirak ettikleri iyi bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda 100'den fazla piridoksal fosfat (PLP) bağımlı enzim bulunduğu ve bunların da büyük çoğunluğunun çeşitli amino asitlerin katabolik reaksiyonlarına iştirak ettiği gösterilmiştir. Sinir sisteminde putatif nörotransmitter olarak etkinlik gösteren dopamin (DA), noradrenalin (NA), serotonin (5-HT), δ -aminobütirik asit (GABA), taurin, sifingolipidler ve poliaminler piridoksal fosfat (PLP)-bağımlı enzimler aracılığıyla sentez edilmektedir. Bu anlamda sayılan nörotransmitterlerin fizyolojik ve farmakolojik etkinliklerinde piridoksin düzeylerinin kritik bir rolü bulunmaktadır¹⁰.

Özellikle piridoksin bağımlı enzimlerden glutamik asit dekarboksilaz, 5-OH triptofan dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz hayvanlardaki piridoksin yetmezliği ve nörolojik defektlerden sorumlu olarak özel bir öneme sahiptir. Substrat spesifitesi gösteren ve PLP bağımlı bir enzim olan L-aromatik amino asit dekarboksilaz, katekolaminler ve serotonin sentezinde majör etkinliğe sahiptir. B₆ yetmezliği olan hayvanların beyin dopamin ve noradrenalin düzeyleri yetmezlikten önemli ölçüde etkilenmezken serotonin düzeylerinde önemli azalmalar olduğu da saptanmıştır⁴⁵. Diğer taraftan piridoksin dahil olmak üzere tüm B kompleks vitaminlerinin guanilat siklaz aktivasyonu yaptığı ve s-GMP düzeylerini arttırdığı ve bu siklik nükeotid aracılığıyla DNA ve protein sentezinde artış oluşturduğu gibi çeşitli fizyolojik aktivitelere katkı sağladığı deneysel olarak gösterilmiştir^{77,16,49,74,15,18}. Bunlara ek olarak gerek deneysel gerekse çeşitli

ağrılı klinik durumlarda piridoksinin antinosiseptif aktivite veya analjezik etki gösterdiği de bilinmektedir^{45,46,47,48,49,50}. Bu çalışmada piridoksin 0.0625-1.0 mg/kg dozlar arasında çalışılmış ve kontrol p-BK kıvranma sayılarını tüm doz düzeylerinde $p < 0.05$ istatistiksel anlamlı olarak % antinosiseptif aktivite cinsinden inhibe etmiştir. Probit regresyonla Litchfield & Wilcoxon yöntemine göre ED₅₀ değeri 0.43 (0.19-0.93) mg/kg olarak hesap edilmiştir. Bu doz düzeyinde yapılan bir grup farede (n= 10) yapıla deneyde abdominal konstriksiyonu da % 47.7 ± 3.86 düzeyinde inhibe etmiştir.

Piridoksinin bu etkisinde diğer bölümlerde de anlatıldığı üzere L-arjinin: NO yolunun rolü araştırılmış ve L-arjinin L-NAME ve metilen mavisi ile kombine etkileri denenmiştir. Piridoksinin oluşturduğu antinosisepsiyonda serotonerjik nöronlar aracılığıyla ağrının desandan inhibitör yollarının uyarılmasının rolü olabileceği ileri sürülebilir. Santral serotonerjik aktivitenin PLP-bağımlı özellik gösteriyor olması ve piridoksin yetersizliğinde 5-HT sentezinin önemli ölçüde azalması bu olasılığı güçlendirmektedir. Diğer yandan nonsteroidal bir analjezik ve antiinflamatuvar olan Diklofenak ile yapılan kombinasyon çalışmalarında Diklofenakın fare kıvranma testinde oluşturduğu antinosisepsiyon B₆ vitamininçe 10 kez daha potansiyalize edilmiştir⁵⁰. Bu etki Diklofenakın Tip-III down regülatör bir analjezik olması bakımından önemlidir⁵¹. Nosiseptörlerde direkt downregülasyon oluşturan analjeziklerin meydana getirdiği etkide L-arjinin: NO/s-GMP yolunun katkısının bulunduğu dair artan kanıtlar da bulunmaktadır⁵². Yine nitrik oksidin retrograd transmitter özelliklerinin supraspinal nosiseptif proseslerde GABA'nın da aktive ettiği NMDA reseptör

aracılıklı olduğunun gösterilmesi ve GABA'nın piridoksal fosfat-bağımlı enzimler aracılığıyla sentez ediliyor olması piridoksinin antinosisseptif etkisiyle L-arjinin: NO yolu arasında bir ilişkinin bulunduğunu telkin etmektedir⁵³.

V. 2) L-Arjinin Antinosisepsiyonu ve Piridoksinle Etkileşme

L-arjinin, NO prekürsörü olan bir amino asittir. L-arjinin'in nosisseptif proseslerdeki rolüne dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır^{54,55,56,57,58}. Bu çalışmalar, L-arjinin'in nosisepsiyon modülasyonunda dual etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir. L-arjinin'in beyinde supraspinal ve spinal düzeyde oluşturduğu etkiler nosisepsiyon veya antinosisepsiyon biçimindedir.

L-arjinin, supraspinal düzeyde diğer opioid reseptörlerden bağımsız sadece ϵ -opioid reseptörlere etki eden β -endorfin aracılıklı bir antinosisepsiyon göstermektedir^{61,62}. Beyinde ise bir met-enkefalin salıvericisi olan kyotorfin prekürsörü olarak etkinlik göstermekte ve salıverilen nöropeptid aracılığıyla antinosisepsiyon oluşturmaktadır^{56,57,58}. Diğer taraftan L-arjinin'in gerek beyinde ve gerekse spinal düzeyde NO: s-GMP aracılıklı nosisepsiyon oluştururken aynı yol aracılığıyla periferik sinir sisteminde kan akımında artış yaparak ve nosiseptörler üzerinde direkt etkiyle antinosisepsiyon oluşturmaktadır. Ancak periferik nosisepsiyon modülasyonu da dual biçimde düzenlenmekte olup L-arjinin inflamasyonlu dokuda damar geçirgenliğini arttırarak nosisepsiyon indüklemektedir^{58,59}. L-arjinin'in bu etkilerinin doz uygulama yolu ve zaman bağımlı oldukları da gösterilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan kıvranma aljezi modeli indüktörü olan p-benzokinon, literatürde adı geçen deney modelleri içinde şimdiye değin gösterilmemiştir. L-arjinin için taranan makaleler içerisinde bir çalışma hariç uygulama yolu i.s.v., i.p.l. veya i.t. olarak bildirilmiştir. Bu tez kapsamında işe sistemik uygulama olarak s.k. yol tercih edilmiştir. L-arjinin için 0.125-5 mg/kg s.k. yolla uygulanması tek başına p-BK kontrol kıvranma sayılarından $p < 0.05$ anlamlı olarak farklılaşan bir inhibisyon oluşturmaktadır. Bu doz aralığında doz-bağımlı bir artış olmakla beraber, doz aralığının çok yakın olması, medyan efektif dozun (ED_{50}) hesaplanmasına sebep olmuştur. 10-40 mg/kg arası dozlarda ise doz-bağımlı bir nosisepsiyon gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda kullanılan 50 mg/kg doz ise ilginç olarak $\% 17 \pm 4.3$ 'lük yeniden bir antinosisepsiyon cevabı oluşturmuştur. Piridoksin ile kombine edilen 0.32 ve 5 mg/kg'lık L-arjinin dozlarında elde edilen antinosiseptif yanıtta L-arjininin tek başına oluşturduğundan farklı bir düzey istatistiksel olarak saptanmamıştır. Bu bakımdan ilk antinosiseptif aktivite fazında piridoksinin aracılık ettiği herhangi bir etkileşme sözkonusu değildir.

Piridoksinin 0.43 mg/kg'lık dozu ile 40 mg/kg L-arjinin kombine edildiğinde bu doz düzeyinde L-arjininin oluşturduğu nosisepsiyon tersine çevrilerek $\% 4.1 \pm 9.3$ 'lük bir antinosisepsiyona dönüşmektedir. Bu etki, piridoksinin olaya katkı sağladığını telkin etmektedir. Şöyle ki yapılan bir çalışmada supraspinal olarak (i.s.v. ve i. sist.) farelere uygulanan L-arjinin ve L-kyotorfin'in kuyruk çekme refleksinde oluşturdukları inhibisyonun mekanizması araştırıldığında L-arjinin'in etkisinin kyotorfin aracılıklı olduğu ve büyük olasılıkla beyin kökü spinal sistemdeki kyotorfin formasyonunu N desandan noradrenerjik

ve serotonerjik sistem aktivasyonuna sebep olarak antinosisepsiyon meydana getirdiği ileri sürülmüştür⁶⁰. Bu çalışma, L-arjinin'in dual etkilerine yeni bir boyut katmış olup kyotorfin etkilerinin beyinde ve spinal uzantıda desandan aminerjik inervasyonu taklit eder bir biçimde olduğunu göstermektedir. Spinal düzeyde L-arjinin'in etkilerinin nosisepsiyon olduğu bilinmektedir. 10-40 mg/kg'lık dozlarda çıkan ikinci faz nosiseptif bir cevabın piridoksin tarafından restore edilmesi NO: s-GMP aracılıklı L-arjinin'le indüklenmiş nosisepsiyonun beyin serotonin düzeylerindeki artışla ve desandan inhibitör serotonerjik sistemin aktivasyonu ile nosisepsiyona çevrilme olasılığını telkin etmektedir. Bunun anlaşılabilmesi için farelerin rezerpinize edilmesi veya p-klorfenilalanin metil esteri uygulamasının yapılması yararlı olacaktır. Diğer yandan 50 mg/kg'lık s.k. L-arjinin uygulaması 0.43 mg/kg'lık piridoksin ile kombine edildiğinde her iki koşulda da meydana gelen antinosisepsiyon % 17± 4.3'den % 37.7±1.6'ya p< 0.05 istatistiksel anlamlı bir artış göstermektedir. L-arjinin'in daha önceki çalışmalarda da gözlediğimiz bu doz düzeyindeki antinosiseptif etkisi, periferik olarak aljezi yöresindeki kan akımındaki artış veya nosiseptörler üzerindeki direkt etkiye bağlı olabilir. Durum böyleyse her iki koşulda da etki NO: s-GMP aracılıklı olup bu da NO'nun, nosisepsiyonu hem stimule hem de suprese ettiğini gösterir. Piridoksin kombinasyonu ile antinosisepsiyonun potansiye olması nitrik oksit sentazın da, guanil siklaz gibi PLP-bağımlı enzim olabilme olasılığını hatıra getirmektedir.

1. i.s.v. L-arjinin farelerde ön uygulanması i.s.v. olarak β -endorfinle indüklenen kuyruk çekme refleksindeki inhibisyonu potansiye etmektedir. Bu potansiyalizasyon L-arjinin'le beraber nitrik oksit sentaz inhibitörü olan L-NAME uygulanmasında parsiyel olarak inhibe olmaktadır. Bu gözlem L-

arjinin'den nitrik oksit sentezinin artışının β -endorfinle indüklenen antinosisepsiyonu potansiyalize ettiğini göstermektedir.

2. Farelerde i.s.v. yoldan ön uygulamayla L-arjinin uygulanması ϵ -opioid reseptör agonisti β -endorfinle indüklenen kuyruk geri çekme refleksindeki inhibisyonu zaman ve doz bağımlı olarak potansiye etmektedir. Buna karşılık μ -agonisti olan morfin ve Damgo, δ -agonisti olan DPDPE ve K-agonisti olan U50, 488H ile aynı biçimde indüklenen aljezide L-arjinin'in rolü olmadığı anlaşılmıştır. Bu sonuçlar L-arjinin'in selektif olarak ϵ -opioid reseptör agonistlerince indüklenen antinosisepsiyonu potansiye ettiğini göstermektedir. Diğer taraftan spinal uygulama yolu olan intratekal uygulamada L-arjinin'le herhangi bir potansiyasyonun olmadığı ve bu etkinin sadece i.s.v. uygulama ile gözlenebildiği dikkate alındığında β -endorfinle indüklenen antinosisepsiyonun supraspinal düzeyde bulunduğu ortaya çıkmaktadır. Bu bulgular ayrıca NO/ s-GMP sisteminin β -endorfinle aktive edilen desandan ağrı kontrol sistemini aktive ettiğini göstermektedir.

3 L-arjinin antinosiseptif aktiviteye sahip bir (met⁵) enkefalin salıvericisi olan kyotorfin (tirozil arjinin) prekürsörüdür. Bu çalışmada L-arjinin'in sıçanlarda antinosiseptif etkisi çalışılmıştır. Karrageninle pençe ödemi oluşturulmuş sıçanlara L-arjinin sistemik olarak s.k. yoldan uygulanmıştır. Antinosiseptif etki Randall Selitto metodu ile denenmiştir. Periferik selektif opioid antagonisti olan Naloksan s.k. olarak L-arjinin'le indüklenen antinosisepsiyonu inhibe etmiştir. L-arjinin'in i.s.v. olarak injeksiyonu karrageninle indüklenen hiperaljeziyi doz bağımlı olarak inhibe etmiştir. İntraplantar olarak uygulanan L-arjinin Naloksana

dirençli bir biçimde ve ancak guanilat siklaz inhibitörü olan metilen mavisiyle antagonize edilen bir antinosisepsiyon oluşturmuştur. L-arjinin'in s.k. uygulanması pençe ödemini inhibe etmemiştir. Bu sonuçlar, sistemik olarak uygulanan L-arjinin'in sıçanlarda karrageninle indüklenen hiperaljeziyi santral opiyaterjik mekanizmalarla inhibe ettiğini düşündürmektedir.

4. Fare pençesine intraplantar karragenin injeksiyonu pençe basınç testiyle ölçüldüğünde hiperaljezi oluşturmaktadır. Endojen analjezik bir nöropeptid olan kyotorfinin olası prekürsörü olan L-arjinin'in (100-1000 mg/kg) s.k. injeksiyonu doz-bağımlı olarak karrageninle indüklenen hiperaljeziyi inhibe etmektedir. Bu etki Naloksan, Naltrindiol (δ -opioid antagonist enkefalin antagonisti) ve D-arjininin s.k. uygulanması ile antagonize edilmiştir. Sistemik uygulanan L-arjininin hiperaljezik farelerdeki antinosiseptif etkisi i.s.v. L-lösit-L-arjinin uygulanmasıyla inhibe edilmiştir. L-arjinin ve kyotorfinin i.s.v. uygulanması hiperaljezik farelerde antinosisepsiyon oluşturmuştur. L-arjinin'in bu antinosiseptif etkisi i.s.v. D-arjinin uygulanmasıyla bloke edilmiştir. Bu uygulamadan kyotorfin antinosisepsiyonu etkilenmemiştir. Bu sonuçlar L-arjininle indüklenen antinosisepsiyonun santral sinir sistemindeki önce kyotorfinerjik ve takiben opiyaterjik (enkefalinerjik) sinirlerin aktivasyonu ile geliştiğini düşündürmektedir.

5. Fare başına 10-100 mg dozlarında i.s.v. olarak uygulanan L-arjinin kuyruk geri çekme refleksi testinde farelerde antinosisepsiyon oluşturmuştur. Bu antinosisepsiyon s.k. olarak NTI selektif opioid antagonisti Naltrindol'ün ön uygulanması durumunda veya kyotorfin (endojen-met-enkefalin saliverici)

reseptör antagonisti olan L-lösil-L-arjinin (Leu-Arg= ile L-arjininin kombine uygulanması durumunda ortadan kalkmıştır.

NO sentaz inhibitörü olan L-NAME'in 3-10 µg/fare dozlarda i.s.v. uygulanmasında Naloksana (s.k.) NTIya (s.k.) ve Leu-Arg'a (i.s.v.) rezistans olan bir antinosiseptif aktivite ortaya çıkmıştır.

L-NAME (i.s.v.) ile indüklenen antinosisepsiyon kendisi de bir antinosiseptif aktivite gösteren L-arjinin (i.s.v.) tarafından değiştirilmemiştir. Fakat L-arg + Leu-arg (i.s.v.) ile kombine injeksiyon veya NTI dan sonra L-arjinin (i.s.v.) ile beraber verilmesi bu aktivitede düşme yapmıştır. Solubl guanilat siklaz inhibitörü olan metilen mavisi 0.1-1 µg fare başına dozlarda i.s.v. olarak antinosisepsiyon oluşturmuştur. MM (i.s.v.) ile veya L-NAME (i.s.v.) ile indüklenen antinosisepsiyon dibütiril-s-GMP ile kombine uygulanmasında önlenmiştir.

Bu bulgular, L-arjinin'in beyindeki nosiseptif proseslerde dual bir role sahip olduğunu ve kyotorfin-met-enkefalin yolağıyla antinosiseptif NO-s-GMP yolağıyla ise nosiseptif olduğunu düşündürmektedir.

6. Farede formalinle indüklenen davranışsal nosisepsiyonda L-arjinin ve L-NAME'in i.plantar uygulanmasıyla oluşan etkiler denenmiştir. D değil L-arjinin pençe başına 0.1-1 µg dozlarda formalinle kombine olarak ve i.pl yoldan uygulandığında ilk değil ikinci faz nosiseptif cevapları arttırmıştır. Bu cevaplar pençe başına ancak 3 mg'dan sonra anlamlılık göstermiş ve ters olarak da 10

mg pençe başına uygulamalar çan şeklinde bir doz cevap eğrisiyle sonlanan bir antinosisepsiyon göstermiştir.

L-NAME'in tek başına 0.1-1 µg pençe başına i.pl uygulanması ikinci fazda doz bağımlı antinosisepsiyon oluştururken D-enantiomerinin herhangi bir etkisi olmamıştır.

L-NAME'in antinosiseptif dozu (1 µg/pençe başına i.pl.) L-arjinin'in düşük dozları ile (1 µg/pençe i.pl.) ortaya çıkan ikinci faz nosisepsiyonu düşürmektedir. L-arjinin 10 mg/pençe i.pl. uygulandığında ise ikinci-faz nosisepsiyonda azalma ortaya çıkmakta ve bu sefer de 0.1 µg/pençe i.pl. L-NAME olayı formolin kontrolü düzeyine kadar tersine çevirmektedir.

Bu sonuçlar, periferik NO'nun nosisepsiyon modülasyonunda dual bir role sahip olduğunu ve doku düzeylerinin nosiseptif ve antinosiseptif cevapları indüklediğini telkin etmektedir.

V.3) L-NAME Antinosisepsiyonu ve Piridoksin'le Etkileşme

L-N^G-Nitroarjinin (L-NOARG) ve metil esteri (L-NAME) ile L-N^G-monometil arjininin (L-NMMA) ve L-N^G-Nitroarjinin'in vasküler endotel hücrelerde nitrik oksit sentazı ve sonuçta nitrik oksit sentezini selektif olarak inhibe ettiği gösterilmiştir^{61,62,63}. Moore ve arkadaşları bu selektif inhibitörün aynı zamanda antinosiseptif etkinliğe sahip olduğunu farelerde gerek formalinle indüklenen pençe yalama testi, asetik asitle indüklenen abdominal konstriksiyon ve gerekse sıcak plak testlerinde göstermişlerdir⁶². Bu çalışmada abdominals konstriksiyon % 0.6'lık i.p. asetik asitle oluşturulmuş ve L-NAME'de i.p. 75 mg/kg'lık dozda

uygulanmıştır. Bu test modeli de dahil olmak üzere sonuçlar NO veya L-arjinin'den sentezlenen benzeri maddelerin farelerde santral olarak oluşan bir ağrı kalıbına fizyolojik bir katkı sağladığı bu ağrıda periferik duyuşal sinir uçlarında gelişen olayların da rolü bulunduğu ve L-NAME'in nosisepsiyon kalıbını naloksanla etkilenmeyen non-opioid bir biçimde etkileyerek antinosiseptif aktivite oluşturduğu biçiminde yorumlanmıştır.

Aynı grubun bir başka çalışmasında L-NAME ve L-NMMA'nın antinosiseptif aktiviteleri formalinle indüklenen pençe yalama testinde denenmiş ve anılan inhibitörlerin gerek i.p. ve gerekse i.s.v. olarak uygulanmalarında pençe yalama zamanını ne kadar değiştirdikleri gözlenmiştir. İ.p. uygulamada L-NMMA herhangi bir antinosiseptif etki göstermezken L-NAME'in gerek i.p. ve gerekse i.s.v. uygulamasıyla potent bir antinosiseptif aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir³⁴.

1992'de yapılan bir başka çalışmada L-NAME'in farelerde oluşturduğu antinosiseptif aktivitenin mekanizması araştırılmıştır. İ.p. olarak uygulanan L-NAME kuyruk çekme refleksi sıcak plak ve fenil-p-kinonla indüklenen abdominal konstriksiyon aljezi modellerinde doz-bağımlı olarak antinosisepsiyon oluşturduğu gösterilmiştir. Katekolamin depleasyonu sağlayan 6-OH-dopamin ve rezerpin veya serotonin sentez inhibitörü olarak p-klorfenilalanin metil esteri ön uygulamalarının anılan aljezi modellerinde L-NAME'in antinosiseptif aktivitesini azalttığı gösterilirken selektif α_1 adrenoseptör antagonisti prazosin ve nonselektif α -adrenobloker fentolaminin ön uygulamalarının da L-NAME antinosisepsiyonunu antagonize ettiği saptanmıştır. Diğer yandan α_2 -adrenoseptör

antagonisti idazoksan 5HT₂ reseptör blokeri ketanserin D₂ dopamin reseptör antagonisti (±) sulpirid ve opioid antagonisti Naloksan ön uygulamalarının ise L-NAME antinosisepsiyonuna etkisiz bulunması L-NAME'in farelerdeki muhtemel etkilerinin adrenerjik ve serotonerjik sinapslar aracılığıyla olduğunu telkin etmiştir⁶⁵.

Bu çalışmada L-NAME 18.75-150 mg/kg dozlar arasında uygulanmıştır. L-NAME uygulaması literatürdeki çalışmalardan farklı olarak s.k. uygulamadır. Abdominal konstriksiyon indüklenmesi de literatürde kullanılan maddelerden farklı olarak p-benzokinondur. 18.75, 37.5 ve 75 mg/kg dozlarda sırasıyla % 35.9, 38.1 ve 33.3'lük antinosiseptif aktivite doz bağımlı olmakla beraber kontrol kıvrınma sayısına göre değerlendirildiklerinde p<0.05 düzeyinde istatistiksel anlamlıdır. 150 mg/kg'lık dozda ise antinosisepsiyon % 79.7 düzeyine yükselmiş ve bu aktivitenin diğer bütün doz düzeylerinden p<0.05 istatistiksel anlamlı farklı olduğu hesaplanmıştır. Bu durumda L-NAME için ED₅₀ dozu hesaplanmamıştır. Piridoksin'le kombinasyonu için daha önceki çalışmalarda da kullanılan 75 mg/kg'lık düzey seçilmiştir. Piridoksin ile kombine uygulama % 63.7±1.1'lik bir antinosiseptif aktivite oluşturmuş bu etkinin piridoksinin tek başına oluşturduğu % 47.7±3.9'lük aktiviteden istatistiksel farklı olduğu hesaplanmıştır. Piridoksin ve L-NAME'in tek ve kombine oluşturduğu etkiler her ikisinin de L-arjinin: NO aracılıklı bir nosisepsiyonda rollerinin bulunduğunu telkin etmektedir.

Nitrik oksit sentaz inhibitörü olan L-NAME'in antinosiseptif etkisinin 5-HT sentez inhibitörü p-klorfenil alanin metil esteri uygulanmasında düşünülüyor olması periferik sinir uçlarındaki nosisepsiyonda serotonerjik nöronal bir

düzenlenmenin bulunduğunu ve 5-HT'nin periferik aljezik etkilerinin NO aracılıklı olabileceğini telkin etmektedir⁷². Diğer yandan santral 5-HT sentezi bakımından piridoksal fosfata gereksinim olması ve piridoksin yetersizliğinde beyin serotoninin düşüyor olması da ağrının desandan inhibitör yolları bakımından gerek 5-HT'ye olan gereksinimi gerekse piridoksinin bunu restore eden madde olduğunu gösterir (V.1.1.). Bu durumda L-NAME ve piridoksin kombinasyonunun uygulanmasında antinosisseptif aktivitenin anılan maddelerin tek başına uygulamalarına göre potansiyalize olması iki sonuca bağlı gibi görünmektedir. İlki L-NAME'in periferik duyu sinir uçlarında ağrıya aracılık eden nitrik oksiti nitrik oksit sentaz inhibisyonu ile etkisizleştirmesi ikincil ise santral 5-HT düzeylerinin piridoksin aracılığıyla aktive edilerek santral aljezik inhibitör 5-HT aktivitesinin artırılması biçimindedir.

V.4) Metilen Mavisi Antinosisepsiyon ve Nosisepsiyonu ile Piridoksin Etkileşmeleri

Endotel bağımlı düz kas gevşemelerinin L-arjinin'den sentezlenen nitrik oksitle oluştuğu ve bunun vasküler endotel hücrelerin çeşitli hormon ve nörotransmitterlere karşı bir cevabı olduğu bu cevapta da aynı zamanda intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun yükselmesinin rolü bulunduğu klasik bir bilgidir⁶⁶. NO'nun guanil siklazı aktive etmesine bağlı s-GMP artışı da düz kas gevşemelerinden sorumludur. Metilen mavisinin selektif olarak solubl guanil siklazı inhibe ederek vasküler düz kaslara s-GMP akümüülasyonunu önlediği pek çok çalışma ile gösterilmiştir^{67,68,69}. Diğer taraftan yapılan bir başka çalışmada da metilen mavisinin vasküler endotel dokuda guanil siklazın yanısıra selektif

olarak nitrik oksit sentazı da inhibe ettiği gösterilmiştir⁷⁰. Vasküler doku dışında metilen mavisinin i.s.v. uygulamasının fare kuyruk geri çekme refleksinde doz bağımlı bir antinosisepsiyon oluşturduğu ve bunun kombine dibütiril s-GMP uygulanmasıyla restore edildiği de gösterilmiştir(V. 2-5).

Bu çalışmada, p-BK ile indüklenen aljezide metilen mavisini s.k. uygulama ile 5-20 mg/kg dozlarda doz-bağımlı olarak azalan bir antinosisepsiyon göstermiştir. Bunların kontrol p-BK değerlerine göre $p < 0.05$ istatistiksel anlamlı oldukları hesaplanmıştır. Metilen mavisini 40 mg/kg dozda ise daha önceki çalışmalarımıza uygun bir biçimde 35.8 ± 7.4 'lük bir aljezi potansiyalizasyonu yapmıştır. 80 ve 160 mg/kg'lık doz düzeylerinde ise metilen mavisini için aktivite profili tekrardan bir hipotaljezi olmuştur. Bu etkiler gözönüne alındığında metilen mavisini için nosisepsiyon modülasyonunun santral ve periferik olarak dual rolünün bulunduğu öne sürülebilir. Beyin ve spinal düzeyde L-arjinin: NO-s-GMP yolunun nosisepsiyon oluşturduğu gözönüne alınırsa gerek guanil siklaz ve gerekse nitrik oksit sentazın metilen mavisiniyle inhibe ediliyor olması antinosiseptif aktiviteyi açıklamaktadır. 5 mg'lık metilen mavisini dozlarının tek başına oluşturduğu 75.5 ± 4.9 'lük antinosiseptif-etki-aynı-doz düzeyinin 0.43 mg/kg'lık piridoksin ile kombine edildiğinde $p < 0.05$ istatistiksel anlamsız 60.4 ± 2.5 'lük bir antinosisepsiyon düzeyinde olması da metilen mavisinin spinal düzeydeki etkisi arasında sayılabilir. Piridoksinin guanil siklazı ve s-GMP aktive ettiği bilindiğinden (V.1-2) metilen mavisini cevaplarındaki düşüş piridoksin aracılıklı bir s-GMP artışının spinal düzeyde NO aracılıklı nosisepsiyona yol açtığını düşündürmektedir.

Periferik nosisepsiyon modülasyonunda NO guanil siklaz ve s-GMP aracılıklı kan akımı artışı ve nosiseptör düzeyinde direkt etkiyle antinosisepsiyon oluşturmaktadır. Metilen mavisi 40 mg/kg'lık dozda periferik olarak etki gösterip gerek guanil siklaz ve gerekse nitrik oksit sentaz-inhibisyonuyla aljezi meydana getiriyor olabilir. Bu doz düzeyinin 0.43 mg/kg'lık piridoksin ile kombinasyonu metilen mavisinin tek başına gösterdiği % 35.8±7.4'lük aljeziyi % 39.4±2.2'lik düzeyinde ve p<0.05 anlamlı olarak aljeziden analjeziye restore etmesi de yukardaki spekülasyona katkı sağlamaktadır. Bu bulgulara bakıldığında piridoksin L-arjinin L-NAME ve metilen mavisi doz bağımlı olarak gerek tek başlarına ve gerekse kombine uygulamalar antinosiseptif aktivite oluşturmaktadırlar. L-arjinin ve metilen mavisinin nosisepsiyon modülasyonunda dual rolleri bulunmakta ve bu etkilerde L-arjinin: NO-s-GMP yolunun santral ve periferik olarak ağrı modülasyonunu her iki yönde de etkilediğini göstermektedir. Piridoksin gerek guanil siklaz ve gerekse s-GMP için bir kofaktör olduğundan periferik ağrı yollarında NO'nun antinosiseptif etkisine katkı sağlarken santral olarak da desandan inhibitör serotonerjik yollardaki aktive edici etkinliğine bağlı bir biçimde antinosiseptif aktivite göstermektedir.

ÖZET:

Bu çalışmada farede parabenzokinonla oluşturulan kıvranma aljezisinde Piridoksin'in oluşturduğu % antinosiseptif aktivitede nitrik oksitin rolü araştırılmıştır.

Piridoksin (0.43 mg/kg), L-Arjinin (0.32, 5 ve 50.0 mg/kg), L-NAME (75 mg/kg) ve Metilen mavisinin (5 ve 40 mg/kg) p-BK kıvranma aljezisindeki etkileri tek başlarına ve kombinasyon uygulamaları biçiminde denenmiştir.

Sonuç olarak piridoksin, morfin, L-Arjinin, L-NAME ve Metilen Mavisi antinosisepsiyon oluştururken ,L-arjinin 10-40 mg/kg dozlar arasında ve metilen maviside 40 mg/kg dozda hiperajjezi meydana getirmiştir.L-arjinin ve Metilen Mavisi nosisepsif proseslerde dual bir etki göstermektedir. Bu bileşiklerin hiperajjezik etkileri 0.43 mg/kg piridoksin dozuyla kombine edildiğinde tamamen inhibe edilmiştir. Bir guanil siklaz ve s-GMP aktivatörü olan piridoksin için yukarda alınan sonuçlar, bu bileşiğin antinosiseptif etkisine L-arjinin/NO-s-GMP yolağının iştirak ettiğine bir kanıt sayılabilir.

SUMMARY

In this study, the role of endogenous nitric oxide in antinociceptive activity of pyridoxine has been investigated by p-benzoquinone (p-BQ) induced writhing algisia model in mice.

The effects of pyridoxine (0.43 mg/kg), morphine (0.13 mg/kg), L-arginine (0.32, 5. 50 mg/kg), L-NAME (75 mg/kg) and methylene blue (MB 5 and 40 mg/kg) in the abdominal constriction of mice induced by p-BQ, were evaluated by s.c single and co-administrations .

As a result, pyridoxine , morphine, L-Arginine, L-Name and Methylene Blue were induced antinociception where as L-arginine and Methylene Blue possessed hyperalgesia at dose levels 10-40. and 40 mg/kg respectively.

L-arginine and methilene blue indicates a dual effect in nociceptive processes whereas hyperalgesic activities of both compounds were totally abolished when combined with 0.43 mg/kg pyridoxine. As pyridoxine is an activator of guanyl cyclase and evident c-GMP, The abovementioned results are that L-arginine/NO-c-GMP pathway involves the antinociceptive effect of the compound.

KAYNAKLAR:

1. ABRAM S.E: Pain Pathways and Mechanisms. In: The pain clinical Manual. JP Lippincott Company, Philadelphia, 1990, p. 23-9.
2. AIMI, Y., FWINURA, M., VINCENT, S.R., and KIMURA, H.: Localization of NADPH Diaphorase Containing Neurons Insensory Ganglia of The Rat, J. Comp. Neural., 306, 382-392 (1991).
3. ARIANO, M.A.: Distribution of Components of The Guanosine 3'-5'-Phosphate System in Rat Caudate Putamen. Neurosciene, 10, 707-723 (1983).
4. BABBEDGE, R.C., HART, S.L., MOORE, P.K.: Antinociceptive Activity of Nitric Oxide Synthase Inhibitors in The Mouse: Dissociation Between The Effect of L-NAME and L-NMMA. J.Pharm.Pharmacol., 45: 77-79 (1993).
5. BARINGA, M.: Is Nitric Oxide The Retrograde Messenger? Science, 254, 1296-1297, (1991).
6. BAUER, M.B., MURPHY, S., and GEBHART, G.F.: Capsaicine Stimulated cGMP via Nitric Oxide in Dorsal Root Ganglion Cells. Soc. Neurosci., Abs., 18, 689 (1992).
7. BISHOP, M. L., Janet I. Duben- Von Laufen, Edward, P. fODY.: Clinical Chemistry, Chapter 16. In, 'Principles Procedures, Correlations' Ed., J. B.

- Lippincott Company Philadelphia (London, Mexico city, New York, St. Louis, Sao Polo, Sydney) 384-386, (1985).
8. BONICA JJ: Anatomic and physiological basis of nociception and pain. The Management of Pain. 2nd Edition. Ed by Bonica JJ. Lea and Febiger, Philadelphia, 1990.
 9. CAMPBELL, V.N., RAYA, S.N., COHEM, R.H., MANNING, D.C., KAHN, A.A., MEYER, R.A.: Peripheral Neural Mechanisms of Nociception, In 'Textbook of Pain' (WALL, P.P., MELZACK, R.Ed.) 2nd Ed., Churchill Livingstone, New York, 22 (1989).
 10. CIRINO, G., CICALA, C., SORRENTINO, L., and REGOLI, D.: Effect of Bradykinin Antagonists, N^G-Nitroarginine on Phospholipase A Induced Oedema in Rat Paw, Gen.Pharmacol., 22, 801-804 (1991).
 11. CUHNA, F. Q., LORENZETTI, B. B., POOLE, S., FERREIRA, S. H.: Interleukin- α a Mediator of Sympathetic Pain, Br. J. Pharmacol., 104, 765-767 (1991).
 12. CUHNA, F. Q., POOLE, S., LORENZETTI, B. B., FERREIRA, S.H.: The Pivotal Role of Tumour Necrosis Factor α in the Development of Inflammatory Hyperalgesia, Br. J. Pharmacol., 107, 660-664 (1992).
 13. DAKSHINAMURTI, K., PAULOSE, C.S., VISWANATHAN, M., SIOW, Y.L., SHARMA, S.K., BOLSTER, B.: Neurobiology of Piridoksin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 585: 128-144, (1990).

14. DUARTE, I.D.G., DOSSANTOS, I.R., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H.:
Analgesia by Direkt Antagonism of Nociceptor Sensitization Involves the
Arginine Nitric Oxide cGMP Pathway. Eur. J. Pharmacol., 217, 255-227
(1992).
15. DUARTE, I.D.G., DOSSANTOS, I.R., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H.:
Analgesia by Direkt Antagonism of Nociceptor Sensitization Involves The
Arginine Nitric Oxide cGMP Pathway. Eur. J. Pharmacol., 217, 255-257
(1992).
16. DUARTE, I.D.G., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H.: Peripheral
Analgesia and Activation of The Nitric Oxide Cyclic GMP Pathway,
Eur.J.Pharmacol., 186, 289-293 (1990).
17. DUBNER, R.: Methods of Assesing Pain in Animals, In, 'Textbook of Pain'
(Ed. by Wall, P. D. & Melzack, r.) CHURCHILL Livingstone, 247-255),
(1989).
18. FERREIRA, S.H., DUARTE, I.D., LORENZETTI, B.B.: The Molecular
Mechanism of Action of Peripheral Morphin Analgesia: Stimulation of The
cGMP System via Nitric Oxide Release, Eur. J. Pharmacol., 201, 121-122
(1991).
19. FERREIRA, S.H.: The Role of Interleukins and NO in The Mediation of
Inflammatory Pain and Its Control by Peripheral Analgesics. Drugs. 46
(Suppl. 1): 1-9 (1993).

20. FIELDS HL: Pain Syndromes in Neurology. Butterworths, London, 1990, p. 1-18
21. FUKUTO, M.J., WOOD, K.S., BYRNS, R.E. and IGNARRO, L.T.: N^{*}Amino-L-Arginine: A New Potent Antagonist of L-Arginine-Mediated Endothelium-Dependent Relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 458-465 (1990).
22. FURCHGOTT, R. F., VAN HOUTTE, P. M.: Endothelium-derived Relaxing and Contracting Factors. *FASEB, J.*, 3, 2007-2018 (1989).
23. FURCHGOTT, R. F., ZAWASKI, J. V.: The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetyl Cholin, *Nature* 288, 373-376, (1980).
24. FURCHGOTT, R. F.: The Role of Endothelium in the Responses of Vascular Smooth Muscle to Drugs; *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24, 175-197, (1984).
25. GRIFFITH, T. M., EDWARDS, D. H., LEVIS, M. J., NEWBY, A. C., and HENDERSON, A. H.: The Nature of Endothelium-derived Vascular Relaxant Factor, *Nature (Lond.)*, 329, 442-445, (1987).
26. GRUETTER, C.A., KADOWITZ, P.J., IGNARRO, L.J.: Methylene Blue Inhibits Coronary Arterial Relaxation and Guanylate Cyclase Activation by Nitroglycerine, Sodium Nitrate and Amyl Nitrate. *Can.J.Pharmacol.*, 59: 150-156 (1981).

27. HANCK, A., WEISER, H.: Analgesic and Anti-inflammatory Properties of Vitamins. *J.Vit.Nutr.Res., Supp.* 27, 189-206 (1985).
28. HIBBS, J.B.Jr., RAINTOR, R.R., and VAVRIN, Z.: Macrophage Cytotoxicity: Role for L-Arginin Deiminase Activity and Imino Nitrogen Oxidation to Nitrite. *Science*, 235, 437-476, (1987a).
29. HOFFERT MJ: The Neurophysiology of pain. In: Aron-off GM (ed.): *Evaluation and Treatment of Chronic Pain.* 2nd Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1992, p. 10-25.
30. HUGHES, S.R., WILLIAMS, J.J., and BRAIN, S.D.: Evidence That Endogenous Nitric Oxide Modulate Oedema Formation Induced by Substance P. *Eur.J.Pharmacol.*, 191, 481-484 (1990).
31. IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRNS, CHAUAHURI, G.: Endothelium-derived Relaxing Factor (EDRF) produced and Released from Artery Vein is Nitric Oxide, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84, 9265-9269, (1987).
32. IGNARRO, L.J.: Nitric Oxide: A Novel Signal Transduction Mechanisms for Transcellular Communication, *Hypertension*, 16, 477-483, (1990).
33. KAWABATA, A., FUKUZUMI, Y., FUKUSHIMA, Y., TAKAGI, H.: Antinociceptive Effect of L-arginine on Carragenin-Induced Hyperalgesia in The Rats: Possible Involvement of Central Opiodergic Systems. *Eur. J. Pharmacol.*, 218: 153-158 (1992).

34. KAWABATA, A., MANAB, S., TAKAGI, H.: Comparison of Antinociception Induced by Supraspinally Administered L-Arginine and Kyotorphin. Br.J.Pharmacol., 112, 817-822 (1994).
35. KAWABATA, A., MANABE, S., MANABE, Y., TAKAGI, H.: Effect of Topical Administration of L-Arginine on Formalin Induced Nociception in The Mouse a Dual Role of Peripherally Formed NO in Pain Modulation. Br.J.Pharmacol., 112, 547-550 (1994).
36. KAWABATA, A., NISHIMURA, I., TAKAGI, H.: L-Leucyl-L-Arginine, Naltrindole and D-Arginine Block Antinociception Elicited by L-Arginine in Mice with Carragenin-Induced Hyperalgesia. Br. J. Pharmacol., 107: 1098-1101 (1992).
37. KAWABATA, A., UMEDA, N., TAKAGI, H.: L-Arginine Exerts aDual Role in Nociceptive Processing in The Brain: Involvement of The Kyotorphin-met enkephalin Pathway and NO-cGMP Pathway. Br. J. Pharmacol., 109: 73-79 (1993).
38. KNOWLES, R.G., NERETT, M., SALTER, M., and MONCADA, S.: Differential Induction of Brain Lung and Liver Nitric Oxide Synthase by Endotoxin in The Rat. Biochem. J., 270, 833-836, 819909.
39. KRAM, R., TOMPKINS, G.M.: Pleiotypic Control of Cyclic AMP and Possible Role of Microtubules, Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 70: 1659-1666 (1973).
40. LENZ, F. A.: Ascending Modulation of Thalamic Function and Pain, Adv. Pain Res. Ther., 20, 177-196 (1992).

41. LEONE, A.M., PALMER, R.M.J., KNOWLES, R.G., FRANCIS, P.L., ASGTON, D.S., and MONCADA, S.: Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthase are L-Arginine NG-GG-Dioxygenases, *J.Biol. Chem.* Submitted, (1991).
42. LETTKO, M., BARTOSZYK, G.D.: Reduced Need for Diclofenac with Concomitant Administration of Pyridoxine and Other B Vitamins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 585: 510-512 (1990).
43. LEUSCHNER, J.: Antinociceptive Properties of Thiamine, Pyridoxine and Cyanocobalamin Following Repeated Oral Administration to Mice. *Arzneim-Forsch./Drug Res.* 42 (I), 2: 114-115 (1992).
44. LITTELL, E.H.: Gating and sensory transmission in the thalamus. In: *Basic Neuroscience for the Health Professions*. Slack Incorporated, Thorafare, 1990, p. 153-62.
45. MACIEWICZ, R: Organization of Pain Pathways. In: Asbury AK, McKhann, GM, McDonald WI (eds): *Diseases of the Nervous System. Clinical Neurobiology*. 2nd Ed. WB Saunders Company, Philadelphia, 1992, p. 849-57.
46. MACIEWICZ, R., MARTIN,: Pain: Pathophysiology and Management, In, 'Harrison's Principles of Internal Medicine' 20th Ed., (WILLSON, Y.D., BRAUNWALD, et. al., Ed.) Mc Graw- Hill, New York, Vol. 1, 93 (1991).

47. MARKS, J.: A Guide to The Vitamins, Chapter 2. In, 'Individual Vitamins' Ed., MTP MEDICAL AND TECHNICAL PUBLISHING CO LTD, St. Leonard's House Lancaster England, (1975).
48. MAYER, B., BRUNNER, F., SCHMIDT, K.: Inhibition of Nitric Oxide Synthesis by Methylene Blue. *Biochem.Pharmacol.*, 45(2): 367-374 (1993).
49. MELLER, S.T., DYKSTRA, C., and GEBHART, G.F.: Production of Endogenous Nitric Oxide and Activation of Soluble Guanylate Cyclase are required for N-Methyl-D-Aspartate Produced Facilitation of The Nociceptive Tail-flick reflex, *Eur.J.Pharmacol.*, 214, 93-96 (1992a).
50. MELLER, S.T., GEBHART, G.F.: Nitric Oxide (NO) and Nociceptive Processing in The Spinal Cord. *Pain*, 52: 127-136 (1993).
51. MERSKY, H.: Pain terms: a list with definitions and notes on usage, *Pain*: 6: 249-252 (1979).
52. MIKI, N., KAWABE, Y., KURIYAMA, K.: Activation of Cerebral Guanylate Cyclase by Nitric Oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75: 851-856 (1977).
53. MONCADA, S., PALMER, R.M.J., and GRYGLEWSKI, R.J.: Mechanisms of Action of Some Inhibitors of Endothelium-derived Relaxing Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83, 9164-9168 (1986A).
54. MONCADA, S., PALMER, R.M.J., and HIGGS, E.A.: Nitric Oxide Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology, *Pharmacol. Rev.*, USA, 109-134, (1991).

55. MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A.: Nitric Oxide-Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 43: 109-142 (1991).
56. MOORE, P.K., OLUYOMI, A.E., BABBEDGE, R.C., WALLACE, P. and HART, S.L.; L-N-Nitro Arginine Methyl Ester Exhibits Antinociceptive Activity in Mice. *Br.J.Pharmacol.*, 102, 198-202 (1991).
57. MORRIS, R., SOUTHAM, E., BRAND, D.J., and GARTHWAITE, J.: Nitric Oxide MAY Act as a Messenger Between Dorsal Root Neuron and Their Satellite Cells, *Neurosci. J.*, 137, 29-32, (1992).
58. MURAD, F., MITTAL, C.K., ARNOLD, W.P., KATSUKI, S., KIMURA, H.: Guanylate Cyclase: Activation by Azide Nitro Compounds and Hydroxyl Radical and Inhibition by Hemoglobin and Myoglobin. *Adv.Cyclic Nucleotide Res.* 9: 145-158 (1978).
59. MUSTAFA, A.A.: Mechanisms of L-NG-Nitro Arginine Methyl Ester Induced Antinociception in Mice: A Role for Serotonergic and Adrenergic Neurons. *Gen.Pharmacol.*, 23: 6, 1177-1182 (1992).
60. PALMER, R.M.J., FERRIGE, A.G., MONCADA, S.: Nitric Oxide Release Accounts for The Biological Activity of Endothelium-derived Relaxing Factor, *Nature*, 327, 524-526, (1987).
61. RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M.J., and MONCADA, S.: Endogenous Nitric Oxide Inhibits Human Platelet Adhesion to Vascular Endothelium, *Lancet*, 2, 1057- 1058, (1987a).

62. RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M.J., and MONCADA, S.: The Antiaggregating Properties of Vascular Endothelium: Interactions Between PGI₂ and NO, *BR.J.Pharmacol.*, 92, 639-646, (1987).
63. RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M.J., and MONCADA, S.: The Role of Nitric Oxide and cGMP in Platelet Adhesion to Vascular Endothelium, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 148, 1482-1489, (1987c).
64. RAJ, PP.: Basic functions and organizations of the nervous system. In: *Practical Management of Pain*. Year Book Medical Publishers INC, Chicago, 1986, p. 47-60.
65. RAPOPORT, R.M., MURAD, F.: Agonist Induced Endothelium Derived Relaxation in Rat Thoracic Aorta May be Mediated Through Cyclic GMP. *Circ. Res.*, 52, 352-357, (1983),
66. REES, D.D., PALMER, R.M.J., HODSON, H.G. and MONCADA, S.: A Specific Inhibitor of Nitric Oxide Formation from L-Arginine Attenuates Endothelium-Dependent Relaxation. *Br.J.Pharmacol.*, 96, 418-424 (1989).
67. RUBANYI, G. M., LORENZ, R. R., VAN HOUTTE, P. M.: Flow-induced Release of Endothelium Derived Relaxing Factor (S): Inactivation by Catecholamines, *Am. J. Physiol.*, 249, H95-H101, (1985).
68. SCHMIDT, H.H.H.W., SMITH, R.M., NAKANE, M., and MURAD, F.: Ca²⁺/Calmodulin Dependent NO Synthase Type b a Bioteroflavoprotein with Ca²⁺/Calmodulin Independent Diaphorase and Reductase Activities *Biochemistry*, 31, 3243-3249, (1992).

69. SCHWIEGER, G., KARL, H., SCHÖNHABER, E.: Relapse Prevention of Painful Vertebral Syndromes in Follow-up Treatment with a Combination of Vitamins B1, B6 and B12. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 585: 540-542 (1990).
70. SEBRELL, W. H., HARRIS, R. S.: The Vitamins, Chapter 3. In, 'Chemistry, Physiology, Pathology, Methods' Vol 2, 2nd Ed., Academic Press, New York & London, 1968.
71. SEIFERT, W.E., RUDLAND, P.S.: Possible Involvement of Cyclic GMP in Growth Control of Cultured Mouse Cells. *Nature.* 243: 138-140 (1974).
72. SHARMA, S.K., BOLSTER, B., DAKSHINAMURTI, K.: Effects of Pyridoxine on Nociceptive Thalamic Unit Activity. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 585: 549-553 (1990).
73. STIMMEL, B.: The Neuroanatomical Pathways of Pain Transmission. In, Pain, Analgesia & Addiction, The Pharmacologic Treatment of Pain, 1st Ed., p.p. 1-38, Raven Press, N.Y. (1993).
74. SYNDER, S.H.: Nitric Oxide: First in a New Class of Neurotransmitters. *Science*, 257, 494-496 (1992).
75. TRAUB, R.J., SOLODKIN, and GEBHART, G.F.: A Bilateral Increase in NADPH Diaphorase Activity in The Rat Lumbar Spinal Cord Following Unilateral Hindpaw Inflammation. *Soc. Neurosci. Abst.*, 18, 135 (1992).
76. TSENG, L.F., XU, J.M., PIEPER, G.M.: Increase of Nitric Oxide Production by L-arginine Potentiates i.c.v. Administered μ -endorphin-induced Antinociception in The Mouse. *Eur. J. Pharmacol.*, 212: 301-303 (1992).

77. VALENTI, A., IANARO, A., MONCADA, S., and DIROSA, M.: Modulation of Acute Inflammation by Endogenous Nitric Oxide, *Eur.J.Pharmacol.*, 211, 1778-1820 (1992).
78. VARRONE, S., DILAURO, R., MACCHIA, V.: Stimulation of Polypeptide Synthesis by Cyclic 3'-5'-Guanosine Monophosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 157: 334-338 (1973).
79. VESELY, D.L.: B Complex Vitamins Activate Rat Guanylate Cyclase and Increase Cyclic GMP Levels. *Eur. J. Clin. Invest.* 15, 258-262, (1985).
80. VINCENT, S.R., and HOPE, B.E.: Neurons That Say NO T/NS, 15, 108-113 (1992).
81. WATSON, J., EPSTEIN, R., COHN, M.: Cyclic Nucleotides as Intracellular Mediators of The Expression of Antigen-Sensitive Cells. *Nature.* 246: 405-409 (1973).
82. WEINSTEIN, Y., CHAMBERS, D.A., BOURNE, H.R., MELMON, K.: Cyclic GMP Stimulates Lymphocyte Nucleic Acid Synthesis. *Nature.* 251: 352-353 (1974).
83. XU, J.Y., TSENG, L.F.: Increase of Nitric Oxide by L-arginine Potentiates - endorphin-but not -- or k-opioid agonist-induced Antinociception in The Mouse. *Eur. J. Pharmacol.*, 236: 137-142 (1993).
84. ZIMMERMANN, M., BARTOSZYK, G.D., BONKE, D., JURNA, I., WILD, A.: Antinociceptive Properties of Pyridoxine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 585: 219-230 (1990).

ÖZGEÇMİŞ

Erzurum doğumluyum. İlk ve ortaokulu, Balıkesir Atatürk İlkokulu ve Balıkesir Atatürk Ortaokulunda; Liseyi Balıkesir Koray Lisesinde okudum. 1993 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakóltesinden mezun oldum. Eylül 1993 tarihinde, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım. Halen özel bir ilaç firmasında çalışmaktayım.