

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL

**NÖROPATİK SIÇANLARDA SERUM ASİMETRİK
DİMETİLARGİNİN DÜZEYLERİ**

(Doktora Tezi)

Dr. Emin HAFIZOĞLU

EDİRNE-2010

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL

**NÖROPATİK SIÇANLARDA SERUM ASİMETRİK
DİMETİLARGİNİN DÜZEYLERİ**

(Doktora Tezi)

Dr. Emin HAFIZOĞLU

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2008/118

Tez No:

EDİRNE-2010

TEŐEKKÜR

Doktora eğitimimde ve tez çalıőmalarımnda değerli katkıları olan danıőmanım Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL baőta olmak üzere Prof. Dr. İsmet DÖKMECİ'ye, Prof. Dr. Hakan KARADAĞ'a, Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ'ye, Araő. Gör. ÖZGÜR GÜNDÜZ'e bu çalışmada benden yardımlarını esirgemeyen sekreterimiz Gülçin AKIN'a, Burhan ELMAS'a, Ender GELİR'e ve tüm çalışma arkadaşlarıma teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
AĞRI	3
AĞRI SINIFLAMASI	3
AĞRININ FİZYOLOJİSİ	5
AĞRI MEKANİZMALARI	6
NÖROPATİK AĞRI	8
DENEYSSEL NÖROPATİK AĞRI MODELLERİ	13
NİTRİK OKSİT	14
ASİMETRİK DİMETİLARGİNİN	18
GEREÇ VE YÖNTEMLER	22
BULGULAR	29
TARTIŞMA	40
SONUÇLAR	44
ÖZET	45
SUMMARY	46
KAYNAKLAR	47
ŞEKİLLER LİSTESİ	52
ÖZGEÇMİŞ	54
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

ADMA	: Asimetrik dimetilarginin
BH₄	: Tetrahidrobiopterin
CGRP	: Calcitonin Gene Related Peptide
DDAH	: Dimetilarginin dimetil-aminohidrolaz
DKG	: Dorsal kök gangliyonu
EDRF	: Endothelium Derived Relaxing Factor
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
FAD	: Flavin adenin dinükleotit kalmodulin
FMN	: Flavin mononükleotit
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IASP	: International Association for the Study of Pain
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KKH	: Kronik konstriksiyon hasarı
MMA	: Monometil Arginin
NMDA	: N-metil-D-aspartat
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
PRMT	: Protein Arginin Metil Transferaz
PSSL	: Parsiyel siyatik sinir ligasyonu
SDMA	: Simetrik Dimetilarginin
SSL	: Spinal sinir ligasyonu
WDR	: Wide dynamic range

GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik ağrı, biyolojik, fizyolojik, davranışsal, çevresel ve sosyal faktörlerin de etkilediği karmaşık bir durum olup ilaç tedavisine yanıtı yetersizdir.

International Association for the Study of Pain (IASP) tanımına göre nöropatik ağrı, sinir sisteminin primer lezyonuna veya disfonksiyonuna bağlı ya da metabolik hastalıklar sonucu gelişen ağrıdır (1,2). Günümüzde nöropatik ağrı tedavisinde analjezikler, trisiklik antidepressanlar ve bazı antikonvülsan ilaçların kullanılmasına karşın, alınan yanıtlar ve ilaçların etkinlikleri belirgin değişiklikler göstermektedir (3-5). En güçlü analjezikler olarak nitelendirilen opioid ilaçların nöropatik ağrıya karşı etkinlikleri bile günümüzde tartışmalı olup, bu ilaçların ancak ciddi istenmeyen etkilerinin belirgin olarak ortaya çıktığı yüksek dozlarıyla etkili olabildikleri kabul edilmektedir (3,4,6). Amitriptilin ve diğer trisiklik antidepressanlar veya antikonvülzan olan gabapentin öncelikli tedavi olarak ön plana çıkmıştır, ancak nöropatik ağrıya karşı daha etkili ilaçlara ihtiyaç olduğu açıktır.

Periferik sinir hasarı, nöropatik ağrı olarak adlandırılan anormal ağrıya neden olmaktadır. Allodini (normalde ağrı oluşturmayan uyarının ağrı oluşturması), hiperaljezi (normalde ağrılı uyarana artmış yanıt) ve spontan ağrı nöropatik ağrının bazı klinik sendromlarıdır. Bu davranışsal belirtiler hayvan modellerinde de gösterilmiştir (7-9).

Nitrik oksit (NO) santral sinir sisteminde yeni bir nöronal ulak ve nöromodülatör olarak görülmekte olup, nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla L-arginin'den oluşmaktadır (10-14). NOS'un endotelial, induklenebilir ve nöronal (sırasıyla, eNOS, iNOS ve nNOS) olarak isimlendirilen üç farklı formu saptanmış olup, asimetric dimetilarginin (ADMA) her üç izoformu da inhibe edebilen endojen bir NOS inhibitörüdür (13,14). ADMA dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) ile *citrullin*'e metabolize edilerek veya idrar ile atılarak

elimine edilmektedir (14-16). Birçok kanıt NO'nun spinal nosiseptif süreçte rol aldığını ortaya koymaktadır (17). Her ne kadar nöropatik ağrı mekanizmaları tam olarak anlaşılmasa da son çalışmalar NO'nun bu sürece aracılık ettiğine dair kanıtları arttırmaktadır (18,19). Nöropatik ağrıdaki rolüne ek olarak NO'nun opioid toleransı ve bağımlılığında da çok önemli rol oynadığı sanılmaktadır (20-22). ADMA'nın nNOS'u inhibe edip NO düzeylerini azaltarak, morfinin analjezik doz-yanıt eğrisini değiştirebileceğine ve opioid tolerans ve bağımlılığında rol oynayan bir modülatör olabileceğine işaret edilmektedir. Nöropatik ağrıya benzer belirtiler ortaya çıkarttığı bilinen bir deneysel diyabet modelinde de ADMA düzeylerinin arttığı saptanmıştır (23).

Bu tez çalışması yukarıda sözü edilen veriler doğrultusunda, siyatik siniri zedelenmiş sıçanlardaki allodini ve hiperaljezi ölçüm değeri ile ADMA düzeyinin değişimi arasındaki korelasyonu belirlemek amacıyla yapılmıştır. ADMA'ya ek olarak aynı zamanda simetrik dimetilarginin (SDMA), homoarginin ve L-arginin plazma düzeyleri High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) kullanılarak ölçülmüş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

GENEL BİLGİLER

AĞRI

“International Association for the Study of Pain” (IASP) ağrıyı “hoş olmayan, gerçek veya potansiyel doku hasarı veya tehdidi ile birlikte bulunan, duyuşsal ve hissi deneyim” olarak tanımlamaktadır. Bu tanıma göre ağrı gerçek bir duyu değil, algıdır ve duyuşsal (sensoryal), duyuşsal (emosyonel) ve bilişsel bileşenlerden oluşmaktadır. Bu bileşenler ağrının şiddet, süre ve yerleşim olarak algılanmasını (duyuşsal), motivasyonel değişiklikler ve nahoşluk hissi duyuşmasını (duyuşsal), ağrıya bağlı korku, anksiyete ve farkındalık yaratılmasını (bilişsel) sağlar (1,24-26).

Ağrı her zaman için öznedir. Bu nedenle algılanması kişiden kişiye büyük farklılıklar gösterebilir. Objektif uyarıların yanı sıra bireysel özellikleri bireyin ağrıya yanıtında önemli rol oynar. Bu yüzden ağrılı bir uyarana karşı yanıtta kişiden kişiye farklılıklar görülür.

Ağrı çok boyutlu bir deneyimdir; nörofizyolojik, psikolojik, biyokimyasal, etnokültürel, dinsel, bilişsel, ruhsal ve çevresel bir durumdur (27).

AĞRI SINIFLAMASI

Nörofizyolojik Mekanizmasına Göre

a. Nosiseptif

- Somatik
- Visseral

b. Nöropatik (nonnosiseptif)

- Merkezi
- Periferik
- c. Psikojenik

Süresine Göre

- a. Akut
- b. Kronik

Etiyolojisine Göre

- a. Kanser ağrısı
- b. Postherpetik nevralji
- c. Orak hücre anemisine bağlı ağrı
- d. Artrit ağrısı

Bölgesel Ağrı

- a. Baş ağrısı
 - b. Yüz ağrısı
 - c. Bel ağrısı
 - d. Pelvik ağrı
- şeklinde sınıflama yapılabilmektedir (28).

Nosiseptif Ağrı

Nosiseptörler; primer afferent sinir uçlarında, doku hasarı ile oluşan uyarılara duyarlı olan nörolojik reseptörlerdir. Kimyasal, mekanik ve termal uyarılar ile aktive olur. Yüksek eşikli mekanoreseptörler; tek tip stimulusla, polimodal nosiseptörler; birden fazla stimulusla uyarılırlar. Normal şartlarda uyarılması zor olan sessiz nosiseptörler ise enflamasyon gibi bir etki ile duyarlılaşırlar ve uyarılabilir hale gelebilirler (27).

Mekanoreseptörler sıkıya ve iğne batırmaya duyarlıyken, sessiz nosiseptörler inflamasyona, polimodal mekanotermal nosiseptörler ise aşırı bası, aşırı ısı (>42°C ve <18 °C) ve allojenlere duyarlıdır (1).

Nosiseptörler, sinir sisteminin yanı sıra tüm doku ve organlarda bulunan reseptörlerdir ve ağrının hoş gitmeyen bir durum olarak algılanmasını sağlarlar.

Nosiseptif ağrı, somatik ve visseral ağrı olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Somatik ağrı duyuşal lifler ile visseral ağrı ise sempatik liflerle taşınır. Somatik ağrı daha yoğun ve acı verici, visseral ağrı ise daha yaygın ve zor lokalize olabilen bir ağrıdır.

Nöropatik Ağrı

Nonnosiseptif ağrı için en yaygın kabul gören terminolojidir. Nöropatik ağrı, nörolojik bir yapı veya işlevin değişmesi ile ortaya çıkar. Nosiseptif ağrıdan en önemli farkı sürekli bir nosiseptif uyarının bulunmamasıdır. Santral ve periferik olmak üzere ikiye ayrılır.

Psikojenik Ağrı

Psikojenik ağrı tanısı konmadan önce diğer patolojileri dışlayacak araştırmalar yapılmalı ve gerekirse deneyimli bir psikiyatristten yardım alınmalıdır (28).

AĞRININ FİZYOLOJİSİ

Normalde ağrı (fizyolojik ağrı), impulsların miyelinli (A-delta) ve/veya miyelinsiz (C) nosiseptif sinir lifleriyle beyine iletilmesiyle oluşur. Bu afferent liflerin duyuşal uçları fizyolojik koşullarda sadece güçlü ve zararlı uyarılarla aktive olurlar ve beyin bunlarla gelen uyarıyı ağrı olarak algılar. Fizyolojik ağrı koruyucu bir işlev görür ve potansiyel bir harabiyete karşı uyarı sistemi olarak karşımıza çıkar, kolay lokalize olur ve geçicidir.

Periferik sinirler sinir lifinin çapına ve miyelinli olup olmadıklarına göre A (α , β , γ , δ alt grupları var), B ve C olarak sınıflandırılırlar. A ve B lifleri miyelinli, C lifleri miyelinsizdir. Miyelinli ince A-delta liflerinin uçları genellikle uyarıldıkları tipe göre mekanik veya termal nosiseptör adını alır. Keskin, iğneleyici, iyi lokalize edilen karakterde ağrı oluşturur ve 5-30 m/sn hızla iletilir. Miyelinsiz C liflerinin uçları şiddetli mekanik, kimyasal, aşırı sıcak ve soğuk uyarılarla aktive olur, 0,5-2 m/sn hızla uyarıyı iletir. Kunt, yaygın bir ağrı ve hiperestezi oluşturur.

Ağrı yoğun uyarılar altında sağlam nosiseptif afferent liflerin aktivitesinden kaynaklandığında “normal” nosiseptif sayılır. Güçlü, uzun süreli ve tekrarlayan uyarılar ağrı sistemini etkiler ve sıklıkla duyarlı hale gelmesine yol açar. Bu, artmış veya “patofizyolojik” ağrıya sebep olur. A-delta ve C liflerinin yanı sıra A-beta lifleri de bu ağrıda rol oynayabilir (1,27,29,30).

AĞRI MEKANİZMALARI

Periferik Mekanizmalar

Nosiseptif süreçlerin başlangıç noktası primer afferent nosiseptörlerdir. Bunlar kimyasal, termal ve mekanik uyarılara yanıt veren sinir uçlarıdır. Nosiseptörün yanıt özelliklerine göre uyarı sonucu spinal korda doğru bir yayılım başlar. Ağrılı uyarı 4 aşamada üst merkezlere doğru bir yol izler.

1.Transdüksiyon: Bir enerjinin başka bir tür enerjiye dönüşmesidir. Sinir uçlarındaki noksiyus uyarının elektriksel aktiviteye dönüştürülmesi olayıdır. Örneğin nosiseptörlerin normal bir ısıya duyarlı kalması, yüksek ısı ile duyarlı hale geçmeleri.

2.Transmisyon: Nosiseptörler tarafından algılanan ağrının üst merkezlere doğru iletilmesidir. Bu iletim üç aşamada incelenebilir; (I) nosiseptörlerden spinal korda kadar olan primer sensoryal yollar, (II) spinal korddan beyin sapı ve/veya talamusa uzanan çıkıcı yollar, (III) beyin sapı ve talamustan korteks postsentral gyrusa uzanan projeksiyon yolları.

Miyelinli A-delta lifleri uyarıyı hızlı ileten, sensitizasyona açık, mekanik ve termal uyarılar ile uyarılan liflerdir. Miyelinsiz C lifleri ise polimodal özellik gösteren, birçok uyarana karşı duyarlılığı olan, uyarıyı daha yavaş ileten liflerdir.

3.Modülasyon: Daha çok omurilik seviyesinde meydana gelen bir olaydır. Ağrılı uyarı spinal kord seviyesinde bir değişime uğramakta ve bu değişim sonrasında daha üst merkezlere iletilmektedir.

4.Persepsiyon: Omurilikten geçen uyarının bazı çıkıcı yollar aracılığı ile üst merkezlere doğru iletilip ağrının algılanmasıdır (27,30).

Santral Mekanizmalar

Ağrı iletiminde dorsal boynuzun lamina I kısmını oluşturan ve marjinal zone olarak isimlendirilen bölüm ile lamina II'yi oluşturup iç ve dış olarak ikiye ayrılan substantia jelatinoza'nın önemli rolü vardır. Nosiseptif sinir uçlarının santral terminalleri marjinal zone ve substantia jelatinoza'da yer alan nöronlarla sinaps yapar. Dorsal boynuzun diğer bir kısmı

olan lamina III ve V'i ise nükleus proprius oluşturur ve bu tabaka spinal kodda medüller dorsal boynuz olarak adlandırılır.

Dorsal boynuzda 3 grup hücre vardır:

1. Nosisseptif iletinin rostral dağılım ile anterolateral afferent sistemden üst merkezlere aktarımı sağlayan projeksiyon nöronları

2. Nosisseptif iletiyi projeksiyon nöronlarına ve diğer ara nöronlara aktaran eksitatör ara nöronlar

3. Nosisseptif iletiyi baskılayan inhibitör ara nöronlar (27).

Arka boynuz primer afferentlerin sonlandığı merkezdir. Genellikle Lamina I, II ve V'te sonlanırlar. Burada arka boynuzdaki ikinci sıra nöronlarla bağlantı kurarlar. Projeksiyon nöronları da 2 tiptir. Birinci tip Lamina I'de yoğun olarak bulunan ve sadece A-delta ve C lifleri ile eksite olan nosisseptif spesifik ya da yüksek eşik değerinde nöronlar, ikinci tip ise wide dynamic range (WDR) nöronlar olarak adlandırılır ve Lamina I ve V'te bulunur. Arka boynuzda farklı yerlerde bulunurlar ve farklı uyaranlara yanıt verirler. Nosisseptif spesifik nöronlar yüzeysel laminalarda yer alır ve özellikle ağırlı uyaranlara yanıt verirken, WDR nöronlar ise daha derin laminalarda yer alır ve hem ağırlı hem ağırsız uyaranlara yanıt verirler. Bu nöronlar normalde dokunma ile olan uyaranlara ağırlı ile yanıt vermezler. Ancak çeşitli faktörlerle aşırı hassas hale gelebilirler ve bu durumda dokunma uyarana karşı ağırlı yanıt verebilirler. Belirli bir nöron miktarının aktivitesi eşik değeri aştığı takdirde ağırsız olan dokunma uyarana ağırlı olarak algılanır ve allodini ortaya çıkar (26,30).

Arka boynuzdaki ağırlı sürecinde çeşitli nörotransmitter ve nöromodülatörler görev yapar. Özellikle glutamat ve aspartat gibi eksitatör aminoasitler arka boynuzda ağırlı uyarana iletiminde rol alırlar. N-metil-D-aspartik asit (NMDA), non-NMDA ve glutamat reseptörleri de görev alır. Primer afferentlerden salgılanan P maddesi, nörokinin A, CGRP gibi peptidler nosisepsiyonda rol alırlar. Nosisseptif transmisyon ya da modülasyonda yer alan diğer reseptörler opioid (mü, kappa), gama amino bütirik asit (GABA), alfa-adrenerjik serotonin (5HT) ve adenosin reseptörleridir.

N-metil-D-aspartik asit reseptörlerinin aktivasyonu hücrede yeni olaylara yol açmakta ve ağırlı uyaranlara karşı hassasiyeti arttırmaktadır. NMDA reseptör kanalı istirahat halinde magnezyum tıkacı ile bloke durumdadır. NMDA reseptörünün aktivasyonu, nörokinin reseptörlerinin aktivasyonuna ve magnezyum tıkaçının açılarak hücre içerisine kalsiyum girmesine bağlıdır. Bunun sonucunda onkojen indüksiyonu, NO oluşumu ve sekonder mesengerlerin içine fosfolipaz, polifosfoinosit, cGMP, eikozanoidler ve proteinkinaz C gibi

maddelerin aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu sekonder mesengerler hücrenin eksitabilitesini arttırmakta, onkojen üretimine yol açmakta ve hücrede uzun süreli değişikliklere yol açmaktadır (27).

Arka boynuzdaki ikinci sınıf projeksiyon nöronları ve ön boynuzdaki bazı nöronlar spinotalamik, spinoretiküler, spinomezensefalik yollarla supraspinal bölgelere ulaşır. Bu spinal yapılar spinal kord içinde kontralateral ve anterolateral kuadranda yer alırlar. Supraspinal yapılar talamustan kortekse kadar yaygın bir alan kaplar, talamusta ikiye ayrılırlar. Ağrının sensoryal diskriminatif özelliğini taşıyanlar; ventrokaudal ve ventroposterior talamus çekirdeklerinde sonlanır. Ağrının affektif motivasyonel yönleriyle ilgili olanlar; talamusun medial çekirdeklerinde sonlanır. Talamus dışında kaudat çekirdek, hipotalamus, hipokampus, serebellum gibi subkortikal yapılar da nosiseptif uyarının iletiminde ve ağrının algılanmasında görev almaktadır. Ağrının sensoryal diskriminatif yönü ağırlı uyarının yerinin belirlenmesi, tanımlanması ile ilgili özellikleridir. Ağrının her zaman subjektif olan şiddet ve benzeri özellikleri ise sensoryal diskriminatif komponenti oluşturur. Ağrıda hoş olmayan hisler ve diğer duygusal öğeler ise affektif motivasyonel komponenti oluşturur ve ağrının kişiden kişiye farklılık göstermesine neden olur (1,27,30).

Çeşitli çalışmalarda ağırlı uyarının sensoryal, motor, premotor, frontal, parietal, oksipital ve anterior singulat bölgeleri gibi kortikal yapıları etkilediği gösterilmiştir (30).

NÖROPATİK AĞRI

Nöral dokuda hasar veya hastalıkla ilişkili kronik ağrı olan nöropatik ağrı sık görülen çözümlenmemiş bir sağlık problemidir (29). Periferik veya santral sinir sisteminde harabiyet sonucu oluşur; yanma şekline kendini gösterir. Genelde opioidlere pek yanıt vermez, daha çok lokal anesteziyelere, antikonvülsanlara ve antidepresanlara yanıt verir (1).

International Association for the Study of Pain'in (IASP) tanımına göre nöropatik ağrı, sinir sisteminin primer lezyonuna veya disfonksiyonuna bağlı ya da metabolik hastalıklar sonucu gelişen ağrıdır (31). Genellikle analjeziklere yanıt vermeyen karmaşık bir ağrı sendromudur. Sinir sistemindeki lezyonun olduğu yere göre nöropatik ağrı santral ve periferik olarak iki gruba ayrılır (32).

Sık görülen periferik nöropatik ağrı tipleri; kompleks bölgesel ağrı sendromu, tuzak nöropatileri, diyabetik nöropati, fantom ağrısı, postherpetik nevralji, trigeminal nevralji,

radikülopati, kemoterapi ya da alkole bağı polinöropati ve inflamatuvar demiyelinizan poliradikülonöropatidir.

Santral nöropatik ağrı nedenleri arasında ise spinal stenoza bağı kompresif miyelopati, multipl skleroz ya da parkinson hastalığına bağı ağrı, iskemi veya radyasyon sonrası miyelopati, inme ya da post-travmatik medulla spinalis yaralanmasına bağı ağrı ve siringomiyeli sayılabilir (33).

Nöropatik ağrı, farklı bir nörolojik lezyon ile ortaya çıkan otonomik disfonksiyon veya sensoriyal bölgelerde bir dizestezi oluştuğunda düşünölmelidir. Ağrı eşığı düştüğü için normalde ağrısız olan uyarı ağrı yapabilir (allodini) veya uyarıya yanıt hem sürekli hem de amplitüd bakımından abartılı olabilir (hiperaljezi) (26).

Nöropatik ağrı prevalansı kapsamlı epidemiyolojik çalışmaların yapılmamış olması nedeniyle kesin olarak bilinmemektedir. Genel popölasyonun yaklaşık %1-1,5 kadarını etkilediğı öne sürölmektedir (34).

Nöropatik Ağrı Mekanizmaları

1.Periferik sensitizasyon: Periferik siniri etkileyen hastalıklar demiyelinizasyon ve/veya aksonal kayıp şeklinde histolojik değışikliklere yol açar. İnflamatuvar sürecin bir parçası olarak demiyelinizasyon ve aksonal hasar bölgelerine makrofaj, lenfosit ve mast hücreleri gibi çeşitli immün sistem hücreleri göç eder. Nosiseptif uyarının kendisi de nörojenik bir inflamasyon yanıtı oluşturarak; P maddesi, nörokinin A, Calcitonin Gene Related Peptid (CGRP), bradikinin, noradrenalin, histamin gibi aljezik maddelerin salgılanmasına neden olur. Bu peptidlerin salgılanması sensoryal ve sempatik sinir liflerinde uyarılmada değışikliğe, damarlarda genişlemeye, plazma proteinlerinin ekstrasvazasyonuna ve inflamatuvar hücrelerin çeşitli kimyasal mediatörler salgılamasına yol açar. Bu şekilde serotonin, P maddesi, nitrik oksit, siklooksijenaz ve lipooksijenaz yollarındaki inflamatuvar mediatörlerin salgılanması ile nosiseptörler uyarılır ve periferik sensitizasyon meydana gelir. Periferik sinir zedelenmesi sinir büyüme faktörünün (NGF) periferik gidişini engelleyerek dorsal kök gangliondaki duyuşal nöronları ve dolayısıyla sodyum kanallarının ekspresyonunu etkiler. Sodyum kanal ekspresyonundaki artışa bağı olarak ortaya çıkan ektopik aktivite, sensorial nöronlar ve sempatik efferent lifler periostal nosiseptörlerin etkilenmesi ile periferik, spinal sinir ve köklere bası ile nöropatik ağrı gelişebilir.

2. Ektopik deşarjlar: Sinir hasarı sonrası ortaya çıkan demiyelinizasyon nedeniyle sinir lifi boyunca ektopik uyarılar yayılmaya başlar. Bu ektopik deşarjlar hasar sonrası aylar, yıllar sürebilir. Ayrıca, aksonun zedelendiği yerde membran hipereksitabilitesi oluşur. Bu durum da ektopik deşarjların oluşmasına yol açar. Ektopik deşarjların görüldüğü en önemli bölgeler sinir hasarı olan bölge ve hasarla ilişkili dorsal kök gangliyonudur (DKG).

3. Santral sensitizasyon: Periferik sinir hasarı sonrası aşırı miktardaki sensoriyal uyarılar santral sinir sistemine ulaşarak dorsal boynuzda değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler sonucu hipereksitabl hale gelen nöronlar spontan aksiyon potansiyeli oluştururlar ve bu oluşan anormal yüksek frekanslı aktivite ağrıya katkıda bulunur. Normal istirahat membran potansiyelinde NMDA reseptör kanalları, magnezyum ile bloke durumdadır. NMDA reseptörünün uyarılmasıyla magnezyum blokajı ortadan kalkar ve kalsiyum hücre içine girmeye başlar. Kalsiyum iyonlarının hücre içine girmesi santral sensitizasyonun devam etmesini sağlar.

4. İnhibitör kontrollerin kaybı: Nöropatik ağrı oluşumunda korteksten spinal korda inen inhibitör kontrollerin kaybı önemli yer tutar. Dorsal yolaklar ile nosiseptif iletimi ayarlayan ana merkezler; somatosensoriyel korteks, talamus, hipotalamus, orta beyinde periakuaduktal gri madde, medullada raphe magnus çekirdeği ve spinal kord arka boynuzdaki ara bağlantılardır. Periakuaduktal bölgede serotonin, noradrenalin reseptörlerinin yanı sıra opioid reseptörler de bulunurlar. Nöropatik ağrı tedavisinde kullanılan antidepressanlar, serotonerjik ve noradrenerjik etkileri ile inen inhibitör yolakları etkiler ve nöropatik ağrıyı azaltırlar. Aynı şekilde nöropatik ağrı tedavisinde kullanılan opioid ilaçlar; periakuaduktal gri bölgedeki opioid reseptörlerini aktive ederler ve enkefalin salınımına yol açarlar. Enkefalinler de morfin reseptörü alt tiplerine bağlanarak etkilerini gösterirler, nöropatik ağrının azalmasına yol açarlar. (29,30,32,33,35)

Nöropatik Ağrı Semptomları

Allodini: Normalde ağrı yaratmayacak bir uyarı ile ağrı oluşması demektir. Aβ liflerin santral sensitizasyonu, Aβ liflerin santral reorganizasyonu, inhibitör kontrollerin kaybı, nosiseptörlerin periferik sensitizasyonu sorumlu tutulmaktadır.

Hiperaljezi: Ağrılı bir uyarana abartılı yanıt verilmesidir. Periferik duyarlılaşma sonucu ortaya çıkar. Sinir, arka kök, arka kordon zedelenmeleri sonrasında; multipl fonksiyonel ve yapısal, nörokimyasal ve moleküler değişiklikler sonucu oluşur.

Parestezi: Herhangi bir uyarana olmaksızın ortaya çıkan karıncalanma gibi ağrısız histir. Ektopik deşarj sonucu ortaya çıkar.

Dizestezi: Herhangi bir uyarana olmaksızın oluşan yanma gibi ağrılı histir. Santral duyarlılaşma sonucu ortaya çıkar. Vurucu-batıcı ağrı ise inhibitör kontrolün kaybı sebebiyle ortaya çıkar.

Hipostezi veya Hiperestezi: Vücuda zararlı olmayan bir uyarının azalan veya artan şiddete algılanması.

Hiperpati: Aşırı ağrı yanıtı. Tekrarlanan uyarılara karşı eşiğin düşerek cevabın artması (35,36).

Nöropatik Ağrı Nedenleri

I-Periferik sinir lezyonları

A-Lokal

- Tuzak nöropatileri
- Kompleks bölgesel ağrı sendromu (KBAS)
- Postherpetik nevrâlji
- Diabetik mononöropati
- İskemik nöropati
- Poliarteritis nodosa
- Posttravmatik nevrâlji

B-Diffüz

- Diabetes mellitus
- Amiloid
- Plazmositom
- Duysal herediter nöropatiler

- AİDS nöropatisi
- B Vitamini yetmezliği
- Toksik nöropatiler

II-Santral lezyonlar

- Dorsal kök gangliyonu (DRG) lezyonları
- Pleksus yaralanmaları
- Spinal kord traktus lezyonları (travma, tümör, siringomiyeli)
- Orta beyin-pons lezyonları
- Talamik lezyonlar (tümör, inme)
- Kortikal lezyonlar olarak sınıflandırılır (33,36).

Nöropatik Ağrı Tanısı

Nöropatik ağrı tedavisi için doğru tanı sağlanmalıdır. Tanıda ilk basamak ağrının yerinin, şiddetinin, süresinin, niteliğinin, azaltan ve arttıran faktörlerinin, yarattığı fiziksel ve psikolojik etkilerinin belirlenmesidir. Elektrodyagnostik çalışmalar (elektromiyogram ve sinir iletim hızı) gibi testler tanıda yardımcı olabilir. Nöropatik ağrı varlığında somatik veya otonom sinirler asimetrik segmental hiperemisyona veya hipoemisyona sebep olur. Termografi benzeri testler bazen otonomik disregülasyonun onaylanmasında yardımcı olabilir (37).

Nöropatik Ağrı Tedavisi

Nöropatik ağrı tedaviye dirençlidir ve gelişiminde değişik mekanizmalar rol oynadığı için kombinasyon tedavisi yapılması daha uygundur. Tedavide kullanılan ilaçlar:

- 1.Trisiklik Antidepresanlar
- 2.Membran stabilize edici ilaçlar
 - Antikonvülsanlar
 - Lokal anestezipler ve antiaritmik ilaçlar
- 3.Topikal terapi
 - Kapsaisin preparatları
 - Topikal NSAİİ
 - Topikal lokal anestezipler
- 4.NMDA antagonistleri

5.Diğer ilaçlar (klonidin, baklofen, tizanidin, adenozin) (38).

DENEYSEL NÖROPATİK AĞRI MODELLERİ

Deneysel ağrı çalışmalarında amaç ağrının doğasını, özelliklerini açıklamanın yanı sıra, herhangi bir maddenin ağrının algılanması üzerine etkisini farklı hayvan davranışları ile ortaya çıkarmaktır. Bugüne kadar geliştirilmiş ve kullanılmakta olan birçok hayvan modeli olmasına rağmen araştırmalarda doğru sonuca ulaşmak için en ideal modeli seçimde özen gösterilmelidir. Hayvan ağırlı uyaranlara motor davranışlarla yanıt verir. Yanıt genellikle basit bir refleks, vokalizasyon veya kaçmadır.

Önemli diğer bir konu da etik sorunları önlemek amacıyla deneklerin ve kontrol grubunun en az sayıda tutularak istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde etmektir (39).

Hayvanlarda geliştirilen, siyatik ve safen sinirlerin tam seksiyonu ile oluşturulan “nöroma modeli” olarak da bilinen, ilk ağırlı nöropati modeli 1979’da Wall ve ark. (40) tarafından geliştirilmiştir. Sıçanlara uygulanan parsiyel denervasyon ile oluşturulan en sık kullanılan periferik nöropatik ağrı modelleri; kronik konstriksiyon hasarına bağlı nöropati modeli (KKH), parsiyel siyatik sinir ligasyonuna bağlı nöropati modeli (PSSL) ve spinal sinir ligasyonuna bağlı nöropati modelidir (SSL).

Kronik Konstriksiyona Bağlı Nöropati Modeli

Spontan ağrıya ek olarak allodini ve hiperaljezi ortaya çıkaran bir hayvan modeli olarak ilk defa Bennett ve Xie (7) tarafından oluşturulmuştur. Sinir hasarı, sıçanların siyatik siniri çevresinde, siyatik sinir trifurkasyonunun proksimalinde, gevşek düğümler atılarak konstriktif ligatürasyon sağlanması yolu ile oluşturulur. Düğümler sadece siyatik siniri sıkıştırır, sinirin dolaşımını ve beslenmesini sağlayan damarları sıkıştırmaz. Böylece ligasyon, kan akımını azaltır ve birkaç hafta devam edecek olan intranöral ödeme neden olur. Bu işlem sonucunda deneklerin yarısından fazlasında ağrı duyusu belirtileri, ödem ve atrofik değişiklikler hasarı takiben 2 ila 7 gün içinde gözlenmeye başlar; 10-14 gün içerisinde en yüksek seviyeye ulaşır, yaklaşık iki ay devam ettikten sonra ortadan kaybolur. Yerine, o bölgede sürekli bir hiperestezi durumu oluşur. KKH’lı sıçanlar, etkilenen arka pençeyi sallama ve sık yalama gibi spontan ağrıyı işaret eden davranışlar, beraberinde cinsel istekte azalma ve kilo kaybı gibi sistemik belirtiler gösterirler. Isıya ve mekanik uyarana karşı hiperaljezi ve allodini gelişir. (41,42).

Parsiyel Siyatik Sinir Ligasyon Modeli

Seltzer ve ark. (9) tarafından tanımlanmıştır. Girişim için sıçanlarda ilk önce siyatik sinir çevre dokulardan ayrılarak dikkatli bir şekilde ortaya çıkarılır. İnce dikiş materyali siyatik sinirin dorsal yüzünden sinir kalınlığının 1/2-1/3'ünü içine alacak şekilde geçirildikten sonra sıkıca bağlanır. Böylece sinirin parsiyel ligasyonu sağlanır. Bu model, genellikle ototomi davranışı içermeyen spontan ağrı bulguları oluşmasını sağlar. KKH modelinden farklı olarak PSSL modeli, her iki arka pençede hiperestezi oluşmasına neden olmuştur. Bu nedenle PSSL modelinde yalancı opere grup ile deneğin iki ekstremitesi birbirinin kontrolü olarak değerlendirilemez. Ancak deney grubu ile yalancı opere grup arasında karşılaştırma yapılabilir. Son araştırmalar, bu modelde gelişen allodininin nöronal mekanosensitivitedeki kronik artışla beraber olduğunu göstermiştir. Buna rağmen termal hiperaljezinin nöronal duyarlılık artışı ile birlikte olmadığı düşünülmektedir (42).

Spinal Sinir Ligasyon Modeli

Bu model Kim ve Chung (8) tarafından geliştirilmiştir. Sıçanların arka pençesinin tek taraflı deafferentasyonu ile oluşturulur. Tek taraflı olarak lomber spinal sinirlerin bir veya iki tanesinin (L5 veya L5-6), dorsal spinal kökten çıktığı bölümün distalinde sıkıca konstriksiyonu sağlanır. Denek olarak genellikle sıçan kullanılır. Girişim için vertebral kolona lateral yaklaşımla paravertebral adaleler künt olarak disseke edilir. Vertebraların yan oluşumları aşılıp L5 ve L6 spinal sinirlerin vertebradan dağıldıkları alana ulaşılır ve bu noktada spinal sinirler sıkıca bağlanır. Böylece arka pençenin parsiyel ligatürasyonu sağlanmış olur (8).

NİTRİK OKSİT

Nitrik oksit; nitrojenin oksitlenmesiyle elde edilen, renksiz, zehirli bir gaz olarak tanımlanır. Bir nitrojen ile bir oksijen atomunun bileşiminden meydana gelen bir moleküldür.

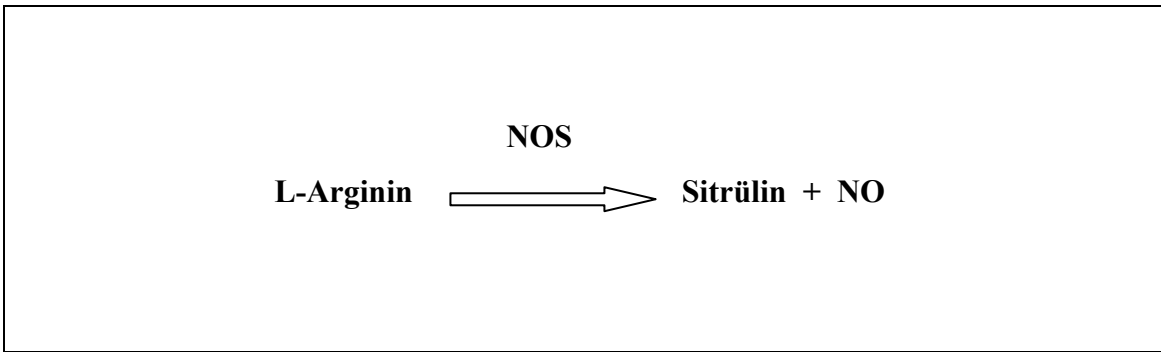
Nitrik oksit son yıllarda tanınan, birçok biyolojik olayda önemli rolü olduğu bilinen, çok kısa yarı ömürlü bir serbest radikaldir. Önceleri vasküler sistemde, endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak tanımlandı. 1987 yılında Palmer ve arkadaşları tarafından bu maddenin NO olduğu gösterildi (43).

Nitrik oksit, 1992 yılında Science dergisi tarafından yılın molekülü seçilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar NO'nun değişik bazı hücrelerde de sentezlendiğini ve organ fonksiyonlarını etkilediği ortaya çıkarılmıştır. Endotel kaynaklı vazodilatör faktörün NO

olduğu anlaşıldıktan sonra, bu molekülün beyin ve daha birçok hücre ve organ sistemlerinde üretilerek fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda etkili olduğu ileri sürülmüştür (44). NO, beyinde nörotransmitter, immün sistemde mediatör, kardiovasküler sistemde sağlam endotelin koruyucu mediatörü, vazodilatatör ve endojen antiaterojenik molekül olarak rol oynar.

L-Arginin (2-amino-5-guanidino pentanoic acid) diyet proteinlerinde doğal olarak bulunan proteogenik esansiyel bir aminoasittir. Protein metabolizmasının dışında kreatin, L-ornitin, L-glutamat ve poliamin sentezi gibi farklı metabolik yollara da girer. L-Arginin'in dekarboksilasyonu ile biyojenik amin metaboliti olan agmatine dönüştürülür. Ubiquitin-proteasome yolağında da protein degradasyonunda da bulunur. Önemli biyolojik yollardan olan NO sentezinde nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin substratı olarak görev alır (45).

Nitrik oksit, L-argininden sitrulin oluşumu sırasında, L-argininin guanidin nitrojen grubunun hidroksilasyonu ile oluşan ara üründür (şekil 1). Bu reaksiyon birden fazla NOS enzimi tarafından katalize edilir (Tablo 1). NOS enzimleri, yapısal (constitutive) nitrik oksit sentaz (cNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Yapısal NOS enzimleri vasküler endotelde, nöronlarda ve plateletlerde bulunur (46). Nöronlarda bulunan, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), endotel hücrelerinde bulunan endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) olarak adlandırılır. İndüklenebilir NOS kardiyomyositler, hepatositler, nöronlar, mikroglial hücreler, nötrofiller, vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde bulunur. Yapısal NOS tarafından yapılan nitrik oksit, hücreler arası ve hücre içi haberleşmede rol oynar. Yapısal NOS enzimleri, ortamdaki kalsiyum konsantrasyonlarının artışından etkilenirken, iNOS etkilenmez (47).



şekil 1. Nitrik oksit sentezi

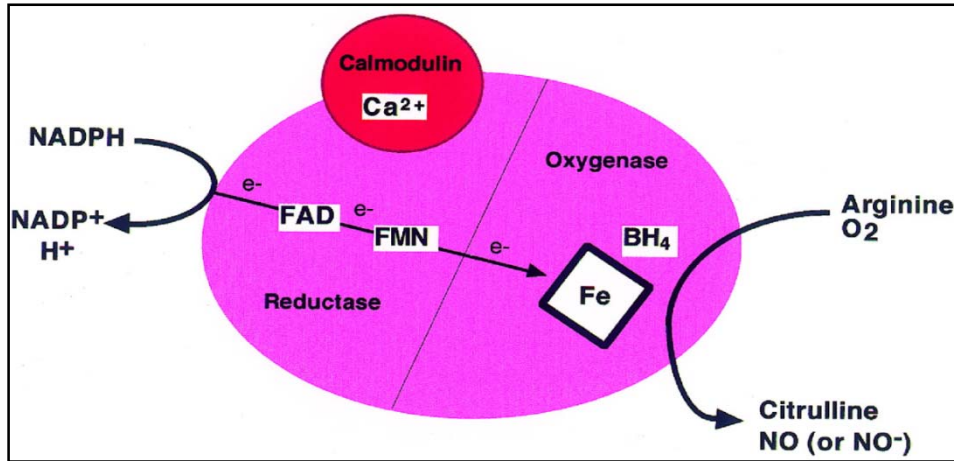
NOS: Nitrik oksit sentaz

Tablo 1. Nitrik oksit sentaz izoformları (48)

NOS İzoform	Diğer adı	Salınım	Kaynak	Regülasyon	NO afinitesi	Kromozom
Tip 1	nNOS	Devamlı	Sinir hücreleri	Ca ⁺⁺ a bağımlı	Düşük	12
Tip 2	iNOS	İndüklen- diğinde	Makrofaj, damar düz kası, damar endoteli, miyokard, endokard, immün hücreler, hepatosit	Sitokinler, endotoksin ve oksidanlarla indüklenme	Yüksek	17
Tip 3	eNOS	Devamlı	Vasküler endotel hücreleri, trombositler, miyokard, endokard, mast hücreleri, nötrofiller	Ca ⁺⁺ a bağımlı	Yüksek	7

NOS: Nitrik oksit sentaz; **nNOS:** Nöronal nitrik oksit sentaz; **iNOS:** İndüklenebilir nitrik oksit sentaz; **eNOS:** Endotelial nitrik oksit sentaz.

Nitrik oksitin sentezlendiği reaksiyonda kofaktör olarak flavin mono nükleotit (FMN), flavin adenin nükleotit (FAD), kalmodulin, tetrahidrobiopterin (BH₄), kosubstrat olarak ise nikotinamid adenin dinükleotit (NADPH) ve oksijen görev yapmaktadır (Şekil 2). Reaksiyon sırasında oluşan sitrulin, endotel hücre kültüründe yapılan çalışmalar sonucunda üreden gelen bir azot atomuna eklenmesiyle arginine geri dönüşmektedir.



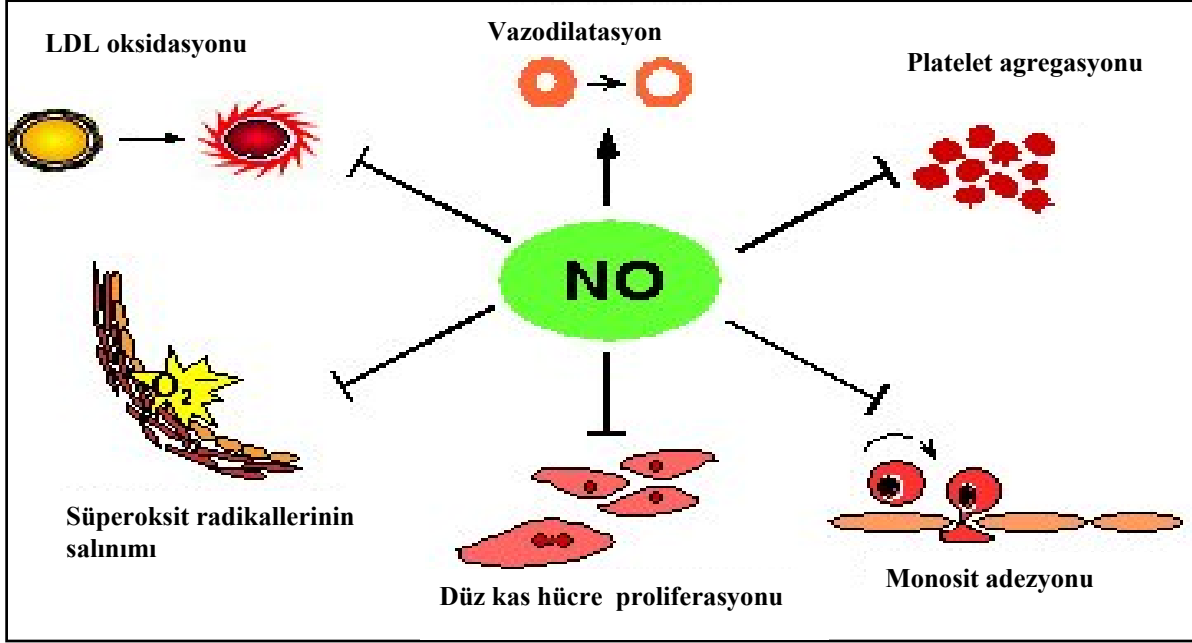
Şekil 2. Nitrik oksit sentezi ve sentezde rol alan moleküller

BH₄: Tetrahidrobiopterin; **FAD:** Flavin adenin dinükleotit; **FMN:** Flavin mononükleotit; **NADP:** Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside); **NADPH:** Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte).

Lipid membranlardan kolayca geçerek demir veya sülfür içeren proteinlere bağlanır. Özellikle guanilat siklaz enziminin hem grubuna bağlanarak enzimi aktif hale getirir. Bu

enzim guanozin trifosfatı (GTP) siklik guanozin monofosfata (cGMP) dönüştürür. Oluşan cGMP hücre içi kalsiyum miktarını düşürerek düz kaslarda gevşeme oluşturur (43).

Nitrik oksitin kalp damar sistemi, beyin, periferik sinir sistemi ve immun sistem üzerinde önemli etkileri mevcuttur (Şekil 3, Tablo 2).



Şekil 3. Nitrik oksitin önemli rolleri (49)

Tablo 2. Nitrik oksitin sistemler üzerine etkileri

Sistem	Nitrik oksitin fonksiyonu
Kalp damar sistemi	Tonik vazodilatasyon, damar duvarına hücre adezyonunun engellenmesi, trombosit aktivasyonunun inhibisyonu, ateroskleroz oluşumunun geciktirilmesi, anjiyogenez stimülasyonu
Beyin	Nörotransmisyon
Periferik sinir sistemi	Ağrı oluşumunun regülasyonu, barsak ve damarlarda nonadrenerjik, nonkolinerjik transmisyon
İmmun sistem	Sitotoksisite, immün hücre fonksiyonunun regülasyonu

Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörleri

1. L-arginin yapısal analogu olan inhibitörleri:

- L-NMMA (monometil-L-arginin)
- L-NA (nitro-L-arginin)
- L-NAME (nitro-L-arginin metilester)
- ADMA (asimetrik dimetil arginin)

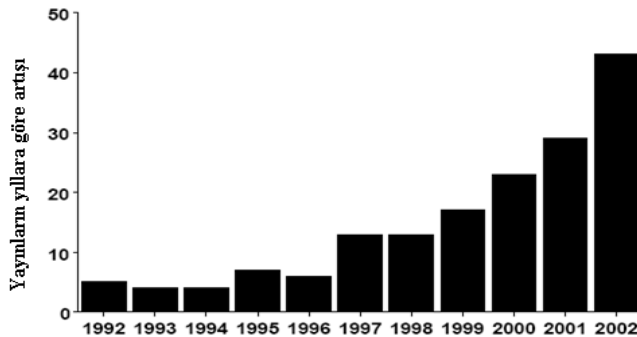
2. L-arginin analogu olmayan inhibitörleri:

- 7-NI (7-nitroindazol)
- L-NIO (iminoetil-I-orнитin)
- L-N-(1-iminoetil) lizin
- merkaptoetilguanidin
- aminoguanidin (50).

ASİMETRİK DİMETİLARGİNİN

Asimetrik dimetilarginin doğal olarak ortaya çıkan, plazmada dolaşan idrar ile atılan, hücre ve dokularda bulunan bir aminoasittir. NO metabolizması ile ilişkisi ortaya çıktığından beri plazmadaki konsantrasyonunun ölçülmesi ile ilgili araştırmalar önem kazanmıştır.

İlk olarak 1992 yılında Londra'da Vallance ve ark. (51) tarafından, insan plazma ve idrarında tanımlanmıştır. Bu çalışmadan sonra moleküle olan bilimsel ve klinik ilgi katlanarak artmıştır, buna bağlı olarak ADMA ile ilgili yayınlar çoğalmıştır (52) (Şekil 4).



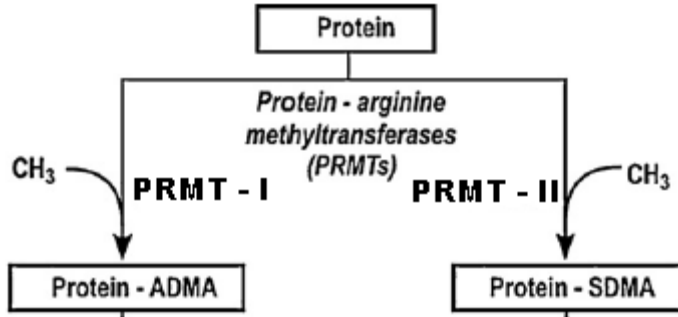
Şekil 4. Asimetrik dimetilarginin ile ilgili yayınların yıllara göre artışı (53)

Asimetrik dimetilarginin NOS'un endojen kompetitif inhibitörüdür (53). ADMA, L-arginin ile yarışmalı bir şekilde yer değiştirerek NOS'u inhibe eder ve NO oluşumunu azaltır.

NOS'un inhibisyonu sadece vazodilatasyona sebep olmaz aynı zamanda NO'nun etkilediği diğer biyolojik fonksiyonların oluşmasını engeller. Sonuç olarak pro-aterojenik duruma neden olur.

Asimetrik Dimetilarginin Sentez ve Metabolizması

Asimetrik dimetilarginin translasyon sırasında proteinlerin yapısına giren arginin'in, postranslasyonel modifikasyonla metillenmesi esnasında PRMT (protein arginin metil transferaz) enzimi tarafından sentezlenir. Bu enzim metil grubunu S-adenozil-metiyonin'den (SAM) CH₃ alır ve proteinin yapısındaki arginine aktarır (Şekil 5).

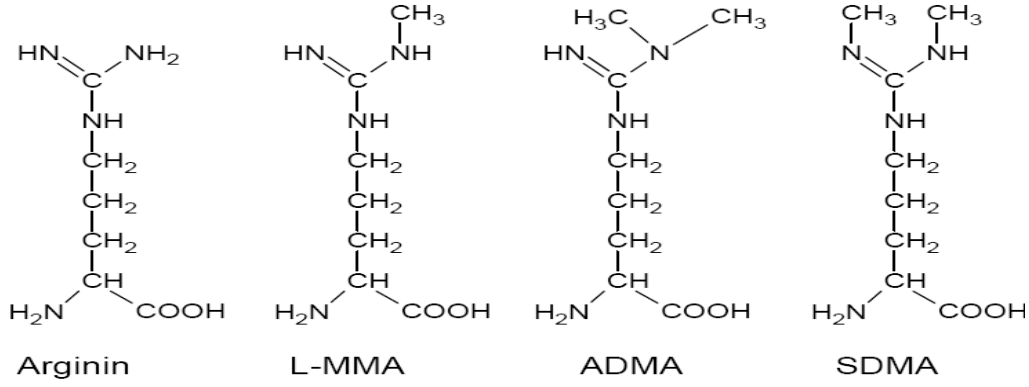


Şekil 5. Protein arginin metil transferaz enzim tipleri ve ürünleri

PRMT: Protein arginin metil transferaz.

Asimetrik dimetilarginin sentezinde rol alan PRMT enziminin 2 farklı tipi tanımlanmıştır. Bunlar PRMT-1 (Protein Arginin Metiltransferaz-1) ve PRMT-2 (Protein Arginin Metiltransferaz-2) dir. PRMT-1 histon ve RNA binding proteini metiller ve ADMA ve L-NMMA oluşturur. PRMT-2 ise sadece miyelin basic proteini metiller ve SDMA ve L-NMMA oluşturur. L-NMMA, NOS enzimini ADMA ile aynı güçte inhibe eder fakat plazma konsantrasyonu ADMA'dan 10 kat daha düşüktür. SDMA'nın plazma konsantrasyonu ADMA ile eşit seviyededir, ancak NOS üzerine bir etkisi yoktur.

Metillenmiş bu arginin türevleri yapısında bulunduğu proteinin proteolizi sonucunda serbest kalır. Arginin hangi uçlarından metillendiyse ona göre proteoliz sonucu ADMA, SDMA, L-NMMA'dan birisi ortaya çıkar (Şekil 6).



Şekil 6. Metilenmiş arginin türevleri

ADMA: Asimetrik dimetilarginin; **L-MMA:** Monometilarginin; **SDMA:** Simetrik dimetilarginin.

Protein arginin metiltransferaz enzim sistemi, S-adenozilmetiyoninden (SAM) bir metil grubunu S-adenozilhomosistein (SAH) oluşturmak üzere arginine transfer eder ve homosisteine hidrolize olur.

Asimetrik dimetilarginin ve L-NMMA, DDAH (Dimetilarginin Dimetil Aminohidrolaz) ile sitrülün ve dimetilamin ya da monometilamine indirgenir.

Dimetilarginin dimetil aminotransferaz'ın 2 formu bulunmaktadır. DDAH-1 daha çok nNOS içeren dokularda, DDAH-2 ise eNOS ya da iNOS içeren dokularda mevcuttur. Biyokimyasal olarak DDAH'ın inhibisyonu ADMA'yı artırırken NO üretimini azaltmaktadır. DDAH başlıca, endotel hücreleri, beyin, pankreas gibi pek çok organda bulunur. ADMA metabolizmasından sorumlu başlıca organlar karaciğer ve böbreklerdir. ADMA, NOS'un üç formunun da kompetitif inhibitörüdür.

Sağlıklı bir bireyde günde 60 mg ADMA sentezlenir. Bunun 10 mg'ı böbreklerden atılır. Kalan 50 mg da DDAH enzimi ile sitrülün ve dimetilamin'e dönüştürülür. DDAH enzimatik metabolizmasını hiperlipidemi, diyabet, hipertansiyon, homosisteinemi, inflamatuvar sitokinler ve ajanlar, yüksek doz eritropoietin, yaşlılık, sigara içimi inhibe eder (16).

Asimetrik dimetilarginin birikimine öncülük eden mekanizma bozulmuş DDAH metabolizmasıdır. Pek çok çalışmada ADMA birikimi azalmış DDAH aktivitesi ile birlikte dir. Sisteinden indirgenen sülfhidril (SH) grubu DDAH aktivitesi için önemlidir. Bu enzim de oksidatif strese duyarlıdır. Oksidatif stresin ADMA oluşumunu, endotel hücrelerinde artmış PRMT-1 ekspresyonuyla serbest oksijen türleri açığa çıkararak stimüle edebildiği açıklanmaktadır. Ayrıca DDAH inaktivasyonu, SH grubunun nitrozilasyonu, iNOS tarafından aşırı miktarda NO üretimi olduğunda meydana gelebilir. iNOS tarafından

proinflatuar sitokinler oluşturulduğunda NO üretimi sınırlanabilir, bu da ADMA birikimine sebep olabilir. DDAH aktivitesindeki artış ise NO sentezini daha da artırır, bu durum ADMA sentezinde azalmaya neden olur (54).

Asimetrik dimetilarginin düzeyinin artmasında dört mekanizma rol oynayabilir.

1. Proteinlerin PRMT ile metilasyonunda artma
2. Proteinlerin proteolizinde artmaya bağlı olarak metillenmiş türevlerin ortaya çıkışında artış
3. Renal atılımın bozulması
4. Metillenmiş türevlerin DDAH enzimi ile metabolizmasının azalması

Asimetrik dimetiargininin endotel disfonksiyonu için yeni bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmektedir. Ateroskleroz, konjestif kalp yetmezliği, hipertansiyon, preeklampsi, erektil disfonksiyon ve pek çok kardiyovasküler hastalıklarda plazma ADMA düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (55).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma; yerel etik kurul onayı alındıktan sonra (Ek 1) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Ek 2).

DENEKLER VE DENEY DÜZENİ

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında üretilmiş, ortalama 200-250 gram ağırlığında, 8-10 haftalık, 100 adet Sprague Dawley erkek sıçan kullanılması planlandı. Tüm denekler standart laboratuvar koşullarında barındırıldı. Beslenmeleri için standart sıçan yemi ve musluk suyu verildi, hayvanlar deney ortamına adaptasyon için 24 saat önce laboratuvar ortamına getirildi. Kronik ağrı deneyleri yaklaşık 2 ay süreyle devam edeceğinden, bu süre içinde aşırı zayıflayan ve hastalanan sıçanların deneyden çıkarılması planlandı.

Deneyleerde sıçanlar rastgele seçilerek 20'şerli 5 gruba ayrıldı.

I.Grup: 8 hafta beslenecek nöropatik sıçanlar (10 adet) + 8 hafta beslenecek kontrol grubu sıçanlar (10 adet),

II.Grup: 4 hafta beslenecek nöropatik sıçanlar (10 adet) + 4 hafta beslenecek kontrol grubu sıçanlar (10 adet),

III.Grup: 2 hafta beslenecek nöropatik sıçanlar (10 adet) + 2 hafta beslenecek kontrol grubu sıçanlar (10 adet),

IV.Grup: Akut L-arginin uygulanacak nöropatik sıçanlar (10 adet) + Akut L-arginin uygulanacak kontrol grubu sıçanlar (10 adet),

V.Grup: Kronik L-arginin uygulanacak nöropatik sıçanlar (10 adet) + Kronik L-Arginin uygulanacak kontrol grubu sıçanlar (10 adet)

İlk 3 gruptaki deneklerin ADMA değerlendirilmesi sonucu anlamlılık ifade ederse sonraki gruplara devam edilmesi kararlaştırılmıştı. Ancak bu değerler anlamlı olmadığından deney ilk 3 grubun incelenmesi sonucu sonlandırıldı.

Deney hayvanlarından intrakardiyak kan alındı. Alınan kanların plazmaları ayrıldı ve -80 °C’de ADMA ölçümlerinin yapılacağı güne kadar saklandı.

Deneyde kullanılmış olan tüm hayvanlar yüksek doz anestezi ile öldürüldü.

SİYATİK SİNİR LİGASYONU

Deney öncesinde tüm denekler önce tartıldı, kuyrukları boyandı ve numaralandırılmış olan kafeslere konarak karışma ihtimali ortadan kaldırıldı.

Denekler ketamin (90 mg/kg) + ksilazin (10 mg/kg) anestezisi yapılmasından hemen sonra sağ alt ekstremitesinin siyatik sinir bölgesine uyan kısmın tüyleri temizlendi ve antiseptik olarak *batticon* kullanılarak, ışık altında keskin bistüri ucu ile çevre dokular travmatize edilmeden trochanter major ile popliteal fossa arasında siyatik sinir bulundu, Seltzer ve ark.nın (9) sıçanlarda yaptıkları şekilde siyatik sinirin dış kısmının ½ ila 1/3’ü “USP 6/0 metrik 13mm 3/8 yuvarlak propilen atravmatik” ile 1 düğüm atılarak bağlandı. Kas dokusu “USP 3/0 metrik 30mm 1/2 yuvarlak katgüt krome atravmatik” iplik 2 dikiş kullanılarak, cilt ve cilt altı dokusu “USP 3/0 metrik 26mm 3/8 keskin ipek atravmatik” iplik 3 dikiş atılarak kapatıldı ve pansuman yapılarak işleme son verildi. Kontrol grubunda (sham grubu) ise siyatik sinir ortaya çıkarılarak, herhangi bir işlem yapmaksızın tüm tabakalar dikilerek pansuman yapıldı. Benzeri sinir zedelenmesi girişimlerinin birkaç gün sonrasında başlayıp 1 aydan daha uzun süreyle devam eden allodini ve hiperaljezi gibi nöropatik ağrının bazı davranışsal belirtilerinin ortaya çıktığı bilinmektedir (7,9,41,56,57). Uygulayacağımız cerrahi girişimden sonra da aynı belirtilerin ortaya çıkmasını beklediğimizden; allodini ve hiperaljezi ölçümleri deneyden sonraki 2 ay boyunca her üç günde bir yapıldı.

ALLODİNİ VE HİPERALJEZİ ÖLÇÜMLERİ

Mekanik allodini ölçümleri Dynamic Plantar Aesthesiometer cihazı (Ugo Basile, Varese, İtalya) ile yapıldı. Von Frey filamentlerinin çalışma prensiplerinin esas alındığı bu cihazda dokunmaya bağlı hassasiyet ölçümü yapılmaktadır (58). Denekler metal tabla üzerine yerleştirildikten sonra uyum sağlaması için 15 dk beklendi ve uyarıcı prob (çelik çubuk, çapı

0,5 mm) sağ arka pençenin plantar yüzüne gelecek şekilde yerleştirildi. Hayvan hareketsiz olduğunda cihaz çalıştırılarak metal filament yukarı doğru yükseltildi ve arka pençenin plantar yüzeyine önceden ayarlanmış parametre değerlerine (25 sn süreyle 0-50 g arasında artacak şekilde dik olarak) uygun olarak artan şiddette güç uygulandı. Hayvan arka pençesini çektiğinde mekanik uyarı otomatik olarak sonlanmakta olduğundan hayvanın ayağını çektiği andaki değer cihaz tarafından kaydedildi. Bu değerın belirlenmesi için ardarda yapılan üç ölçümün aritmetik ortalaması alındı.

Termal hiperaljezinin değerlendirilmesi Plantar test cihazı (May-Com, Ankara, Türkiye) ile Hargreaves metodu kullanılarak yapıldı (59). Ölçümler için, farelerin arka ayak pençelerinin plantar yüzeylerinin ortasına fokuslanmış ışıık demeti şeklinde aşağıdan radyan ısı uygulandı. Denekler pençelerini çektikleri anda ısı uygulaması otomatik olarak sonlandı ve en yakın 0,1 saniye belirtilecek şekilde uygulama süresi cihazdan okundu. Sıçanların deneye başlamadan en az 15 dk önceden ortama alışmaları sağlandı ve doku zedelenmesini önlemek için cut-off süresi 10 sn olarak belirlendi.

ARGİNİN VE METİLENMİŞ ARGİNİN TÜRLERİNİN ÖLÇÜMÜ

L-Arginin, L-homoarginin, ADMA ve SDMA ölçümleri Teerlink tarafından (60) tariflenen metoda göre HPLC cihazında ölçüldü.

Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3-merkaptopropionik asit, OPA (Fluka, Almanya); amonyak, asetonitril, metanol, L-arginin, HCl, Borik asit, KH_2PO_4 , KOH, NaOH (Merck&Co, Inc, Darmstadt, Almanya); asimetrik dimetilarginin, homoarginin, monometilarginin, simetrik dimetilarginin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seenheim, Almanya).

Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Elektronik tartı (Denver Instrument APX-200, ABD), guard kolon (Waters Symmetry C18 5 μ m 3.9x20 mm, ABD), HPLC cihazı (Waters 2690 Alliance, Separations Module, ABD), distile su cihazı (Millipore, France), vorteks (Nüve NM110, Türkiye), manyetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001, Almanya), pH metre (Inolab WTW pH level 1, Almanya), soğutmalı santrifüj (Hettich Micro 220R, Almanya).

Yazılım ve Ekipman

Asimetrik dimetilarginin düzeyleri Waters Alliance 2690 XE, Model 474 floresan dedektör ve Millennium 32 Software kullanılarak ölçüldü. Örneklere solid faz ekstraksiyonu (20 kolon kapasiteli vakum manifoldlu SPE, Waters) uygulandı.

Kullanılan Solüsyonlar

Arginin stok solüsyon: MA: 174,20 gr, 10 mM HCl. 174 mg arginin 10 mL HCl içinde çözüldü ve 100 mM stok solüsyon elde edildi. Bu solüsyon 1:100 dilüe edilerek 1 mM'a ulaşıldı.

Homoarginine stok solüsyon: MA:224,69 gr, 10 mM HCl. 225 mg homoarginin 10 mL HCl içinde çözüldü ve 100 mM stok solüsyon elde edildi. Bu solüsyon 1:100 dilüe edilerek 1 mM ulaşıldı.

Asimetrik dimetilarginin stok solüsyon: MA: 275,18 gr, 10 mM HCl. 50 mg ADMA 18.17 mL HCl içinde çözüldü ve 10 mM stok solüsyon elde edildi. Bu solüsyon 10 kez dilüe edilerek 1 mM'a ulaşıldı.

Simetrik dimetilarginin stok solüsyon: MA: 758,82 gr, 10 mM HCl. 25 mg SDMA 33 mL HCl içinde çözüldü ve 1 mM stok solüsyon elde edildi.

Combine working standard: Arginin, homoarginin, asimetrik dimetil arginin (ADMA) ve simetrik dimetil arginin (SDMA)'in 1 mM'lık stok solüsyonlarından 10 mM HCl içinde 100 µM arjinin ve 10 µM homoarjinin, ADMA ve SDMA içeren bir karışım oluşturuldu.

Monometilarginin: MA: 248,28 gr, 10 mM HCl. 5 mg MMA 20,1 mL HCl içinde çözüldü, 1 mM stok solüsyon elde edildi. Bu solüsyondan 50 adet eppendorf tüpüne her birine 50 µL olacak şekilde dağıtıldı, kalanı (17,5 mL) bir tüp içinde saklandı. (Her yığın çalışmada 1 eppendorf alınıp üzerine 1200 µL PBS eklenerek 40 µM final konsantrasyon elde edildi (İnternal Standart).

Fosfat tampon solüsyonu: 1 mM NaH₂PO₄ + 9 mM Na₂HPO₄ + 137 mM NaCl hazırlandı. pH değeri, 1M NaOH ve HCl ile 7'ye ayarlandı.

Potasyum borat buffer: 200 mM (100 mL) olacak konsantrasyonda 50 mL borik asit içinde hazırlandı. KOH eklenerek pH 9,5'a getirildi ve 100 mL'ye tamamlandı.

Orto-ftaldialdehid stok (derivatizasyon reageni): MA: 134,13 gr, MeOH. 10 mg orto-ftaldialdehid (OPA) 0,2 mL MeOH içinde çözüldü, 1,8 mL 200 mM Potasyum Borat Buffer (pH: 9,5) eklendi, daha sonra 3 µL -merkaptopropionik asit eklendi böylece 0,2 mL'de 10 mg OPA içeren stok solüsyon elde edildi.

Orto-ftaldialdehid final: OPA stok türevlendirmeden hemen önce Borat buffer ile 5 kez dilüe edildi ve böylece 7,5 mM konsantrasyonda OPA final elde edilmiş oldu. 48 saat içinde kullanıldı.

Mobil faz A: 6,8 gr KH₂PO₄ 980 mL suda çözüldü. KOH ile pH 6,5'e ayarlandı, filtreden süzülerek ve hacim 1L'ye tamamlandı. Hazırlanan tampona 95,3 mL asetonitril eklendi ve ultrasonik banyoda 30 dakika bekletildi.

Mobil faz B: Su ve asetonitrilin hacimce yarı yarıya (50/50) karıştırılmasıyla elde edildi.

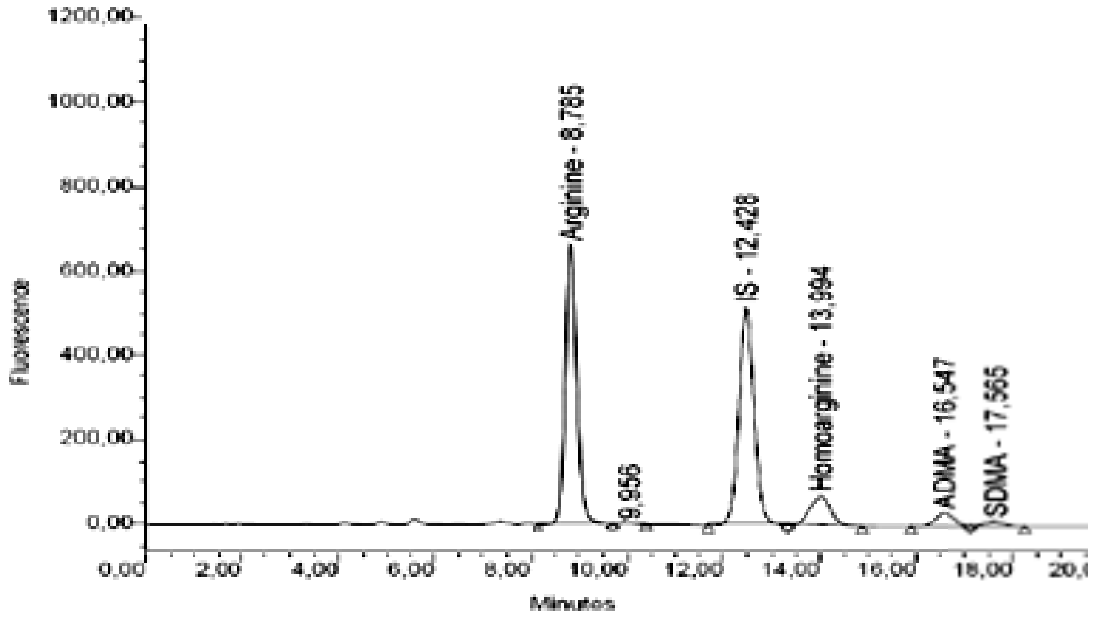
Örnek Saflaştırma ve Türevlendirme

Santrifüj (3000g x 10 dakika) ile elde edilen serum örnekleri ve standartlara SPE uygulandı. Rutin protokol, 3 mL'lik temiz bir cam tüp içine 0,2 mL örnek (veya Standart), 0,1 mL internal standart ve 0,7 mL PBS konuldu ve vortekslendi, ön koşullama yapılmaksızın Oasis MCX SPE kolondan (vakum altında, 1 mL/dk hızla) geçirildi. Örneklerin uygulanmasından sonra kolon sırayla 0,1 mL 100 mM HCl ve 1,0 mL metanol ile yıkandı. Analitler 3,0 mL'lik tüplere, 1,0 mL konsantre amonyak/su/metanol (10/40/50) ile Oasis MCX SPE kolondan elüe edildi. Tüpteki solvent 60-80°C'de nitrojen ile uçuruldu. Tüpe 0,1 mL KH₂PO₄ (200 mM) eklenerek tüpün içinde kalan analitler çözdürüldü. Son olarak 0,1 mL OPA reageni tüpe konularak vortekslleme işlemi tekrarlandı. 3 dakika beklendi tekrar

vortekslendi ve örnek otosampler viallere aktarılıp kompartmana yerleştirildi. Kromatografide örnek kompartmanı 7 °C'ye ayarlandı.

Kromatografi

Kromatografi Symmetry C18 kolon (3,9 x150 mm; 5 µm partikül büyüklüğü; 100 Å pore büyüklüğü) ve 3,9 x 20 mm Sentry Symmetry C18 guard kolon üzerinde alındı. Mobil faz A %8,7 asetonitril içeren 50 mM potasyum fosfat tampon (pH 6,5); mobil faz B ise asetonitril/su (50/50, v/v) olacak şekilde hazırlandı, seperasyon izokratik koşullarda, %100 mobil faz A ile, 1,1 mL/dak hız ve 30°C kolon sıcaklığı değerlerinde yapıldı. Son analitin çıkışından sonra güçlü bir şekilde retansiyona uğrayan bileşikler güçlü solvent akımı (%50 B 20-22 dakikalar arası) ile dilüe edildi, 22. ve 23. dakikalar arasında gradient başlangıç değerlerine döndürülerek kolon 7 dakika daha dengelenmeye bırakıldı; böylece toplam çalışma süresi her örnek için 30 dakika olacak şekilde ayarlandı (Tablo 3). Enjeksiyon hacmi 20 µL seçilerek, fluoresans eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 340 ve 455 nm olarak ölçüldü. Elde edilen pikler, pik alanlarında göre değerlendirildi (Şekil 7).



Şekil 7.Örnek kromatogram

IS:İnternal standart; ADMA: Asimetric dimetilarginin; SDMA: Simetric dimetilarginin.

Kalibrasyon

Internal standardın eklenmesinden sonra standartlara SPE, derivatizasyon ve kromatografi uygulanarak bunlara ait pikler alındı. Plazma örneklerinin ölçümü için 100 µM arginin ve 10 µM homoarginin, ADMA ve SDMA ile tek-nokta kalibrasyonu yapıldı.

Tablo 3. Mobil faz gradient tablosu

Zaman (dakika)	Akış hızı (ml/dk)	Eluent A (%)	Eluent B(%)
0	1,1	100	0
18 ^a	1,1	100	0
19	1,1	50	50
22	1,1	50	50
23	1,1	100	0
30 ^b	1,1	100	0
35	1,1	100	0
36	1,1	0	100
50	1,1	0	100

^a 18-23. dakikalar arasında güçlü solvent akışı, kalan bileşiklerin çıkarılması için; ^b 30. dakikada bir sonraki enjeksiyona geçildi. Tüm analizler yapıldıktan sonra kolonu temizlemek için 30. dakikadan sonraki kısım uygulandı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

SigmaStat for Windows Version 3.5 kullanılarak yapılan kestirim sonucu örnek büyüklüğü 9'dur, ancak deney bitiminde deneklerden intrakardiyak kan alınacak olup, yaklaşık %10 oranında yeterli derecede kan alınamayan denek olabileceğinden grup başına hayvan adedi 10 (n=10) olarak belirlendi. Siyatik siniri bağlanmış sıçanlarda allodini ve hiperaljezi oluşumu kontrole göre karşılaştırmak için iki yönlü varyans analizi (Two-Way ANOVA), ardından (*Post hoc*) Bonferroni t-testi uygulandı. Siyatik siniri bağlanmış sıçanlar ile kontrol grupları ADMA, SDMA, L-arginin, L-homoarginin plazma düzeylerinin karşılaştırmak amacıyla tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA), ardından (*Post hoc*) Bonferroni t-testi uygulandı. Aynı grup (ör. Grup I: 10 SSB + 10 Kontrol) içindeki sıçanların ADMA, SDMA, L-arginin, L-homoarginin plazma düzeyleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için korelasyon ve regresyon analizi ile istatistiksel değerlendirme yapıldı. P < 0.05 olan değerler istatistiksel yönden anlamlı kabul edildi. Örnek büyüklüğü kestirimi ve Two-Way ANOVA dışındaki istatistiksel analizler Graphpad Prism for Mac OSX Version 5.0c kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Nöropatik ağrı oluşumu, mekanik allodini ve termal hiperaljezi ölçümleri sıçanın pençesini çektiği süre ve bu sırada uygulanan kuvvet göz önüne alınarak hesaplandı. Nöropatik ağrı oluşturulan değişik gruplarda bulunan denekler ile kontrol gruplarının farklı sürelerde intrakardiyak kanları alınıp plazma ADMA, SDMA, arginin, homoarginin düzeyleri ölçülmüş ve aralarındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

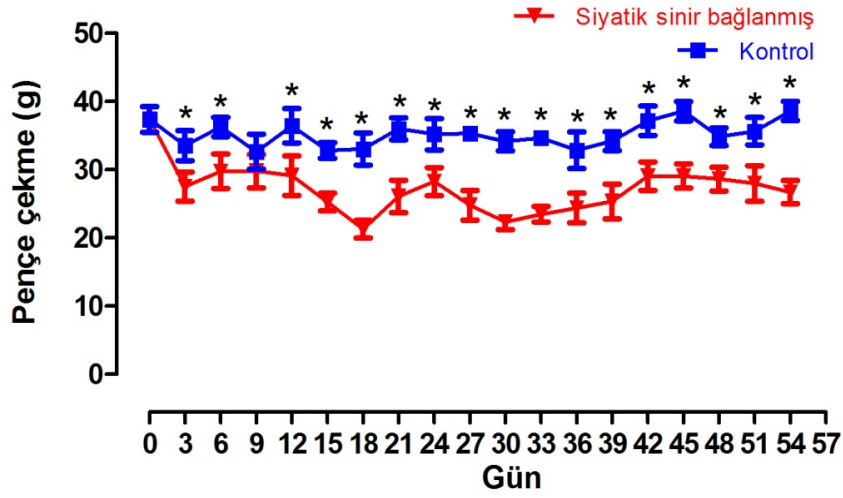
ALLODİNİ VE HİPERALJEZİ OLUŞUMU

Siyatik sinirin 1/2-1/3 kısmı bağlanan gruplar ile kontrol grupları arasında 2 haftalık, 4 haftalık, 8 haftalık grupların 0., 3., 6., 9.,.....,54. günlerdeki allodini ve hiperaljezi ölçümleri istatistiksel olarak değerlendirildikten sonra 1. ve 2. grupta allodini ölçümlerinde anlamlı değişim saptanmıştır (Şekil 7,9, p<0.05). Bu durum cerrahi girişim yapıldıktan sonraki süreçte hayvanlarda nöropatik ağrının davranışsal belirtisi olan allodininin geliştiğini göstermektedir. Grup 3' te muhtemelen ölçüm sayısının azlığına bağlı olarak allodini gelişimi istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmemiştir (Şekil 11). Nöropatik ağrının diğer bir göstergesi olan hiperaljezi ise ölçüm yapılan her 3 grupta da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 8,10,12).

Grup I Verileri

Siyatik siniri bağlanmış deneklerde 3. günden itibaren allodini oluşmasına rağmen hiperaljezi oluşumu görülememektedir. (Şekil 8,9)

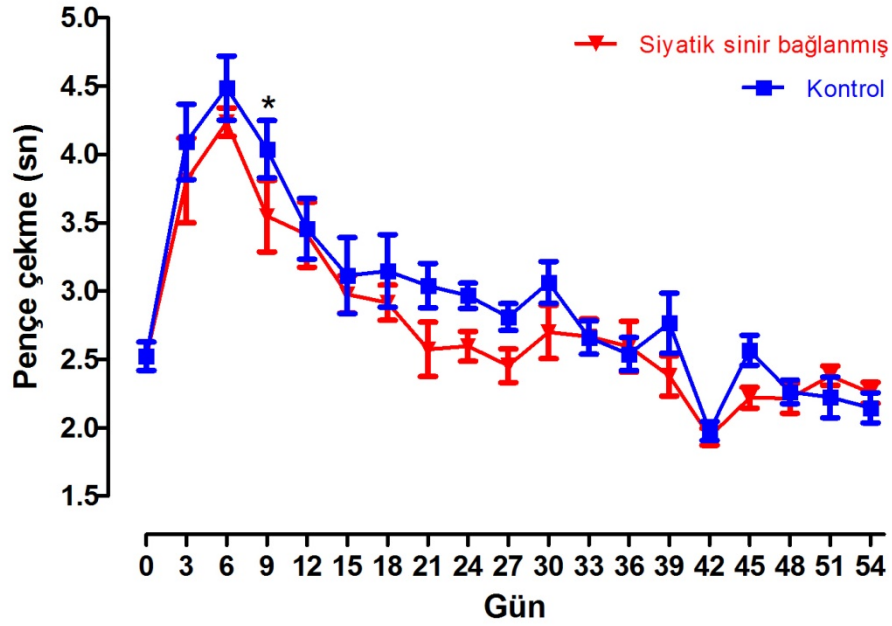
Grup 1 - Allodini



Şekil 8. Grup I allodini gelişiminin gösterilmesi

* $p < 0,05$ aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

Grup 1 - Hiperaleji

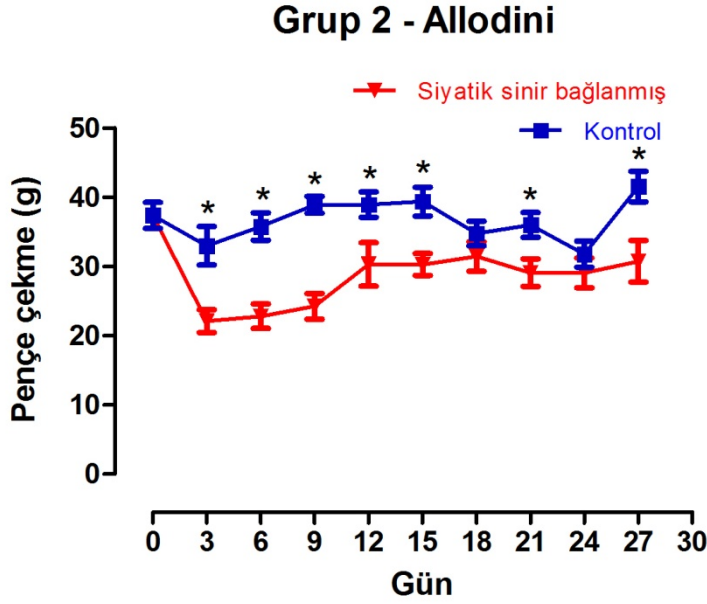


Şekil 9. Grup I hiperaleji gelişiminin gösterilmesi

* $p > 0,05$ aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

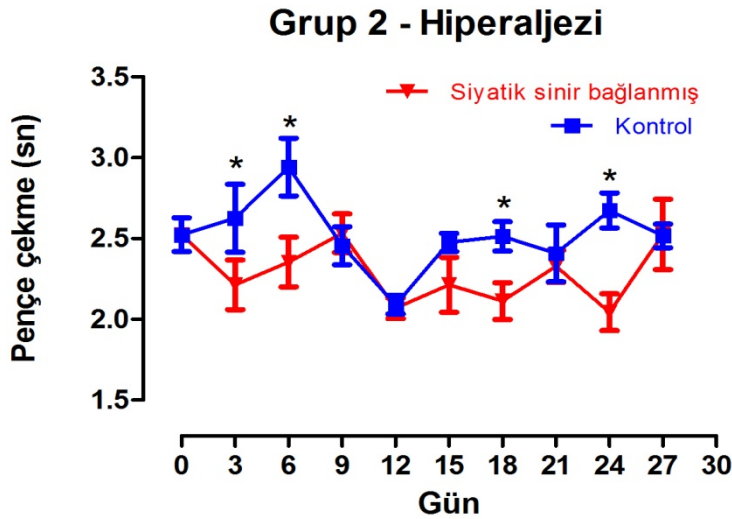
Grup II Verileri

Siyatik siniri bağlanmış deneklerde 3. günden itibaren allodini oluşumu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hiperaleji oluşumu ise kısmen görülmesine rağmen anlamlılık ifade etmemektedir (Şekil 10,11).



Şekil 10. Grup II allodini gelişiminin gösterilmesi

* $p < 0,05$ aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.



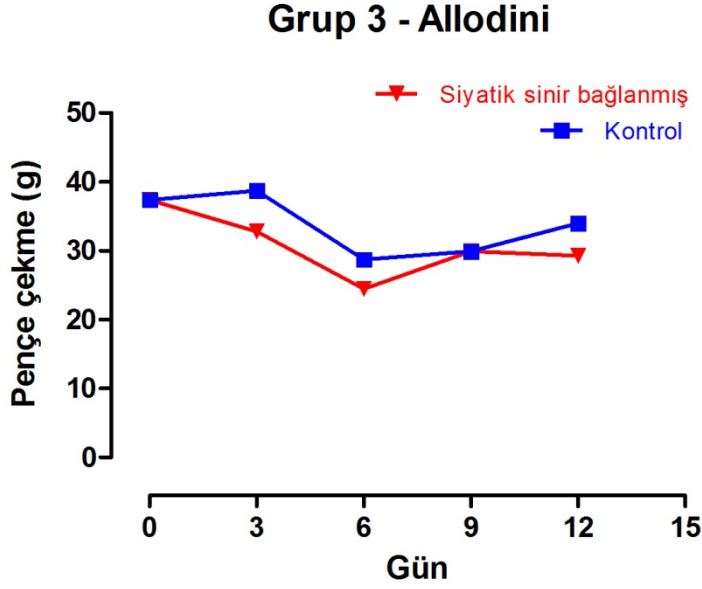
Şekil 11. Grup II hiperaleji gelişiminin gösterilmesi

* $p < 0,05$ aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

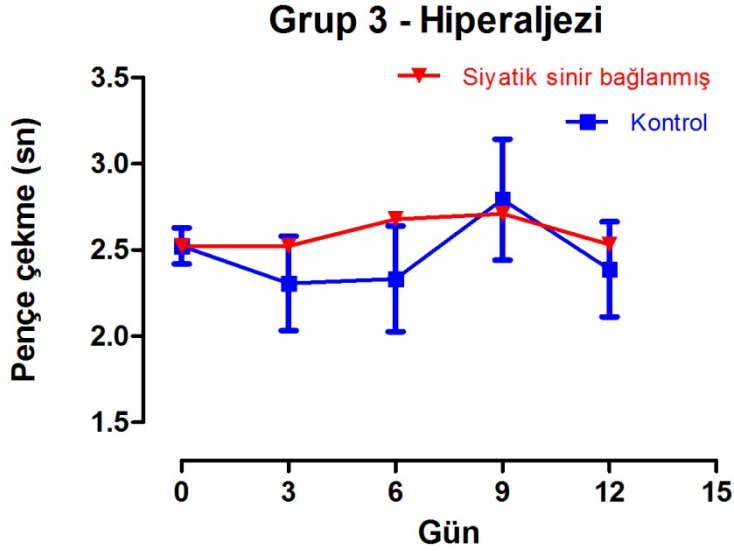
Grup III Verileri

Siyatik siniri bağlanmış deneklerde allodini ve hiperaljezi oluşumu gözlenememiştir.

(Şekil 12,13)



Şekil 12. Grup III allodini gelişiminin gösterilmesi



Şekil 13. Grup III hiperaleji gelişiminin gösterilmesi

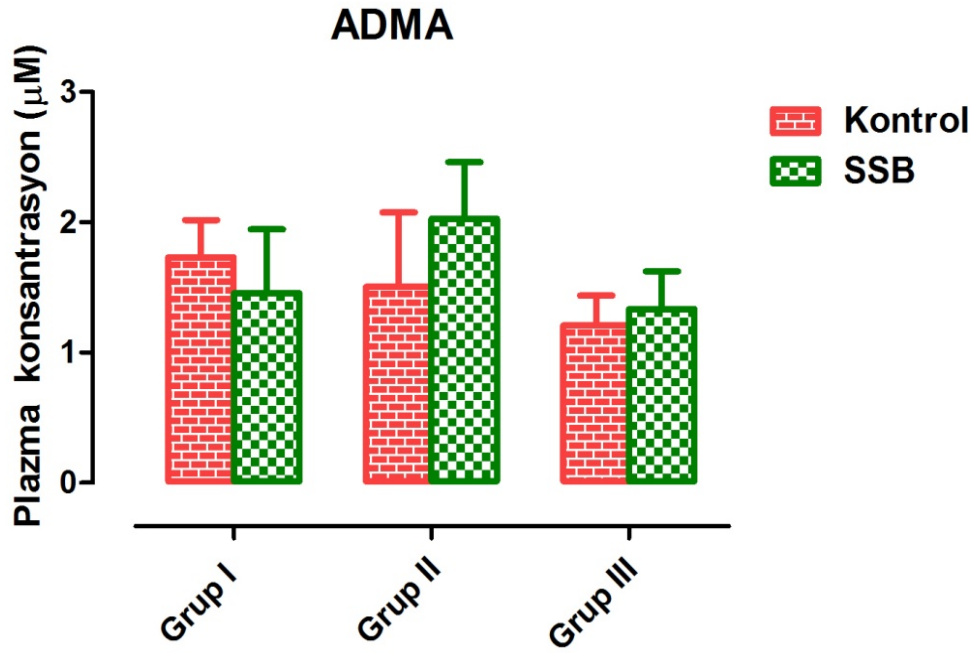
PLAZMA ASİMETRİK DİMETİLARGİNİN, SİMETRİK DİMETİL- ARGINİN, L-ARGINİN VE L-HOMOARGINİN DÜZEYLERİ

I-II-III. grupların, plazma ADMA, SDMA, L-arginin ve L-homoarginin düzeylerinde kontrole göre anlamlı farklılık bulunmamaktadır (Tablo 4-7 ve Şekil 14-17).

Tablo 4. Plazma ADMA düzeyleri (μM)

Gruplar	I	II	III
Kontrol	1,73 \pm 0,25	1,51 \pm 0,57	1,21 \pm 0,22
SSB	1,46 \pm 0,46	2,03 \pm 0,41	1,34 \pm 0,29

SSB: Siyatik sinir bağlanmış



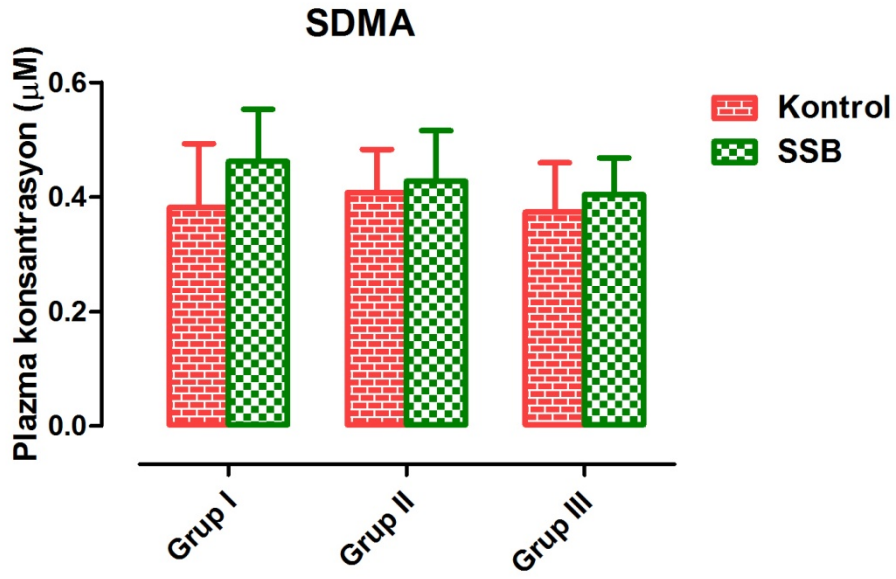
Şekil 14. Gruplara göre plazma ADMA düzeylerinin dağılımı

ADMA: Asimetrik dimetilarginin; SSB: Siyatik sinir bağlanmış.

Tablo 5. Plazma SDMA düzeyleri (μM)

Gruplar	I	II	III
Kontrol	0,38 \pm 0,11	0,41 \pm 0,08	0,37 \pm 0,08
SSB	0,46 \pm 0,09	0,43 \pm 0,09	0,40 \pm 0,06

SSB: Siyatik sinir bağlanmış



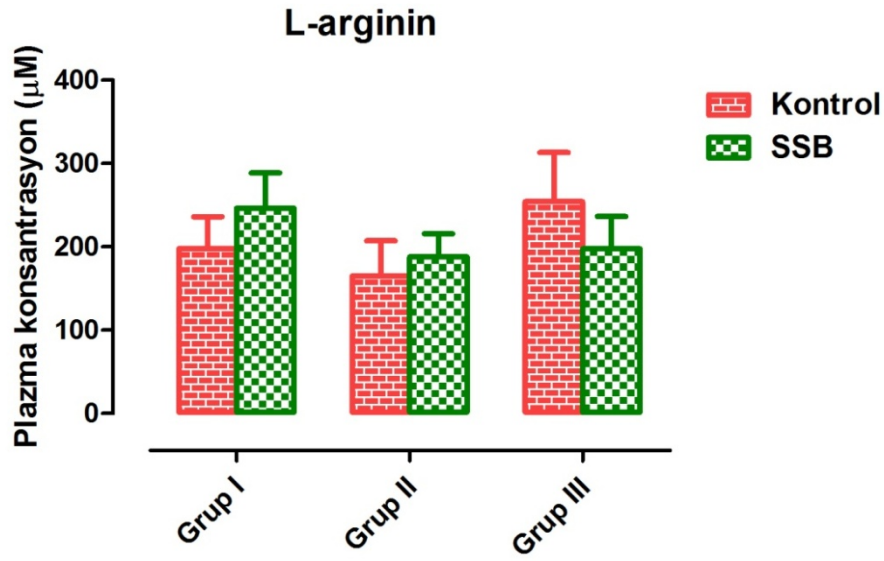
Şekil 15. Gruplara göre plazma SDMA düzeylerinin dağılımı

SDMA: Simetrik dimetilarginin; SSB: Siyatik sinir bağlanmış.

Tablo 6. Plazma L-arginin düzeyleri (μM)

Gruplar	I	II	III
Kontrol	197,93 \pm 38,10	165,12 \pm 42,08	254,34 \pm 55,32
SSB	246,43 \pm 42,11	188,10 \pm 27,58	197,73 \pm 36,56

SSB: Siyatik sinir bağlanmış

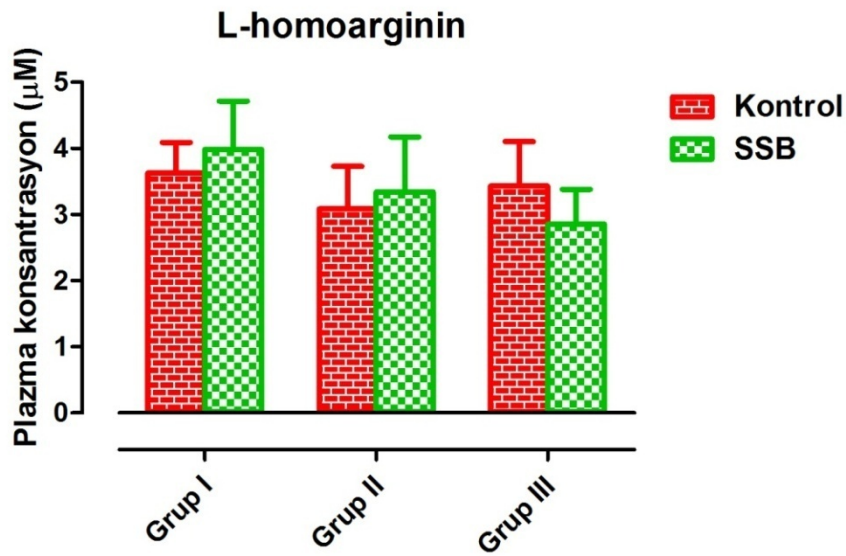


Şekil 16. Gruplara göre plazma L-arginin düzeylerinin dağılımı
SSB: Siyatik sinir bağlanmış.

Tablo 7. Plazma L-homoarginin düzeyleri (µM)

Gruplar	I	II	III
Kontrol	3,63±0,47	3,09±0,64	3,43±0,64
SSB	3,98±0,73	3,35±0,83	2,86±0,53

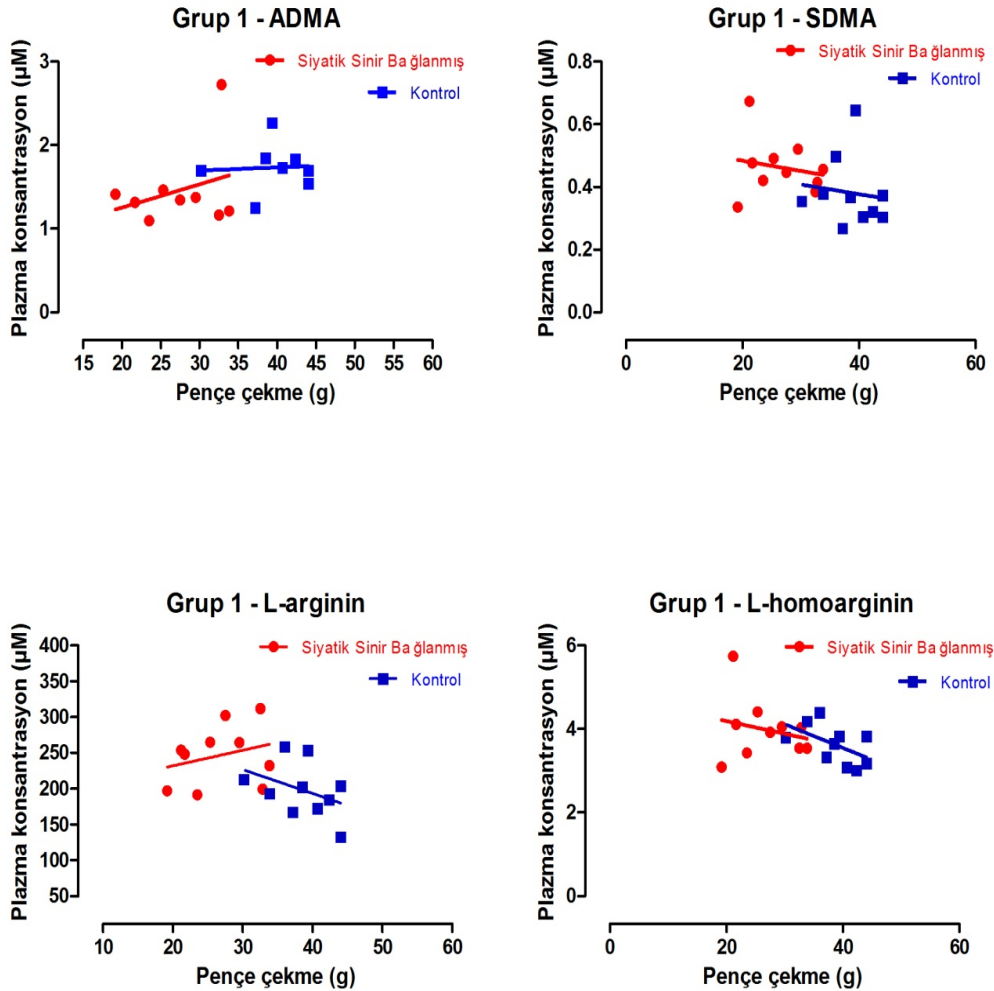
SSB: Siyatik sinir bağlanmış



Şekil 17. Gruplara göre plazma L-homoarginin düzeylerinin dağılımı
SSB: Siyatik sinir bağlanmış.

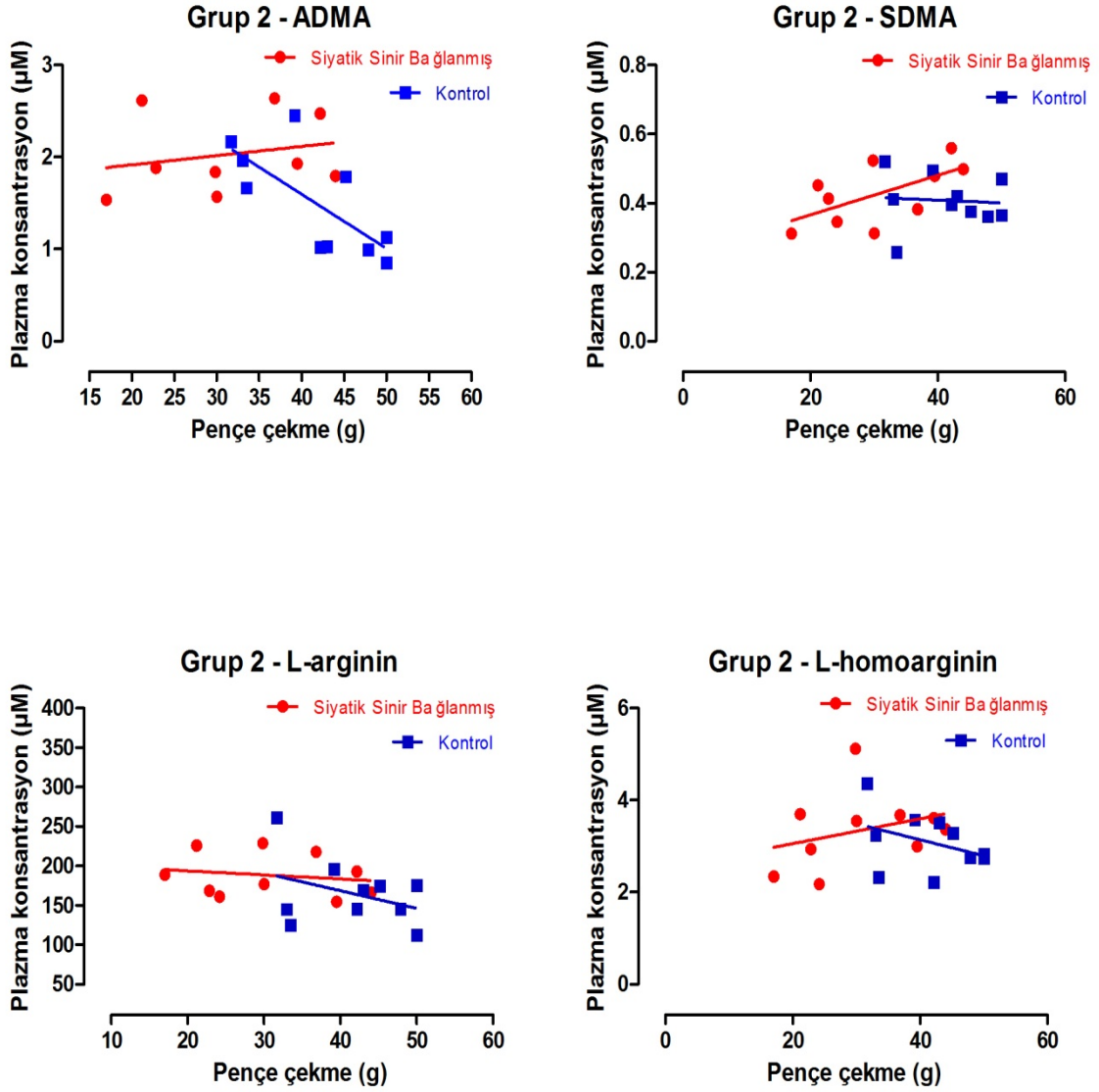
SİYATİK SİNİRİ BAĞLANMIŞ GRUPLAR VE KONTROL GRUPLARI İLE PLAZMA ADMA, SDMA, L-ARGİNİN VE L-HOMOARGİNİN DÜZEYLERİ ARASINDAKİ KORELASYON

Çalışmamızda siyatik siniri bağlanmış gruplar ve kontrol grupları ile plazma ADMA düzeyleri arasındaki korelasyonu inceledik. Plazma ADMA düzeyleri ile siyatik siniri bağlanmış gruplar ve kontrol grupları arasında bir korelasyon bulamadık. Ayrıca ek bir çalışma gerekmeden plazma düzeylerini belirleyebildiğimiz SDMA, L-arginin, L-homoarginin düzeyleri ile siyatik siniri bağlanmış gruplar ve kontrol grupları arasında da bir korelasyon bulamadık (Şekil 18-20). Plazma ADMA, SDMA, L-arginin, L-homoarginin arasındaki korelasyon ve regresyon verileri Tablo 8-10'da verilmiştir.



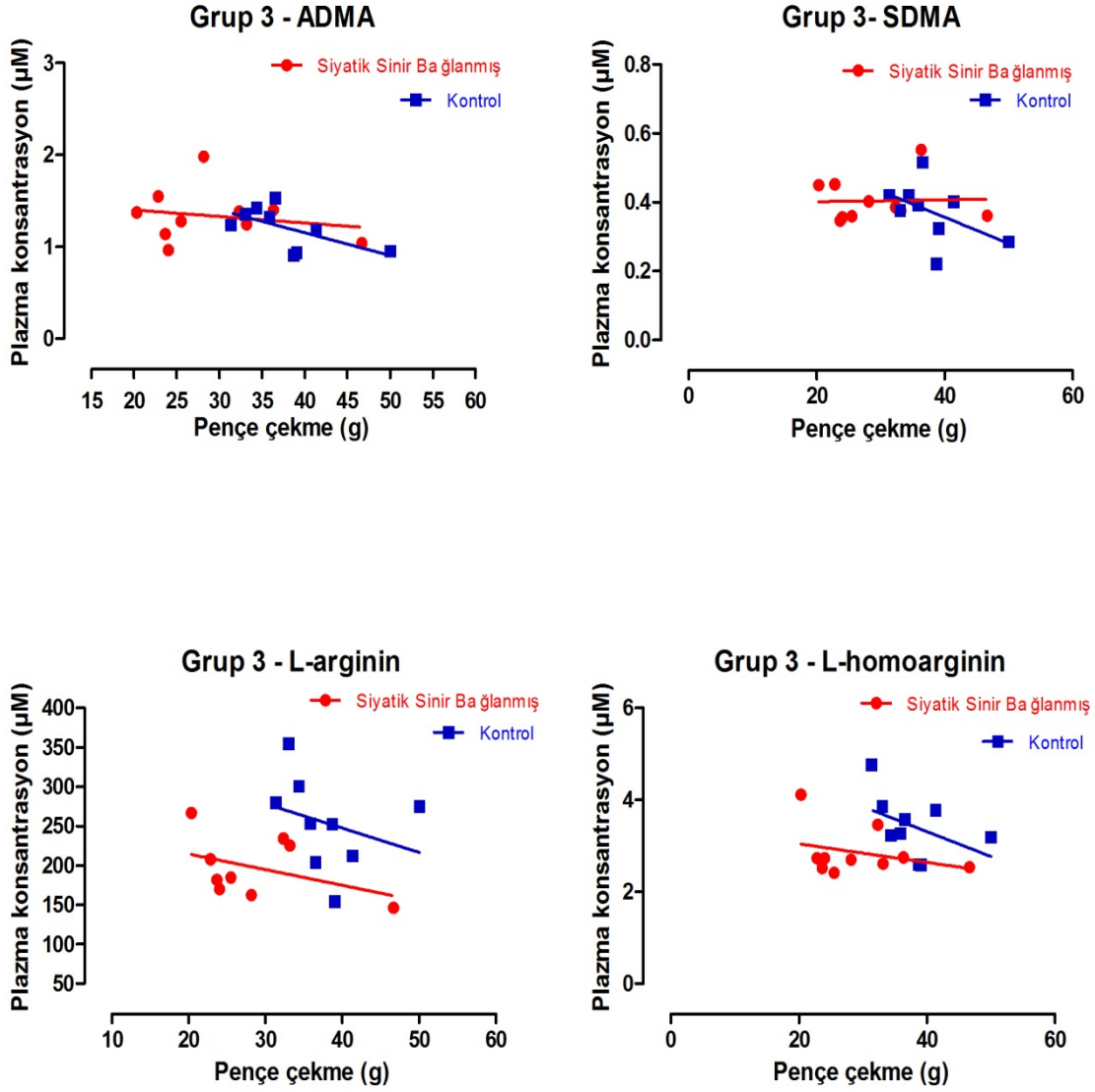
Şekil 18. Grup I plazma ADMA, SDMA, L-arginin ve L-homoarginin düzeyleri ile siyatik siniri bağlanmış ve kontrol grupları arasındaki korelasyon ve regresyon

ADMA: Asimetrik dimetilarginin; SDMA: Simetrik dimetilarginin.



şekil 19. Grup II plazma ADMA, SDMA, L-arginin ve L-homoarginin düzeyleri ile siyatik siniri bağlanmış ve kontrol grupları arasındaki korelasyon ve regresyon

ADMA: Asimetrik dimetilarginin; SDMA: Simetrik dimetilarginin.



şekil 20. Grup III plazma ADMA, SDMA, L-arginin ve L-homoarginin düzeyleri ile siyatik siniri ba ğlanmış ve kontrol grupları arasındaki korelasyon ve regresyon
 ADMA: Asimetrik dimetilarginin; SDMA: Simetrik dimetilarginin.

Tablo 8. Grup I korelasyon ve regresyon verileri

Grup I SSB	Korelasyon			Regresyon		
	<i>Pearson r</i>	<i>R square</i>	<i>P</i>	<i>Slope</i>	<i>Y-İntercept</i>	<i>P</i>
ADMA	0,3000	0,09001	0,4328	0.02795 ± 0.03359	0.6926 ± 0.9324	0,4328
SDMA	-0,1898	0,03602	0,5995	-0.003255 ± 0.005954	0.5487 ± 0.1618	0,5995
Arginin	0,2745	0,07537	0,4427	2.171 ± 2.688	188.5 ± 73.05	0,4427
HA	-0,2207	0,04873	0,5400	-0.03031 ± 0.04735	4.794 ± 1.287	0,5400
Grup I Kontrol						
ADMA	0,05851	0,003423	0,8905	0.003715 ± 0.02588	1.585 ± 1.029	0,8905
SDMA	-0,1234	0,01523	0,7341	-0.003095 ± 0.008798	0.5006 ± 0.3416	0,7341
Arginin	-0,3905	0,1525	0,2646	-3.330 ± 2.775	326.5 ± 107.8	0,2646
HA	-0,5446	0,2965	0,1036	-0.05685 ± 0.03096	5.820 ± 1.202	0,1036

ADMA: Asimetrik dimetilarginin; HA: Homoarginin; SDMA: Simetrik dimetilarginin.

Tablo 9. Grup II korelasyon ve regresyon verileri

Grup II SSB	Korelasyon			Regresyon		
	<i>Pearson r</i>	<i>R square</i>	<i>P</i>	<i>Slope</i>	<i>Y-İntercept</i>	<i>P</i>
ADMA	0,2257	0,05096	0,5592	0.01000 ± 0.01632	1.715 ± 0.5351	0,5592
SDMA	0,6125	0,3752	0,0597	0.005725 ± 0.002612	0.2514 ± 0.08368	0,0597
Arginin	-0,1762	0,03104	0,6264	-0.5129 ± 1.013	203.9 ± 32.46	0,6264
HA	0,3099	0,09607	0,3835	0.02700 ± 0.02929	2.516 ± 0.9382	0,3835
Grup II Kontrol						
ADMA	-0,7204	0,5190	0,0188	-0.05894 ± 0.02006	3.954 ± 0.8441	0,0188
SDMA	-0,07571	0,005732	0,8353	-0.0008216 ± 0.003826	0.4416 ± 0.1610	0,8353
Arginin	-0,3706	0,1373	0,2918	-2.233 ± 1.978	257.9 ± 83.24	0,2918
HA	-0,3768	0,1420	0,2831	-0.03474 ± 0.03019	4.529 ± 1.270	0,2831

ADMA: Asimetrik dimetilarginin; HA: Homoarginin; SDMA: Simetrik dimetilarginin.

Tablo 10. Grup III korelasyon ve regresyon verileri

Grup III SSB	Korelasyon			Regresyon		
	<i>Pearson r</i>	<i>R square</i>	<i>P</i>	<i>Slope</i>	<i>Y-İntercept</i>	<i>P</i>
ADMA	-0,1944	0,03780	0,5904	-0.007017 ± 0.01252	1.541 ± 0.3788	0,5904
SDMA	0,03262	0,001064	0,9287	0.0002614 ± 0.002832	0.3965 ± 0.08570	0,9287
Arginin	-0,4124	0,1701	0,2700	-1.987 ± 1.659	254.4 ± 48.95	0,2700
HA	-0,3063	0,09384	0,3893	-0.02019 ± 0.02218	3.447 ± 0.6711	0,3893
Grup III Kontrol						
ADMA	-0,6009	0,3611	0,0870	-0.02472 ± 0.01243	2.143 ± 0.4741	0,0870
SDMA	-0,4911	0,2412	0,1794	-0.007620 ± 0.005109	0.6615 ± 0.1948	0,1794
Arginin	-0,2914	0,08493	0,4467	-3.084 ± 3.826	370.8 ± 145.9	0,4467
HA	-0,4461	0,1990	0,2288	-0.05427 ± 0.04115	5.481 ± 1.569	0,2288

ADMA: Asimetrik dimetilarginin; HA: Homoarginin; SDMA: Simetrik dimetilarginin.

TARTIŞMA

Nöropatik ağrı en sık periferik sinirlerin parsiyel zedelenmesi sonucu ortaya çıkmakta olup tedavisi günümüzde halen etkin bir şekilde yapılamamaktadır. Bu sebepten dolayı son yıllarda nöropatik ağrının etyolojisi ve patogenezi ortaya çıkarmak ve etkin ilaç tedavisi bulunması amacıyla birçok nöropatik ağrı modeli geliştirilmiştir. Bu modellerden en sık kullanılanlardan biri Seltzer ve ark. (9) uyguladığı parsiyel siyatik sinir ligasyonudur. Biz de çalışmamızda nöropatik ağrının en önemli belirtileri olan allodini ve hiperaljezi ölçümlerini bu modele dayanarak araştırmayı tercih ettik.

Nöropatik ağrı tek bir etyoloji ya da tek bir anatomik lezyon ile açıklanamayacak kadar kompleks bir durum olup birçok heterojen faktörlere bağlıdır (61,62). Genel populasyonun % 2-4'ünde nöropatik ağrı görülebildiği belirtilmektedir (63). Nöropatik ağrının etyolojisi, patogenezi ile ilgili oldukça fazla araştırma yapılmış; araştırmalarla bu durumun mevcut ilaç tedavilerine karşı vermiş olduğu yanıtı değerlendirmek ve yeni tedaviler geliştirilmek amaçlanmıştır. Biz de yapmış olduğumuz çalışmada nöropatik sıçanlarda serum ADMA düzeyinin kontrol grupları ile karşılaştırıldığında bir farklılık gösterip göstermediğini araştırdık.

Bu araştırmada siyatik siniri bağlanmış periferik nöropati oluşturulan sıçanlar ile kontrol grubu sıçanların 2.,4.,8. hafta plazma ADMA değerleri incelendi. Nöropatik ağrı belirtilerinin 1. haftanın sonunda başladığı ve 8. haftadan sonra giderek azaldığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir (40,41). Biz de buna dayanarak nöropatik ağrının belirtileri olan allodini ve hiperaljezi ölçümlerini her 3 gruba intrakardiyak kan alımı ve sakrifikasyon yapıldığı güne kadar her 3 günde bir tekrarladık.

Periferik nöropati oluşturulup oluşturulmadığı, Bennett ve ark. (7) ile Decosterd ve ark (58) tarafından da ispatlanmış allodini ve hiperaljezi gelişimi ile kontrol edildi. Birinci ve 2. grupta siyatik siniri bağlanan ve kontrol grubu sıçanların allodini ölçüm değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bulunmuştur. Üçüncü grup sıçanlarda ise siyatik siniri bağlanmış sıçanlar ile kontrol grubu arasında allodini gelişimi yönünden anlamlı fark gösterilememiştir. Bunun nedeni olarak, kullanılan deney modeline göre, ilk haftanın sonunda %50 sıçanda periferik nöropati oluşturulabildiği (41), maksimum etkinin ancak 2. haftadan sonra ortaya çıktığı (65) bilindiğinden beklenen etkinin istatistiksel olarak anlamlı oluşabilmesi için yeterli süre ölçüm yapılamadığından kaynaklandığını düşünüyoruz.

Hiperaleji ölçüm sonuçlarında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gelişmediği gözlemlenmiştir. Bunun nedeni ise hayvanların hijyen koşulları sebebi ile ayak tabanlarının farklı ısı ve nemde olabileceği, ortam ısısının sabit olmamasının ölçümlerde değişikliğe sebebiyet vermiş olabileceği düşünülmüştür. Buna ek olarak cihazın kalibrasyon sorunu bulunması veya ölçüm yapan araştırmacının bireysel hatası sonucunda da sağlıklı verilere ulaşılamamış olabilir.

Nöropatik ağrının davranışsal belirtilerinin gelişmesi ve opioidlerin analjezik etkilerine karşı gelişen ilaç toleransının bazı benzer mekanizmalar ile oluştuğu belirtilmektedir. Periferik sinir hasarı merkezi sinir sistemi eksitör aminoasit reseptörlerini ve NO üretimini uyarır. Benzer hücre içi mekanizmalar opioidlerin antinosiseptif tolerans geliştirmesinde de rol oynamaktadır (66-68). NO birçok fizyolojik ve patolojik süreçte etkin rol alan merkezi sinir sisteminin en önemli ulaklarından biridir. Opioid toleransının gelişimindeki rolünün yanında periferik sinir hasarı sonrasında oluşan nöropatik ağrı sendromlarında da etkili olduğu bilinmektedir (18,20,22). Aynı ilişki, NOS inhibisyonunun hem opioidlerin antinosiseptif tolerans gelişimini hem de nöropatik ağrı belirtilerini azaltması ile de desteklenmektedir (69,70).

Heinzen ve ark.nın (69) 15 sıçanı 5 ayrı gruba ayırarak morfin ile indüklenmiş nöronal NO üretimi ile antinosiseptif tolerans gelişimi arasındaki bağlantıyı inceledikleri çalışmada, kronik ağrı tedavisinde sıkça tercih edilen opioid analjeziklerin antinosiseptif etki kaybı sebebiyle kullanımının sınırlı kaldığı belirtilmiştir. Buna bağlı olarak da ağrı kontrolü amacıyla doz artırımını gerekecek ve yan etkiler nedeniyle kullanımları iyice kısıtlanacaktır. Bu toleransın gelişmesinden en fazla sorumlu tutulan mekanizma morfin uygulamasının ardından gözlenen NO salınımı artışı olmuştur.

Ulugöl ve ark. nın (19) 60 sıçan üzerinde yaptıkları bir çalışmada morfinin spinal sinir ligasyonu sonucu ortaya çıkan nöropatik ağrının tedavisinde aynı mekanizma sebebiyle tek başına yetersiz kalacağı, benzeri çalışmalarda gösterilmiş olan intratekal CI-988 (kolesistokinin B antagonisti), magnezyum sülfat, intratekal ketorolak, sistemik dekstrometorfan, spinal adenozin ve selektif COX1-COX2 inhibitörleri ile yapılmış kombinasyonlara benzer şekilde NOS inhibitörleri ile birlikte kombine edilerek kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Nöropatik ağrı modellerinde ortaya çıkan termal hiperaljezinin N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör uyarılması sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu reseptörün nosisepif etkilerinin ortaya çıkışında NO ve guanilat siklaz aktivasyonu etkin rol oynamaktadır. Meller ve ark. (18) tarafından yapılmış çalışmada siyatik sinirin bağlanması post-op 3. gününde termal hiperaljeziye neden olduğu gözlenmiştir ve bunun sebebi olarak da lumbal spinal korda NO üretimi olduğu değerlendirilmiştir.

Asimetrik dimetilarginin, NOS'un endojen kompetitif inhibitörüdür (52). Hiperkolesterolemi, hiperhomosisteinemi, hipertansiyon, obezite, preeklampsi, tiroid hastalıkları, periferik ve koroner arter hastalıkları ile kronik kalp yetmezliğinde plazma ADMA düzeylerinin artmış olduğu gösterilmiştir (16,71). Benzer şekilde sinir sisteminde de bir modülatör rolü olabileceği iddia edildiğinden (14), araştırmamızda nöropatik ağrı durumlarında ADMA düzeylerinin değişimini inceledik; ancak herhangi bir değişiklik gözlemedik.

Bunun yanında Xiong ve ark. nın (23,72) yaptığı 2 ayrı çalışmada, tip 2 diyabetik hastalarda da sinir hasarı modellerinin benzeri bir periferik nöropati ortaya çıktığı ve aynı şekilde bu hastaların serum ADMA seviyelerinde anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir.

Altınova ve ark. nın (73) 40 tip I diyabet hastası ve 35 sağlıklı bireyde yaptıkları çalışma sonucunda diyabetli hastalarda plazma ADMA seviyelerinde anlamlı yükselme olduğu ve L-Arginin seviyesinde de anlamlı düşme tespit edildiği bulunmuş, bu plazma konsantrasyonlarındaki değişimlerinin diyabetik vaskülopati ve nöropati gelişiminde rol oynadığına değerlendirilmiştir.

İnsülin bağımlı, bağımsız ve gestasyonel diyabette ADMA'nın arttığı Lin ve ark. nın (74) yaptığı bir çalışmada da gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre diabetes mellitus'ta bozulan NOS yolu incelenmiş ve streptozotosinle indüklenen diyabetik sıçanlarda, plazma ADMA seviyeleri, diyabetik olmayan sıçanlardan daha yüksek bulunmuştur. Yüksek glukoza maruz bırakılmış hücre kültürlerinde diyabetik sıçanlardaki DDAH aktivitesinin normalden daha

yüksek olduğu, vasküler düz kas ve insan endotelial hücrelerinde DDAH aktivitesinin bozulduğu ve ADMA akümülyasyonu olduğu gösterilmiştir.

Bode-Böger ve ark. nın (16) yayınladıkları meta analiz sonucunda da plazma L-arginin/ADMA oranının çeşitli hastalıklarda değiştiği ve bu oranın hesaplanarak miyokard enfarktüsü, vaskülopatiler ve diğer kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan L-arginin'in hangi hastalarda daha fazla etkin olacağı kestirilebileceği öngörülmektedir.

Son zamanlarda yapılmış olan bazı çalışmalarda ADMA'nın, opioid ve kanabioid toleransı ve bağımlılığındaki nosisepsiyonda da bir modülatör olarak rol oynayabileceği iddia edilmektedir (14,75).

Sıçanlarda L5-L6 spinal sinirlerin sıkıca bağlanması ile oluşturulan termal hiperaljezi ve mekanik alodiniyi takiben lomber dorsal kök gangliyonlarında NOS immün reaktivitesini incelemiş olan Steel ve ark. (76) bağlanan L5-L6 spinal köklerde anlamlı şekilde artmış NOS-immunreaktive hücrelere rastlanmış ve L1-L4 gangliyonların ise etkilenmediğini görmüşlerdir. Bu sonuca göre NO'nun nöropatik ağrı oluşmasında rolü olabileceğini düşünmüşlerdir.

Yaptığımız çalışmada siyatik siniri bağlanmış sıçanlar ile kontrol grubu sıçanlardaki serum ADMA seviyeleri arasında fark olup olmadığı incelendi. Gruplarda serum ADMA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. Bu sonuçtan yola çıkılarak, nöropatik ağrı ortaya çıkışında görev alan önemli bir nörotransmitter olan NO'nun enflamatuar olaylarda olduğu gibi nöronal bir enflamatuar yanıt olarak da artıyor olabileceği, ancak bu artışın serum ADMA düzeyi üzerine negatif veya pozitif artışa sebep olmadığı sonucuna varılmıştır.

Asimetrik dimetilarginin gibi diğer metilenmiş arginin türevleri olan SDMA, L-homoarginin ve L- arginin düzeylerinde de gruplar arası plazma seviyelerinde farklılık tespit edilememiş olup, adı geçen maddelerin nöropatik ağrı semptomlarının ortaya çıkmasında önemli bir rolü olmadığı kanısına varılmıştır.

SONUÇLAR

Parsiyel siyatik sinir ligasyonu yapılan sıçanlarda allodini olarak adlandırılan ağrı davranışının I. ve II. gruplarda 3. günden itibaren oluştuğu gösterilmesine karşın, daha kısa süreyle gözlem yapılan III. grupta gösterilemedi. Hiperaleji ölçümlerinde ise grupların hiç birinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca varılamadı.

Parsiyel siyatik sinir ligasyonu sonucu nöropatik ağrı oluşturulan gruplarda, plazma ADMA, SDMA, L-arginin ve L-homoarginin düzeylerinde kontrole göre anlamlı bir farklılık görülmedi.

Bulgularımız, serum ADMA, SDMA, L-arginin ve L-homoarginin düzeylerinin nöropatik ağrı oluşturulan sıçanlar ile kontrol grubu sıçanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığını göstermektedir.

ÖZET

Biz bu çalışmada, endojen nitrik oksit sentaz inhibitörü olan asimetrik dimetilarginin düzeyinin, nöropatik ağrı oluşturulmuş olan sıçanlarda değişime uğradığı hipotezini, siyatik siniri bağlanmış sıçanlarda plazma asimetrik dimetilarginin seviyelerinin ölçümü yoluyla araştırdık.

Sıçanlar 2, 4, 8 hafta beslenen gruplara ayrıldı. Kontrol grubu dışında kalan sıçanların siyatik sinirlerinin ½ - 1/3 kısmı sıkıca bağlandı. Nöropatik ağrı belirteçleri olan allodini ve hiperaljezi ölçümleri 3 gün ara ile yapıldı. İki hafta beslenen grupta allodini oluşmamasına karşın, 4 ve 8 hafta beslenen gruplarda belirgin olarak gözlemlendi. Termal hiperaljezi ise siyatik sinir ligasyonu yapılmış grupların hiçbirinde ortaya çıkmadı. Her beslenme periyodunun sonunda hayvanlara anestezi verilerek intrakardiyak kan örnekleri alındı. Siyatik siniri bağlanmış sıçanların, asimetrik dimetilarginin, simetrik dimetilarginin, L-arginin ve L-homoarginin düzeyleri kontrol gruplarına göre farklı bulunmadı.

Sonuçlarımız parsiyel siyatik sinir ligasyonu yapılarak oluşturulan nöropatik ağrılı sıçanların; plazma asimetrik dimetilarginin, simetrik dimetilarginin, L-arginin ve L-homoarginin düzeylerinin değişmediğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Nöropatik ağrı, parsiyel siyatik sinir ligasyonu, asimetrik dimetilarginin, nitrik oksit.

SERUM ASYMMETRIC DIMETHYLARGININE LEVELS IN NEUROPATHIC RATS

SUMMARY

In this research, we investigated whether plasma asymmetrical dimethylarginine levels change in neuropathic rats.

Rats were divided into three groups of 2-, 4-, and 8- week feeding duration. Partial sciatic nerve ligation was made by tightly tying 1/3 to 1/2 of the dorsal portion of the sciatic nerve. Neuropathic pain symptoms, allodynia and hyperalgesia, were measured every 72 hours. Allodynia was prominent in the 4 and 8-weeks fed groups while it was not observed in the 2-weeks fed ones. Thermal hyperalgesia was not seen in any of the groups with sciatic nerve ligation. At the end of every feeding period, intracardiac blood samples were taken from the rats under anesthesia. No significant difference in asymmetrical dimethylarginine, symmetrical dimethylarginine, L-arginine, and L-homoarginine levels were found, between the control and sciatic nerve-ligated rats.

Our results show that asymmetrical dimethylarginine, symmetrical dimethylarginine, L-arginine, and L-homoarginine levels do not change in rats with sciatic nerve ligation, in contrast to our hypothesis.

Keywords: Neuropathic pain, partial sciatic nerve ligation, asymmetrical dimethylarginine, nitric oxide.

KAYNAKLAR

1. Önal A. Ağrı, Önal A (Editör) Algoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2004. s.1-20.
2. Erdine S. Nöropatik ağrı. Erdine S (Editör). Ağrı sendromları ve tedavileri. İstanbul: Sanovel İlaç San. 2003. s.207-8.
3. MacFarlane BV, Wright A, O'Callaghan J, Benson HAE. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. *Pharmacol Ther* 1997;75:1-19.
4. Watson CP. The treatment of neuropathic pain: antidepressants and opioids. *Clin J Pain* 2000;16:49-55.
5. Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 1999;353:1959-64.
6. Benedetti F, Vighetti S, Amanzio M, Casadio C, Oliaro A, Bergamasco B, et al. Dose-response relationship of opioids in nociceptive and neuropathic postoperative pain. *Pain* 1998;74:205-11.
7. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33:87-107.
8. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992;50:355-63.
9. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990;43:205-18.
10. Devulder JE. Could nitric oxide be an important mediator in opioid tolerance and morphine side effects? *J Clin Anesth* 2002;14:81-2.
11. Snyder SH, Brecht DS. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci* 1991;12:125-8.
12. Ulugol A, Arıkan E, Dost T, Dokmeci D, Karadağ CH, Dokmeci I. The role of nitric oxide in the protective effect of insulin against pentylenetetrazole-induced seizures in

- mice. *Neurosci Res Commun* 2000;26:87-91.
13. Tsikas D, Boger RH, Sandmann J, Bode-Boger SM, Frolich JC. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett* 2000;478:1-3.
 14. Kielstein A, Tsikas D, Galloway GP, Mendelson JE. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) – A modulator of nociception in opiate tolerance and addiction? *Nitric Oxide-Biol Ch* 2007;17:55-9.
 15. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Occurrence of a new enzyme catalysing the direct conversion of *NG,NG*-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats. *Biochem Bioph Res Co* 1987;148:671-7.
 16. Bode-Böger SM, Scalera F, Ignaroo LJ. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol Therapeut* 2007;114:295-306.
 17. Meller ST, Gebhart GF. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 1993;52:127-36.
 18. Meller ST, Pechman PS, Gebhart GF, Maves TJ. Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience* 1992;50:7-10.
 19. Ulugol A, Aslantas A, Karadag HC, Bulbul ED, Tuncer A, Dokmeci I. The effect of combined systemic administration of morphine and L-name, a nitric oxide synthase inhibitor, on behavioral signs of neuropathic pain in rats. *Neurosci Res Com* 2002;30:143-53.
 20. Bhargava HN. Nitric oxide synthase inhibition blocks tolerance to the analgesic action of k-opiate receptor agonist in the rat. *Pharmacology* 1998;52:86-91.
 21. Kolesnikov YA, Pick CG, Pasternak GW. *NG*-nitro-L-arginine prevents morphine tolerance. *Eur J Pharmacol* 1992;221:399-400.
 22. Pasternak GW, Kolesnikov YA, Babey AM. Perspectives on the N-methyl-D-aspartate/nitric oxide cascade and opioid tolerance. *Neuropsychopharmacol* 1995;13:309-13.
 23. Xiong Y, Lu R, Li YJ, Deng HW. Elevation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in diabetic rat serum. *Acta Pharmacol Sin* 1997;18:511-4.
 24. Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. *Lancet* 1999; 353:1607-9.
 25. Ozyigit F, Ulugol A. The effect of minocycline alone and in combination with morphine on mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in neuropathic mice. *Recent Res. Devel. Neurosci.* 2009;3:147-55.
 26. Ertekin C. Ağrının nöroanatomi ve nörofizyolojisi. Yegül İ (Editör). Ağrı ve tedavisi. İzmir 1993. s.1-17.
 27. Özyalçın SN, Koltka K, Uyar M. Akut ağrı genel bilgiler. Özyalçın SN (Editör). Akut ağrı. Ankara: Güneş Kitapevi; 2005. s.1-24.
 28. Raj PP. Ağrı taksonomisi. Erdine S (Editör). Ağrı. 3. Basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2007. s.19-25.

29. Devor M. Sinir hasarı ile ilişkili ağrı mekanizmaları. Erdine S (Editör). Ağrı. 3. Basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2007. s.27-36.
30. Erdine S. Ağrı mekanizmaları ve ağrıya genel yaklaşım. Erdine S (Editör). Ağrı. 3. Basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2007. s.37-48.
31. Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. *Pain* 2007;132:237-51.
32. Jensen TS, Baron R. Translation of symptoms and signs into mechanisms in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2001;429:1-11.
33. Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol* 2003;60:1524-34.
34. Vadalouca A, Siafaka I, Argyra E, Vrachnou E, Moka E. Therapeutic management of chronic neuropathic pain: An examination of pharmacologic treatment. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1088:164-86.
35. Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2001;429:23-37.
36. Nicholson B. Gabapentin use in neuropathic pain syndromes. *Acta Neurol Scand* 2000; 101:359-71.
37. Edward MG, Michail MS (Çeviri:N.Lüleci) Ağrı Tedavisi. Klinik Anesteziyoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2002. s.274-86.
38. Stannard C. Nöropatik ve santral ağrı (Çeviri: İ Karacan). Karacan İ, Özaras N (Editörler). Ağrı'da 1.Basım. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevi; 2007. s.293-315.
39. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in unconscious animals. *Pain* 1983;16:109-10.
40. Wall PD, Devor M, Inbal M, Scadding JV, Schonfeld D, Seltzer Z, et al. Autotomy following peripheral nerve lesion: Experimental anesthesia dolorosa. *Pain* 1979;7:103-13.
41. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neuroscience Methods* 1994;53:55-63.
42. Seltzer Z, Beilin B, Ginzburg R, Paran Y, Shimko T. The role of injury discharge in the induction of neuropathic pain behavior in rats. *Pain* 1991;46:327-36.
43. Çemen B, Turgut M, Türköz Y, Aygün AD, Gözükar EM. Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri. *T Klin Pediatri* 2001;10:226-36.
44. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1995;82:1598-610.
45. Böger R.H. The pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr* 2007;137:1650-5.
46. Sarella AI, Mathie RT. The role of nitric oxide in surgical practice. *Surgery* 1996;14:154-

- 6.
47. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Med Sci* 1990;87:10043-7.
 48. Dzau VJ. Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: A unifying hypothesis. *Hypertension* 2001;37:1047-52.
 49. Yılmaz I, Ulugol A. The effect of nitric oxide synthase inhibitors on the development of analgesic tolerance to dipyrone in mice. *Int J Neurosci* 2009;119:755-64.
 50. Böger RH, Ron ES. L-arginine improves vascular function by overcoming the deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev* 2005;10(1):14-23.
 51. Böger RH, Vallance P, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atherosclerosis Supp* 2003;4:1-3.
 52. Valtonen P, Karppi J, Nyssonen K, Valkonen VP, Halonen T, Punnonen K. Comparison of HPLC method and commercial ELISA assay for asymmetric dimethylarginine (ADMA) determination in human serum. *J Chromatogr* 2005;828:97-102.
 53. Mügge A, Hanefeld C, Böger RH. Plasma concentration of ADMA and the risk of coronary heart disease: rationale and design of the multicenter cardiac study. *Atherosclerosis Supp* 2003;4:29-32.
 54. Jerzy Betowski, Anna Kêdra. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep* 2006;58:159-78.
 55. Ulugol A, Dokmeci D, Guray G, Sapolyo N, Ozyigit F, Tamer M. Antihyperalgesic, but not antiallodynic, effect of melatonin in nerve-injured neuropathic mice: possible involvements of L-arginine-NO pathway and opioid system. *Life Sci* 2006;78,1592-7.
 56. Decosted I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 2000;87:149-58.
 57. Ulugol A, Karadag CH, Ipci Y, Tamer M, Dokmeci I. The effect of WIN 55,212-2, a cannabinoid agonist, on tactile allodynia in diabetic rats. *Neurosci Lett* 2004;371:167-70.
 58. Hargreaves K, Dubner R, Broun F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988;32:77-8.
 59. Teerlink T, Nijveldt RJ, Jong S, van Leeuwen PAM. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological sample by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 2002;303:131-7.
 60. Sindrup SH, Jensen TS. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain : an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 1999;83:389-400.
 61. Jensen TS, Gottrup H, Sindrup SH, Bach FW. The clinical picture of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2001;429:1-11.
 62. Serpell M. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Surgery* 2006;24:350-3.

63. Wieseinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol* 2001;64:365-91.
64. Dowdall T, Meert TF. Behavioral evaluation of symptoms of allodynia and hyperalgesia in rats with a tibial and sural nerve transection. *J Neuropath Pain & Symp Pall* 2005;1:29-37.
65. Mao J, Price DD, Mayer DJ. Experimental mononeuropathy reduces the antinociceptive effects of morphine: Implications for common intracellular mechanisms involved in morphine tolerance and neuropathic pain. *Pain* 1995;61:353-64.
66. Mao J, Price DD, Mayer DJ. Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: A current view of their possible interactions. *Pain* 1995;62:259-74
67. Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD. Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:7731-6.
68. Heinzen EL, Pollack GM. Pharmacodynamics of morphine-induced neuronal nitric oxide production and antinociceptive tolerance development. *Brain Res* 2004;1023:175-84.
69. Yoon YW, Sung B, Chung JM. Nitric oxide mediates behavioral signs of neuropathic pain in an experimental rat model. *NeuroReport* 1998;9:367-72.
70. Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2001;88:1201-3.
71. Xiong Y, Lei M, Fu S, Fu Y. Effect of diabetic duration on serum concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in patients and rats with diabetes. *Life Sci* 2005;77:149-59.
72. Altinova AE, Arslan M, Sepici-Dincel A, Akturk M, Altan N, Toruner FB. Uncomplicated type 1 diabetes is associated with increased asymmetric dimethylarginine concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1881-5.
73. Lin KY, Ito A, Asagami S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus. *Circulation* 2002;106:987-92.
74. Ulugol A: Modulatory role of symmetric dimethylarginine (ADMA) in cannabinoid tolerance and dependence. *Med Hypotheses* 2009;73:213-4.
75. Steel JH, Terenghi G, Chung JM, Na HS, Carlton SM, Polak JM. Increased nitric oxide synthase immunoreactivity in rat dorsal root ganglia in a neuropathic pain model. *Neurosci Lett* 1994;169:81-4.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Nitrik oksit sentezi	15
Şekil 2. Nitrik oksit sentezi ve sentezde rol alan moleküller	16
Şekil 3. Nitrik oksitin önemli rolleri	17
Şekil 4. ADMA ile ilgili yayınların yıllara göre artışı	18
Şekil 5. Protein arginin metil transferaz enzim tipleri ve ürünleri	19
Şekil 6. Metilenmiş arginin türevleri	20
Şekil 7. Örnek kromatogram	27
Şekil 8. Grup I allodini gelişiminin gösterilmesi	30
Şekil 9. Grup I hiperaljezi gelişiminin gösterilmesi	30
Şekil 10. Grup II allodini gelişiminin gösterilmesi	31
Şekil 11. Grup II hiperaljezi gelişiminin gösterilmesi	31
Şekil 12. Grup III allodini gelişiminin gösterilmesi	32
Şekil 13. Grup III hiperaljezi gelişiminin gösterilmesi	32
Şekil 14. Gruplara göre plazma ADMA düzeylerinin dağılımı	33
Şekil 15. Gruplara göre plazma SDMA düzeylerinin dağılımı	34
Şekil 16. Gruplara göre plazma L-arginin düzeylerinin dağılımı	35
Şekil 17. Gruplara göre plazma L-homoarginin düzeylerinin dağılımı	35
Şekil 18. Grup I plazma ADMA, SDMA, L-arginin ve L-homoarginin düzeyleri ile siyatik siniri bağlanmış ve kontrol grupları arasındaki korelasyon ve regresyon	36
Şekil 19. Grup II plazma ADMA, SDMA, L-arginin ve L-homoarginin	

düzeyleri ile siyatik siniri bağlanmış ve kontrol grupları arasındaki korelasyon ve regresyon

37

Şekil 20. Grup III plazma ADMA, SDMA, L-arginin ve L-homoarginin düzeyleri ile siyatik siniri bağlanmış ve kontrol grupları arasındaki korelasyon ve regresyon

38

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Bulgaristan'ın Şumnu şehrinde doğdum. İlkokulu Bulgaristan'da, ortaokulu Tuzla Lisesi ortaöğretim kısmında, liseyi Tuzla Teknik Lisesi Bilgisayar Bölümünde okudum. 2004 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldum.

Fakülteyi bitirdikten sonra aynı yıl ilk görev yerim olan Edirne ili Havsa ilçesi Şerbettar Sağlık Ocağında göreve başladım. Burada 3 yıl pratisyen hekim olarak çalıştıktan sonra 2006 yılında halen görev yapmakta olduğum Havsa 2 Nolu Aile Sağlığı Merkezi - 48 Nolu Aile Hekimliği biriminde göreve başladım ve halen bu birimde görev yapmaktayım.

EKLER

EK-1

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

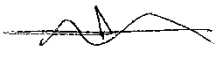
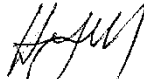
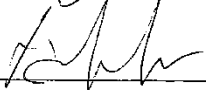

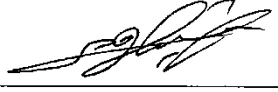
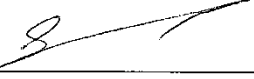

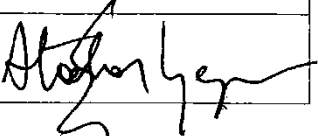
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 09

Karar Tarihi: 17. 11.2008

KARAR NO: 2008/09.02

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'ün yaptığı ve doktora öğrencisi Dr. Emin HAFIZOĞLU'nun tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2008/047 protokol nolu "Nöropatik sıçanlarda serum asimetrik dimetilarginin (ADMA) düzeyleri: akut ve kronik \square -arginin" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü, araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
İlyas ÖZMEN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. S. Arzu VARDAR Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Nilda TURGUT Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAŞ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	

EK-2

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ SÖZLEŞMESİ	PROJE NO : 2008/118
	PRJ NİTELİĞİ : Doktora

1- PROJE BAŞLIĞI

Nöropatik Sıçanlarda Serum Asimetrik Dimetilarginin (ADMA) düzeyleri: Akut ve Kronik L-arginin Uygulamasının Etkisi

2- PROJE PERSONELİ

Adı ve Soyadı	Unvanı	Telefon (İş)
Proje Yöneticisi : Ahmet ULUGÖL	Prof. Dr.	Tel: 235 39 25
Araştırmacılar : Emin HAFIZOĞLU	Dr.	Fax: 235 39 25

3- PROJE BÜTÇESİ

Teçhizatın Tanımı : Detay listesi ektedir.	Fiyatı (YTL)
03.2 Tüketime Yönelik Mal ve Malzeme Alımları	15.000
03.3 Yolluklar	
03.5 Hizmet Alımları	
03.7 Menkul Mal, Gayrimaddi Hak Alım, Bakım ve Onarım Giderleri	
06.1 Mamul Mal Alımları	
TOPLAM ÖDENEK	15.000

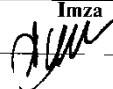
4- PROJENİN GELİŞİMİ :

1. Projenin Kabul Tarihi: 31/10/2008	4. I. Rapor Tarihi : 14.05.2009	Sonuç : (+/-)
2. Projenin Başlama Tarihi : 14.11.2008	5. II. Rapor Tarihi :	Sonuç : (+/-)
3. Projenin Bitiş Tarihi: 13.11.2009	6. III. Rapor Tarihi :	Sonuç : (+/-)
4. Projenin Süresi: 12 ay	7. IV. Rapor Tarihi : / / 200..	Sonuç : (+/-)
	8. Sonuç Raporu Tarihi: 13.11.2009	Sonuç : (+/-)

5- İLGİLİ BÖLÜM VE FAKÜLTE : Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

6- PROJENİN UYGULANMASI :

1. Bu proje 2547 sayılı YÖK Kanununun 4684 sayılı Kanunla değişik 58.maddesi gereğince, Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma Projeleri Hakkında Yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Uygulama Yönergesi çerçevesinde yürütülür.
2. Proje süresinde ve harcama fasıllarında Rektörlük onayı alınmadan değişiklik yapılamaz.
3. Proje Yöneticisi her 6 ayın sonunda gelişme raporunu, Bölüm Başkanlığı ve ilgili Dekanlık veya Enstitü Müdürlüğü aracılığı ile Rektörlüğe iletmekle yükümlüdür.
4. Projelerden alınan teçhizat tüm öğretim üyelerinin kullanımına açıktır.
5. Bir ay geçtiği halde gelişme raporu verilmemiş veya süresi bitmiş olup süre uzatımı talebinde bulunulmamış projeler iptal edilir. Bakiye ödenek, BAP Komisyonu tarafından kabul edilecek yeni projelere tahsis edilir veya diğer projelere aktarılır.

Adı ve Soyadı	İmza	Tarih
Proje Yöneticisi : Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL		14 Kasım, 2008

Komisyon Başkanı

...../.../2008

Prof. Dr. Timur KIRGIZ

Rektör Yardımcısı