

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL

**FARELERDE DİPİRONA KARŞI GELİŞEN ANALJEZİK
TOLERANSTA NİTRİK OKSİDİN ROLÜ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Ecz. İbrahim YILMAZ

EDİRNE – 2008

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL

**FARELERDE DİPİRONA KARŞI GELİŞEN ANALJEZİK
TOLERANSTA NİTRİK OKSİDİN ROLÜ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Ecz. İbrahim YILMAZ

Destekleyen Kurum: TÜBAP

Proje No: 786

EDİRNE – 2008

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi İbrahim YILMAZ tarafından tez başlığı "Farelerde Dipirona Karşı Gelişen Analjezik Toleransta Nitrik Oksidin Rolü" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 23/01/2008 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL
JURİ BAŞKANI

Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ

ÜYE

Yrd. Doç Dr. Arzu VARDAR

ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof. Dr. İsmet DÖKMECİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin ve tez çalışmalarım süresince emeği geçen çok değerli hocam Prof. Dr. İsmet DÖKMECİ' ye, bilgisini, sabrını ve emeğini üzerimden hiç eksik etmeyip, en zor zamanlarımda beni destekleyen saygıdeğer tez danışman hocam Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'e, Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Hakan KARADAĞ ve Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ'ye, asistan arkadaşlarıml Melek TAMER, Filiz ÖZYİĞİT, Fatma ÖZCAN, Ayhan TOSUNOĞLU, Özgür GÜNDÜZ, Sema HALHALLI'ya, Farmakoloji Anabilim Dalı personel kadrosuna sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

| | |
|----------------------------------------|----|
| GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| AĞRI..... | 3 |
| AĞRI MODELLERİ..... | 14 |
| NİTRİK OKSİD..... | 18 |
| DİPİRON..... | 20 |
| 7-NİTROİNDAZOL..... | 21 |
| AMİNOGUANİDİN..... | 21 |
| GEREÇ VE YÖNTEMLER | 22 |
| DENEKLER, TOLERANS OLUŞTURULMASI | 22 |
| HOT PLATE TESTİ | 23 |
| DENEY DÜZENİ..... | 23 |
| KULLANILAN İLAÇLAR..... | 24 |
| İSTATİSTİKSEL ANALİZ | 24 |
| BULGULAR..... | 25 |
| TARTIŞMA..... | 29 |
| SONUÇ..... | 36 |
| ÖZET..... | 37 |
| İNGİLİZCE ÖZET..... | 38 |
| KAYNAKLAR..... | 39 |
| RESİMLEMELER LİSTESİ | 46 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 47 |

SİMGE VE KISALTMALAR

| | |
|------------------|---------------------------------------------------|
| 7-NI | : 7- Nitroindazol |
| CGRP | : Calcitonin-gene related peptide |
| IASP | : International Association for the Study of Pain |
| LDP | : Long term depression |
| LDP | : Long term potentiation |
| NAD ⁺ | : Nikotin amid adenin dinükleotit |
| NADPH | : Nikotin amid adenin dinükleotit fosfat |
| NMDA | : N-metil-D-Aspartat |
| NO | : Nitrik oksit |
| NOS | : Nitrik oksit sentetaz |
| NSAİİ | : Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar |
| SF | : Serum fizyolojik |
| TNF- α | : Tümör nekrozis faktör- α |
| VPL | : Ventralis posterior lateralis |
| VPM | : Ventralis posterior medialis |
| WDR | : Wide dynamic range |

GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde kullanılan ağrı kesici ilaçlar arasında opioid ilaçlar, güçlü etkinliklerine karşın, istenmeyen etkilerinin fazlalığı ve etkilerine tolerans gelişmesi nedeniyle etkin bir şekilde kullanılmamaktadırlar. Bu nedenlerden dolayı, non-steroid antiinflamatuar ilaçlar (NSAİ) özellikle şiddetli olmayan ağrılarda çok daha fazla tercih edilmektedirler. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda NSAİ'in analjezik etkilerine karşı da tolerans gelişebildiği gösterilmiştir (1,2). Bu durum günümüzün en fazla kullanılan bu ağrı kesici ilaç grubu için çok ciddi bir sakınca olarak gözükmekte olup, bu istenmeyen etkinin giderilmesi son derece önemlidir. Bu nedenle, NSAİ'in analjezik etkilerine karşı gelişen bu toleransın etki mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir.

Nitrik oksit (NO) ile ilgili yapılan araştırmalar, gerek ağrının oluşmasında gerekse ilaçların analjezik etkilerindeki rolü nedeniyle son senelerde belirgin derecede artmıştır. Opioid ilaçlara karşı gelişen toleransta da NO'nun rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (3,4,5,6,7). Bu verilerden yola çıkarak, NSAİ'a karşı gelişen analjezik toleransta da NO' nun rol oynayabileceğini düşündük. Bu amaçla farelerde, bir NSAİ ilaç olan dipiron (metamizol) kullanılarak tolerans geliştirildikten sonra, nöronal nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü 7-nitroindazol (7-NI) ve indüklenebilir NOS inhibitörü aminoguanidin kullanarak, bu toleransı önlenmeyi planladık. Bu şekilde, dipirona gelişecek toleransta hangi NOS tipinin (nöronal ya da indüklenebilir) daha önemli olduğunu belirlemeyi ve aynı zamanda NO prekürsörü L-arginin kullanarak, varsa inhibitörlerin önleyici etkilerinin NO'ya bağlı olup olmadığını göstermeyi amaçladık.

NOS inhibitörlerinin belirtilen durumlarda etkili olduğunun bulunması, NSAİİ'a karşı gelişen analjezik toleransın halen yeteri derecede aydınlatılmamış olan etyopatogenezi ile ilgili yeni bilgilere ulaşılmasına ve tolerans gelişmesini önlemek için yeni ilaçların ya da kombinasyonların kullanılabilmesine olanak sağlayabilecektir.

GENEL BİLGİLER

AĞRI

“International Association for the Study of Pain” (IASP) tarafından 1979’da, “vücudun belli bir bölgesinde hissedilen, organik bir nedene bağlı olan veya olmayan, kişinin geçmişteki deneyimleri ile ilgili, sensoryal, emosyonel, hoş olmayan bir duygu deneyimi“ olarak tanımlanan ağrı, duyu ve duygu kavramlarını bir arada içermektedir (8). İki komponenti vardır: İlki fizyolojik veya periferik komponenttir ve santral sistemlere giden pür anatomik yolları içerir. Bu duyusal inputtur ve sinirlerin özellikleri ile birlikte yüksek merkezlerdeki gerçek enformasyonu oluşturur. İkincisi santral veya psikolojik komponenttir ve bu da duyusal diskriminatif boyut, motivasyonel-afektif boyut, kognitif değerlendirme boyutu olmak üzere üç majör psikolojik boyut içermektedir.

Ağrı nosisepsiyon içinde bir algılama olayıdır. Latince *Noci* zarar veya zedelenme anlamındadır. Travmatik veya zararlı stimulasyona nöral cevaptır. Tüm nosiseptör aracılı uyarılar ağrı oluşturur, ancak tüm ağrılar nosisepsiyondan kaynaklanmaz. Nosiseptörlerin ağrıyı iletmedeki sürekliliği miyelinli A- δ ve miyelinsiz C lifleri ile sağlanmaktadır. Böylece uyarılar spinal korda kadar taşınırlar ve beyine ulaşmadan önemli ölçüde modifiye olurlar. Cilt, kas, bazı viseral dokuları inerve eden A- δ ve C lifleri, çapları ve ileti hızları ile birbirinden ayrılırlar. A- δ liflerinin çapı 2-5 μ m, ileti hızı 12-30 m/sn iken, C liflerinin çapı 0,4-1,2 μ m, ileti hızı 0,5-2,3 m/sn’ dir. Yapı olarak A- δ lifleri az miyelinsiz, C lifleri ise miyelinsizdir. Eşik aktivasyonlarını

düşüren nosiseptif bir uyarının ilk dalgalarıyla bu sinirlerin uçları duyarlı hale gelir. Bu durum agrege ya da lezyonlu doku çevresinde serbestlenen bazı endojen mediyatörler (kininler, serotonin, histamin, H⁺ ve K⁺ iyonları) tarafından kolaylaştırılan hiperaljezi olayıdır. Prostaglandinler, bu endojen mediyatörlerin aljezik etkilerine karşı serbest sinir uçlarını duyarlı hale getirirler (9).

Ağrı genelde doku zedelenmesine bağlı, yani nosiseptif nitelikte bir duyudur (10). Nosisepsiyon potansiyel olarak doku hasarı oluşturabilecek stimuluslar tarafından, özellikle ağrılı uyarılara veya uzaması halinde ağrı oluşturacak uyarılara karşı duyarlı, sinir sistemi üzerinde oluşturulan bir aktivite, organik ve psikolojik faktörler arasındaki etkileşim tarafından belirlenmektedir (11).

Ağrı tanımlanmasında kullanılan bazı terimler;

Allodini: Ağrı şeklinde algılanmaması gereken dokunmayı ağrı şeklinde hissetmektir.

Analjezi: Ağrı duyusunun olmaması demektir.

Dizestezi: Uyarının nahoş ve anormal algılanmasıdır.

Hipoaljezi: Ağrılı uyarılara karşı azalmış reaksiyona denir.

Hiperestezi: Ağrılı uyarılara artmış olan reaksiyon, sensoriyal liflerin aşırı duyarlılığıdır.

Hipoestezi: Hafif dokunma, bası ve ısıya karşı azalmış olan cilt duyarlılığıdır.

Kozalji: İlgili bölgeye çok hafif dokunma bile ağrı oluşturabilir.

Nöralji: Bir spinal veya kranial sinirin dağılım alanında görülen, tekrarlayıcı, şiddetli ve genellikle ilgili cildin uyarılması ile başlayan ağrıdır.

Parestezi: Belirli bir bölgede, herhangi bir uyarı olmaksızın, spontan olarak, iğnelenme, karıncalanma, uyuşma hissedilmesidir.

Hiperaljezi: Zararlı uyarılara karşı abartılı reaksiyondur.

Fizyolojik ağrı: Doku hasarı yapabilecek şiddete yakın, ancak belirgin bir inflamasyon ya da sinir hasarı uyarılarının neden olduğu duyu şeklidir. Mekanik, termal veya kimyasal uyarıların etkileri, bası, yanma, sıcak ve soğuk şeklinde algılandıkları halde derecenin biraz üstüne çıktıklarında, artık ağrı olarak algılanmaktadır.

Patolojik ağrı: Doku inflamasyonu ve sinir hasarı sonucunda ortaya çıkan ağrıdır.

Ağrı Sınıflandırması

Ağrı, mekanizmalarına, başlama süresine veya kaynaklandığı bölgeye göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir;

Mekanizmalarına göre (11,12):

a. Nosisseptif ağrı: Fizyolojik birtakım olayların ve süreçlerin nosisseptör adı verilen ağrı algılayıcılarını uyarmasına bağlı olarak ortaya çıkar. Nosisseptörlerin çeşitli somatik kökenli ağrılarda, viseral ağrılarda olduğu gibi uyarılmasıyla genellikle ağrı olarak bildiğimiz ve sızlama şeklinde, bıçak batar gibi ve zonklama olarak tanımladığımız tarzda ağrı ortaya çıkar.

b. Nöropatik ağrı: Somatosensoryal sistemin anormal uyarılmasına bağlı uyarılar için kullanılır. Periferik sinirlerde, travma veya metabolik hastalık sonucunda nosisseptörlerin doğrudan etki altında kalmasıyla ortaya çıkan ağrıdır. Hoş olmayan uyuşukluk hissi, yanma, elektrik çarpması, karıncalanma ve keçelenme gibi hisler mevcuttur.

c. Deaferentasyon ağrısı: Periferik veya santral sinir sistemindeki lezyonlara bağlı olarak somatosensoryal uyarıların santral sinir sistemindeki iletiminin kesilmesine bağlı olarak ortaya çıkar. Bir anlamda sinirin elektriksel deşarjında kısa devreler meydana gelmekte ve bu kısa devreler bir odak olarak ağrıya yol açmaktadır ve yanıcı özelliktedir.

d. Reaktif ağrı: Vücudun çeşitli olaylara karşı bir reaksiyonu olarak, motor ve sempatik aferentlerin refleks aktivasyonu sonucu nosisseptörlerin uyarılması ile ortaya çıkan ağrıdır. Miyofasiyal ağrılar bu grupta yer alırlar.

e. Psikosomatik ağrı: Hastanın psikososyal veya psişik sorunlarını ağrı biçiminde algılaması, ifade etmesidir.

Başlama süresine göre (12):

a. Akut ağrı: Yaralanma, infeksiyon veya cerrahi girişimlerden sonra oluşan lezyon sonucunda ani olarak başlayan, nosisseptif nitelikte olan, doku hasarı ile başlayıp, yara iyileşme sürecinde giderek azalan ağrı tablosudur.

b. Kronik ağrı: Birçok defa nosisseptif nitelikte olup, üç ila altı aydan daha uzun süren ve yararlı biyolojik amacı olmayan ağrıdır. Otonomik yanıtlar akut ağrıdaki kadar fazla olmamakla beraber, sempatik tonusun artışı ve nöroendokrin fonksiyonda artış belirgindir.

Kaynaklandığı bölgeye göre (12) :

a. Somatik ağrı: Genellikle somatik sinir lifleri ile taşınan ağrıdır. Aniden başlayan ve keskin olup, iyi lokalize olan, batma, sızlama, zonklama tarzında olan ağrılardır.

b. Viseral ağrı: İç organlardan kaynaklanan, çoğunlukla künt tarzda olup, yavaş yavaş artan, kolay lokalize olmayan ve başka bölgelere doğru yayılan ağrılardır.

c. Sempatik ağrı: Sempatik sinir sisteminin aktive olmasıyla ortaya çıkan, yanma tarzında kendini belli eden ağrılardır.

Ağrının Periferik Bileşenleri

Nosisepsiyon: Ağrı, kapsülsüz sinir sonlarının aktivasyonu sonucu doku yaralanmasıyla oluşur. Bedenin bir bölgesindeki doku yaralanmasında uyarının özelleşmiş sinir uçları ile (nosiseptör) alınıp, santral sinir sistemine götürülmesi, belirli bölge ve nöral yapılarda entegre edilmesi, bu zararlı tehdidin (noxious uyarı) algılanması, buna karşı fizyolojik, biyoşimik ve psikolojik önlemlerin harekete geçirilmesidir.

Nosisepsiyon, doku hasarı ile ağrının algılanmasında oluşan karmaşık elektrokimyasal olaylar serisinin bütünüdür (13,14). Aljezik ve hiperaljezik etkenlerin etkileşmesinin ağrı ile ilişkisi, bu maddelerin belirli bir konsantrasyondaki solüsyonlarını insan cildinde üstü açılmış veziküllerin tabanına sürmek kaydı ile etraflı olarak incelenmiştir. Buna göre hiperaljezi tek başına ağrılı bir durum değildir, bunun en somut örneği güneş yanıklarındır. Güneş yanığına uğramış olan cilt bölgesinde genellikle ağrı olmaz, ancak ağrı yapıcı etkenlere duyarlılık çok artmıştır. Aljezik bir etken olan bradikininin dokuda prostaglandin sentezini stimüle edip indirekt olarak hiperaljezi de yaptığı tespit edilmiştir (15).

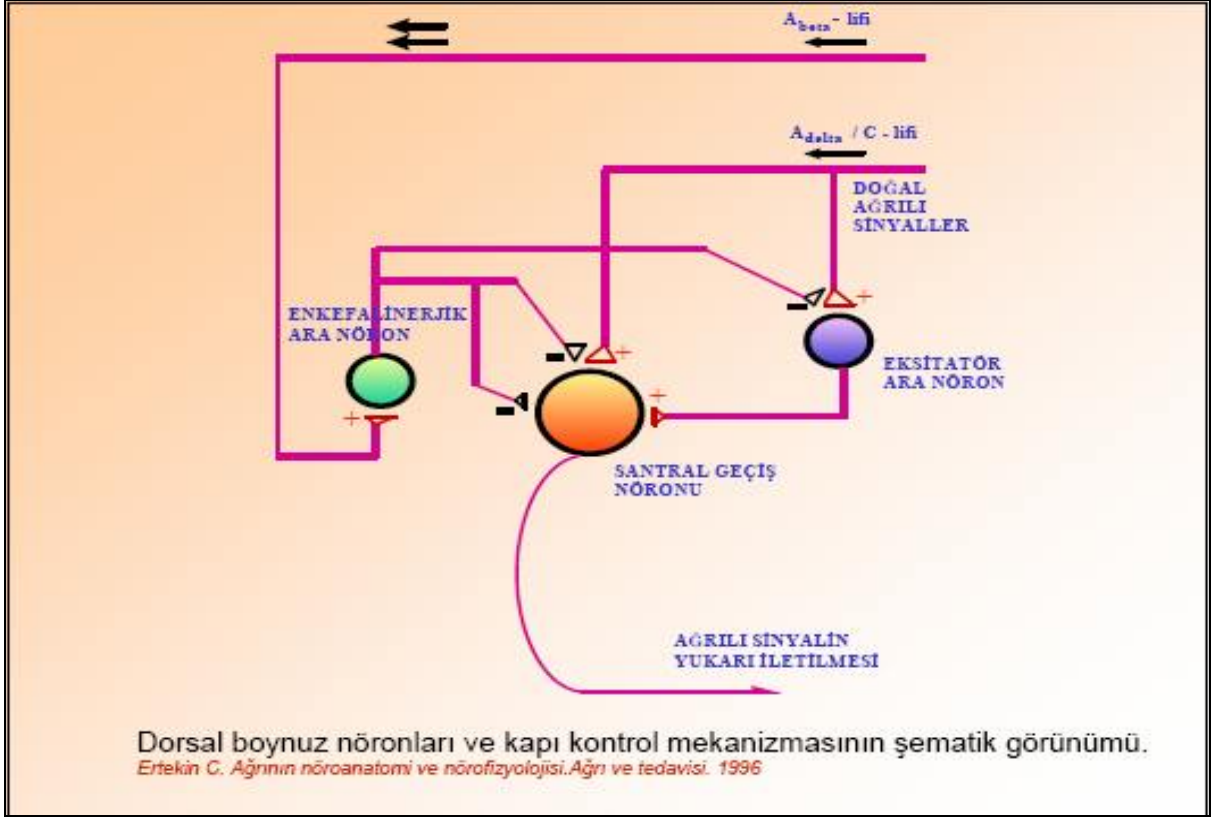
Nosiseptörler ile bunların çevrelerindeki düz kaslar, kapillerler ve aferent sempatik sinir uçları nosiseptörlerin mikro çevresini oluşturmaktadırlar. Nosiseptörler mekanik tipi uyanlarla uyarıldıkları gibi, endojen aljojenik maddeler (P maddesi, bradikinin, histamin, protonlar, prostaglandinler, lökotrienler, interlökinler, TNF- α , CGRP) adı verilen biyokimyasal maddelerle de duyarlılıkları arttırılabilir veya eksite edilebilirler (Tablo 1).

Tablo 1. Periferel duyarlılıkta oluşun nöroaktif maddeler

| Madde | Kaynak | Sinir sonundaki etkileri |
|----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| P maddesi | Sinir terminalleri | Sensitizasyon |
| Bradikinin | Plazma Kininojen | Aktivasyon |
| Histamin | Trombositler, mast hücresi | Aktivasyon |
| Protonlar (düşük pH) | İskemi, zedelenmiş hücreler | Aktivasyon |
| Prostaglandinler | Araşidonik asit, zedelenmiş hücreler | Sensitizasyon |
| Lökotrienler | Araşidonik asit, zedelenmiş hücreler | Sensitizasyon |
| İnterlökinler | Mast hücreleri | Aktivasyon ve Sensitizasyon |
| TNF- α | Mast hücreleri | Aktivasyon ve Sensitizasyon |

Uyarıya spesifik nosiseptörler dışında, nosiseptörler büyük oranda birden fazla ağırlı uyarana cevap verirler. En çok bulunan termal stimullara yanıt veren mekano-termal nosiseptörler ve mekanik nosiseptörlerdir. Bu nosiseptörler hem C lifleri hem de A- δ lifleri aktive ederler. Bunlardan insanlarda en fazla görülen: mekano-termal nosiseptörler C grubu liflerin ucunda yer alırlar ve kimyasal stimullara da cevap verirler. Bu nedenle C grubu lifler polimodal nosiseptörler olarak adlandırılırlar (16,17).

A- δ liflerindeki mekano-termal nosiseptörlerin aktivasyonu ile keskin, iyi lokalize olan ve iğneleyici bir ağırlı oluşur. Ağırlıya ek olarak dokunma, titreşim, basınç duyuları ise Paccini ve Meissner korpüskülleri ve Merkel hücrelerinde sonlanan A- β lifleri ile taşınmaktadır (16,17). Nosiseptörlerin fonksiyonu; termal, mekanik ve kimyasal enerjiyi transduser olarak elektriksel sinyaller haline çevirmek, daha sonra çevirmiş olduğu bu uyarıların aferent lifler yolu ile omuriliğe iletilmesini sağlamaktır (18). Omurilikten üst merkezlere doğru ağırlı uyarılarının yayılması segmenter mekanizmalarla modüle yada inhibe edildiği teorisi Melzack ve Wall tarafından 1966'da öne sürülmüştür (Kapı kontrol teorisi, Şekil 1).



Şekil 1. Kapı kontrol mekanizması (19)

Bu teoriye göre, A- β gibi büyük çaplı liflerin uyarılmasının nosiseptif uyarılara omuriliğin bağlantı nöronlarının yanıtlarını inhibe edilebildiği gösterilmiştir. Bu teknikten tedavide de yararlanılabilmektedir.

Dorsal Boynuz Nöronal Sistemi

Primer aferent lifler;

Spinal gri madde üç fonksiyonel bölgeye ve anatomik olarak da 10 laminaya ayrılmaktadır:

- 1- Arka boynuz (Lamina I-VI)
- 2- Ara bölge (Lamina VII)
- 3- Ön boynuz (Lamina VIII-IX)

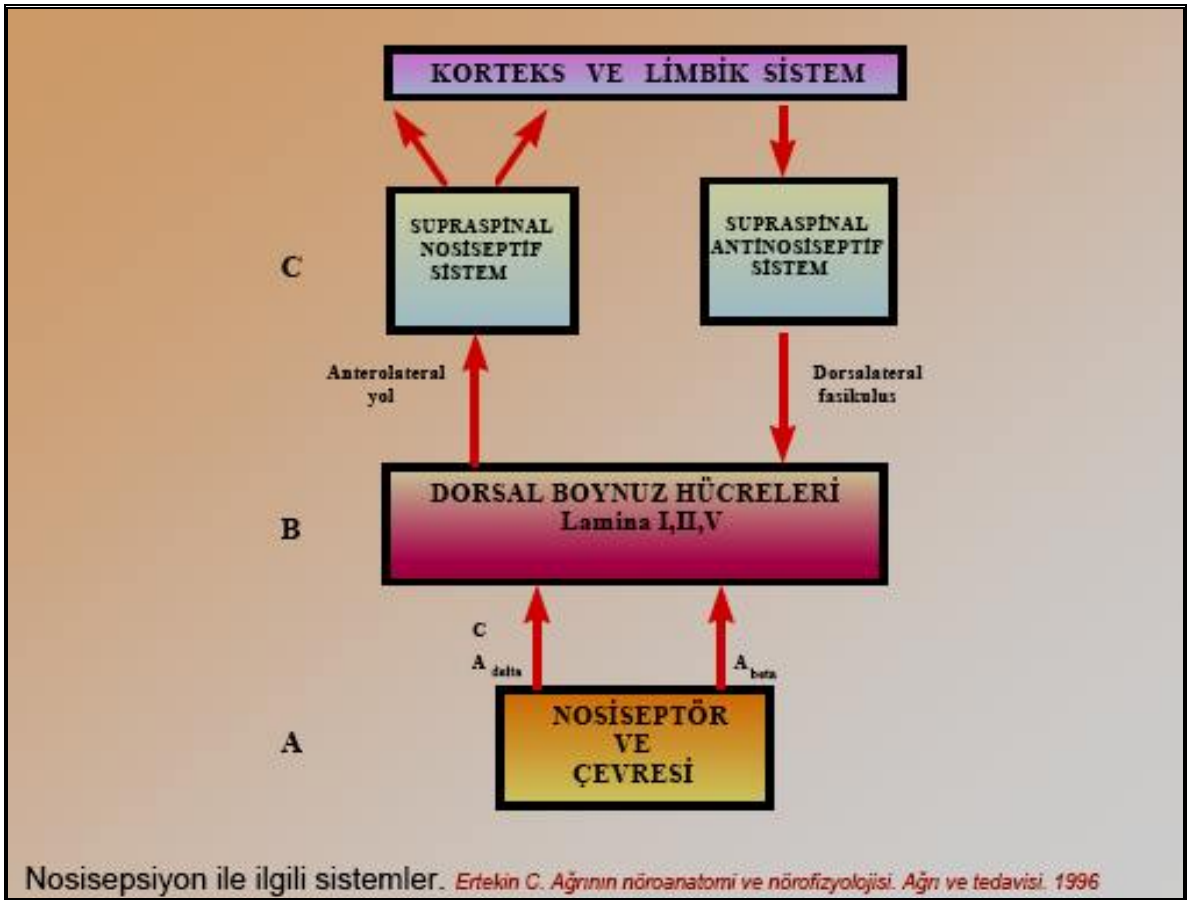
Ağrı ile ilişki olan laminalardan en önemlileri aşağıda belirtilmiştir (20).

Lamina-I: En dış tabakadır. Esas fonksiyonu A- δ ve C lifleri gibi küçük çaplı aferent liflerden gelen ağrılı uyarıları almaktır. Eşikleri oldukça yüksek olup, anterolateral traktus ile talamusa yansır.

Lamina-II: Küçük hücreler içeren bu tabaka "Substantia gelatinosa" olarak da isimlendirilir. Substantia gelatinosa hücreleri ağırlı uyarıların iletilmesinde inhibitör etki yapmaktadır. Bu hücreler dokunma, basınç ve ağırlı uyarılarıyla aktive olurlar. Substantia gelatinosa hücreleri kendi aralarında sinaps yaptıkları gibi lamina-IV hücreleri ile de sinaps oluşturmaktadırlar. Bu hücrelerin aksonları kısa olduğundan çok azı anterolateral traktus ile talamusa ulaşmaktadır. Nükleus rafe magnus ve nükleus retikularis paragigantoselüleristen gelen aksonlar ise omurilik dorsal kısmında lamina-II-III seviyelerinde sinaps yaparlar.

Lamina-IV: Bu hücre tabakası küçük lokalize cilt alanlarından gelen, ağrı oluşturmayan duyuşal impulsı taşıyan, kalın kutaneal aferent lifleri alır. Bu hücreler düşük bir eşik değere sahiptirler. Hassas uyarılara yanıt oluştururlar ve nöronları çok geniş çaptadır.

Lamina-V: Nöronları lamina-IV nöronları ile aynı çapa sahip nöronları içerir ve fizyolojik olarak daha geniş algılayıcı alanlar içermektedirler. Çok hassas dokunuşlar bile bu hücrelerin aktivasyonu için yeterlidir. Lamina-V hücreleri talamusa, anterolateral traktus ile taşınmaktadır.



Şekil 2. Nosisepsiyon ile ilgili sistemler (19)

δ ve C lifleri omuriliğe girince ikiye ayrılır ve birkaç segment yukarı aşağı seyrederek Lissauer Traktusu'nun bir kesimini oluştururlar. Bu liflerin akson kollateralleri de dorsal boynuz içine girer. Nosiseptif sinir uçlarının bu santral terminalleri dorsal boynuz gri cevherinin lamina-I (marjinal bölge) ile lamina-II (substantia gelatinosa)'de yer alan nöronlarla sinaps yaparlar. Bazı A-δ liflerinin uzantıları ise daha derinlerde lamina-V hücrelerine ulaşır.

Dorsal boynuzda bulunan nöronlar üç grupta toplanır;

1. Lokal eksitator ara nöronlar: Genellikle A-δ ve C lifleri ile gelen sinyaller ile aktive olan bu nöronlar, ağırlı sinyalleri projeksiyon nöronlarına geçirmekle görevlidirler ve projeksiyon nöronlarını eksite ederler.

2. Santral geçiş hücreleri (Projeksiyon nöronları): Bu nöronlar eksite oldukları zaman meydana gelen impulslar, anterolateral aferent sisteme geçer ve ağrı olayı üst merkezlerde algılanır. Bu nöronların aktivitesi bir takım daha küçük ara nöronlarla kontrol edilir.

Projeksiyon nöronlarını iki alt grupta incelememiz mümkündür;

a. Nosiseptif spesifik nöronlar: Bu nöronlar aşırı yüksek eşığe sahip olup, potansiyel olarak dokuya zarar veren uyarana karşı selektif cevap oluştururlar. Lamina-I'de yaygın olarak bulunan ve sadece A-δ ve C lifleri ile eksite olan, ağrı iletimi için spesifik projeksiyon nöronlarıdır.

b. Wide dynamic range (WDR) nöronları: Bu nöronlar düşük oranda lamina-I ile yaygın olarak lamina-V'de bulunur. Hem zararsız hem de zararlı uyarılara yanıt vermelerinden dolayı bu şekilde adlandırılmışlardır. Zararlı uyarana karşı cevapları maksimal olup, uyarıyı yoğunluğunun frekansına göre değerlendirmektedirler.

3. İnhibitör ara nöronlar: Daha yüksek merkezlere ağırlı uyarıların akışını düzenlemede önemli rol alırlar. Genellikle geniş çapa sahiptirler, miyelinli A-β grubu aferent liflerle uyarılırlar. Bu nöronlar nosiseptif sinyalleri iletmezler. Ancak bu ara nöronlar, geniş çaplı lifler ile eksite olduklarında, projeksiyon nöronunda inhibisyon oluştururlar (21).

Ağrıda Rol Alan Nörotransmitterler

Ağrı sinyallerinin iletiminde üç tür kimyasal madde rol almaktadır;

- 1- Aminoasitler
- 2- Nöropeptidler

3- Monoaminler

Aminoasitler grubunda yer alan nörotransmitterlerden glutamat, A- δ terminal uçlarından ve motor nöronlara sinaps yapan aferentlerden salgılanan eksitatör bir aminoasittir. Dorsal boynuz projeksiyon hücrelerinde çok kısa süreli veya çok uzun süreli depolarizasyon yapabilir. Çok kısa etkisini AMPA, uzun süreli etkisini N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir.

Nöropeptidler grubunda yer alan nörotransmitterler, özellikle C liflerinin eksitasyonu ile oluşurlar ve projeksiyon hücrelerinde çok yavaş ve uzun süreli depolarizasyona yol açarlar. Bunlara P maddesi, Nörokinin-A, kolesistokinin, galanin ve CGRP örnek olarak verilebilir. C liflerinin uçlarından birden fazla nöropeptid salgılanabilir.

Monoamin grubunda ise, noradrenalin, serotonin, asetilkolin ve NO gibi aminler örnek verilebilir. Bu aminlerin yaptığı ağrıya belki de oluşturdukları akut inflamasyon neden olur veya farklı reseptör alt tipleri analjezik etkiye aracılık edebilir. NO, NOS aktivasyonu sonucunda L-arginin'den sentezlenir. Buradan presinaptik uca geçerek sinaptik aralığa glutamat salınımına neden olur (15,22).

Ağrı Yolakları

Ağrı ile ilgili yolaklar ikiye ayrılır (Şekil 3):

- 1- Nosisseptif çıkıcı yolaklar
- 2- Antinosiseptif inisiyasyon yolakları

Nosisseptif çıkıcı yolaklar (19,23,24,25,26):

Spino-talamik yolak: Nosisseptif uyarı geldiğinde lamina I, V ve VII nöronlarından köken alır, orta hattı geçer, anterolateral çıkıcı sistem içinde ilerler ve spinal kordun karşı tarafında, talamusun ventral posterolateral çekirdeğinde sonlanır. Bu nükleus vücudun özel bölgeleri için bölümlere ayrılmıştır. Her bölge kendi primer duyu korteksinin bölümüne projekte olur. Talamusdan çıkan uzantılar da kortekse giderek postsentral gyrus'da sonlanır. Bu yol ağrının yer, şiddet ve zaman gibi özellikleri ile birlikte algılanmasını sağlar.

Spino-retiküler yolak: Anterolateral çıkıcı sistem içinde ilerler ve çapraz yapmış dorsal boynuz aksonlarından oluşur. Bulbus ve pontaki retiküler çekirdek gruplarına uzanır veya kollateraller verir. Spinal kordun iki tarafındaki sağ ve sol talamus

intralaminar çekirdeklerine çıkar. Daha sonra nöronal bilgi singulat girus'un ön parçası, amigdala, hipotalamus gibi birçok beyin bölgesine ulaşır. Acı yolağı olarak isimlendirilir. Korteksi ve subkortikal yapıları (limbik sistem ve diensefalon) genel bir uyanıklık içinde tutmak ve zararlı uyarana karşı genel bir alarm hali yaratmakla görevlidir.

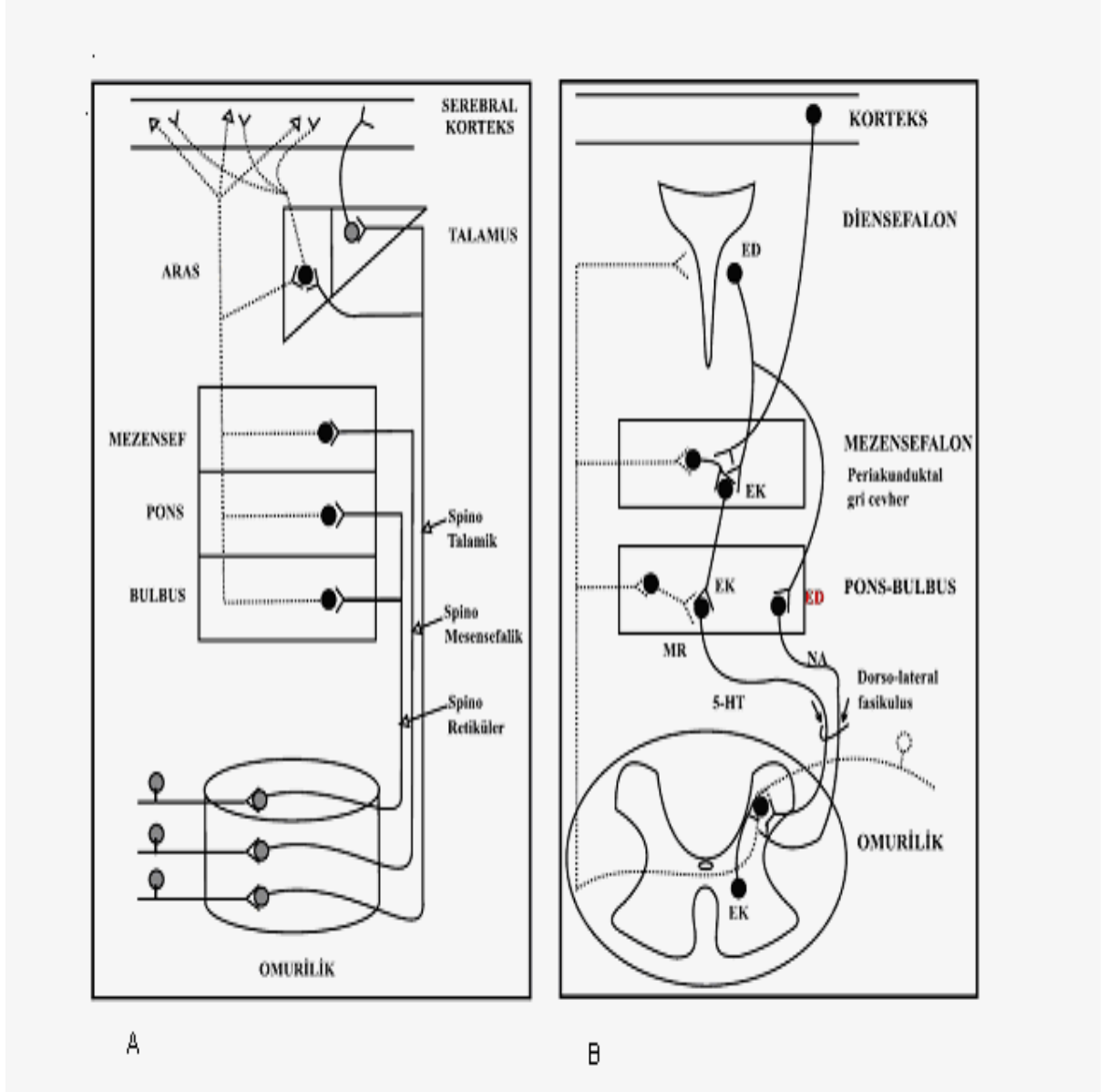
Spino-mezensefalik yolak: Dorsal boynuz lamina I ve V'teki nosiseptif projeksiyon nöronları anterolateral sistem içinde yer alır ve spino-retiküler yola çok yakın olarak mezensefalik periaquaduktal gri cevhere dek yükselir. Bu beyin kökündeki para-brakial nükleusa giden yolakla aynı veya ilgili olabilir. Ön beyindeki parabrakial çekirdek, amigdala, hipotalamus ve diğer limbik sistem yapılarına projekte olur. Bu yolun periaquaduktal gri cevhere bağlantı yapması nosisepsiyonda çok önemlidir. Çünkü burada analjezik etki sağlayan enkefalinergic nöronlar vardır. Periaquaduktal gri cevher antinosiseptif mekanizmaların tetiklendiği en önemli bölgelerden biridir.

Antinosiseptif inisiyasyon yolları 3 gruba ayrılırlar (Şekil 3).

1. Mezensefalik periaquaduktal gri cevherde yer alan enkefalinergic nöronlardır. Bunlar serebral korteks ve hipotalamus ile bağlantı içindedirler. Muhtemelen hipotalamus kökenli nöronlar endorfin taşımaktadır. Mezensefalonda, Sylvius kanalının çevresine yerleşmiş nöronların oluşturduğu periaquaduktal gri cevherden başlayan yol, bulbustaki retiküler formasyona giderek nukleus rafe magnus ve nukleus retikularis gigantocellularis'teki serotonergic nöronlarla sinaps yaparlar. Böylece diensefalik endorfin ve mezensefalik enkefalinergic nöronları bulbustaki serotonin nöronlarını uyarırlar. Buradan kalkan uyarılar da omurilik arka boynuzu ve trigeminal sinirin sensoriyal çekirdeğine giderek presinaptik ve postsinaptik bağlantılarla inhibisyon oluşturur. Supraspinal inhibisyondan sorumludurlar.

2. Retiküler formasyonun baz çekirdeklerinden başlayıp, omurilik arka boynuzunda sonlanan noradrenergik nitelikteki lifler. Bunların temel nörotransmitteri noradrenalin'dir. Bu yolların başlangıcındaki opioid reseptörlerin aktivasyonu ile supraspinal analjezi elde edilir.

3. Antinosiseptif spinal segmental mekanizmada özellikle spinal yerleşimli enkefalinergic nöronlar rol oynar. Dinorfin taşıyan nöronlar bu bölgede yoğundur. Tüm bu monoaminergic ve enkefalinergic antinosiseptif etkiler; hücresel düzeyde, lamina I ve II'de bulunan nosiseptif projeksiyon nöronları üzerinde K^+ iyonu membran iletkenliğini arttırarak ve hiperpolarizasyon oluşturarak ortaya çıkar.



Şekil 3. Ağrı yolları ile ilgili bölgeler. A: Çıkan yollar, B: İnen yollar (19).

Ağrı İletiminde Rol Alan Talamik ve Kortikal Çekirdekler

Ağrının iletiminde rol alan talamik çekirdekler spesifik ve non-spesifik olarak iki grupta sınıflandırılmışlardır. Spesifik çekirdekler, ventralis posterior lateralis (VPL) ve ventralis posterior medialis (VPM)'tir. VPL spinotalamik traktustan, VPM ise trigeminal duyuşal çekirdeklerden aferentleri alır. Bu iki çekirdeğe birden ventro-bazal çekirdekler denir. Non-spesifik çekirdekler ise hem ağrılı hem de ağrılı olmayan uyarılara yanıt verirler. Bundan dolayı bu çekirdekleri oluşturan nöronlar WDR nöronlar olarak adlandırılmışlardır (20).

Kortekste bazı nöronlar spesifik olarak nosiseptif uyarılara cevap verirler, bunların bir kısmı somatosensör kortekste yer almaktadır. Reseptif alanları küçük olup, klinikte çoğunlukla karşılaşılan yaygın ağrıda katkıları bulunmamaktadır. İki ayrı bölgenin nosisepsiyona yanıt verdiği gösterilmiştir;

Cingulat girus: Ağrının emosyonel komponenti.

İnsular korteks: Normal yanıtta gerekli olan duysal, kognitif ve afektif komponentleri entegre eden bölgedir ve VPL ve VPM'den doğrudan projeksiyon almaktadır. Ağrıya yanıtın otonomik komponentine katkıda bulunur. Keskin veya künt olan ağrıyı bu bölgenin lezyonu sonucunda şahıs hisseder ancak uygun emosyonel yanıtı veremez.

Ağrının Algılanma Aşamaları

Ağrı 4 aşamada algılanır;

Transdüksiyon: Sinirlerin sensoryal uçlarında, stimulusun elektriksel aktiviteye dönüştürdüğü aşamadır.

Transmisyon: İmpulsların sensoryal sinir sistemi boyunca yayıldığı aşamadır.

Modülasyon: Nosiseptif transmisyonun nöral etkenlerle modifiye olmasıdır.

Özellikle arka boynuz gri cevherde gerçekleşir.

Persepsiyon: Bireyin psikolojisi ile etkileşimi ve subjektif emosyonel deneyimleri sonucu gelişen, uyarının algılandığı son aşamadır.

Spinal veya belirli kranyal sinirlerdeki C lifleri veya A-delta liflerindeki elektriksel impulslar olarak spinal kök veya beyin köküne gider. Bir seri kompleks kimyasal etkileşimler ile sinaptik bileşkeyi geçtikten sonra sinyal nosiseptif spesifik yüksek SSS seviyelerine bir kez daha elektriksel olarak geçer veya ağrıya daha az spesifik WDR nöronlarına gider. Ağrının iletimi ve algılanması konusunda Ken Casey'in de dediği gibi nosisepsiyon dorsal boynuzda doğar, beyine ulaşınca kadar onu ağrı olarak isimlendiremeyiz (27).

AĞRI MODELLERİ

Hayvanlarda ilaçların analjezik etkilerini değerlendirilmeye yönelik güvenilir modeller oluşturulmuştur. Bu modeller genelde kimyasal, termal, mekanik uyarılara karşı gelişen ağrı ve/veya acı duygusunun eşiğinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Analjezik etki değerlendirilmesinde ideal bir test bulunamamıştır. Ağrı ile ilgili mekanizmalar medulla spinalisin farklı bölgeleri, beyin sapı, ön beyin ve periferel dokular gibi çeşitli anatomik bölgelerle ilgili olabilir. Ayrıca farklı ağrı tiplerinde farklı mekanizmalar ve anatomik bölgelerin katkısı söz konusudur.

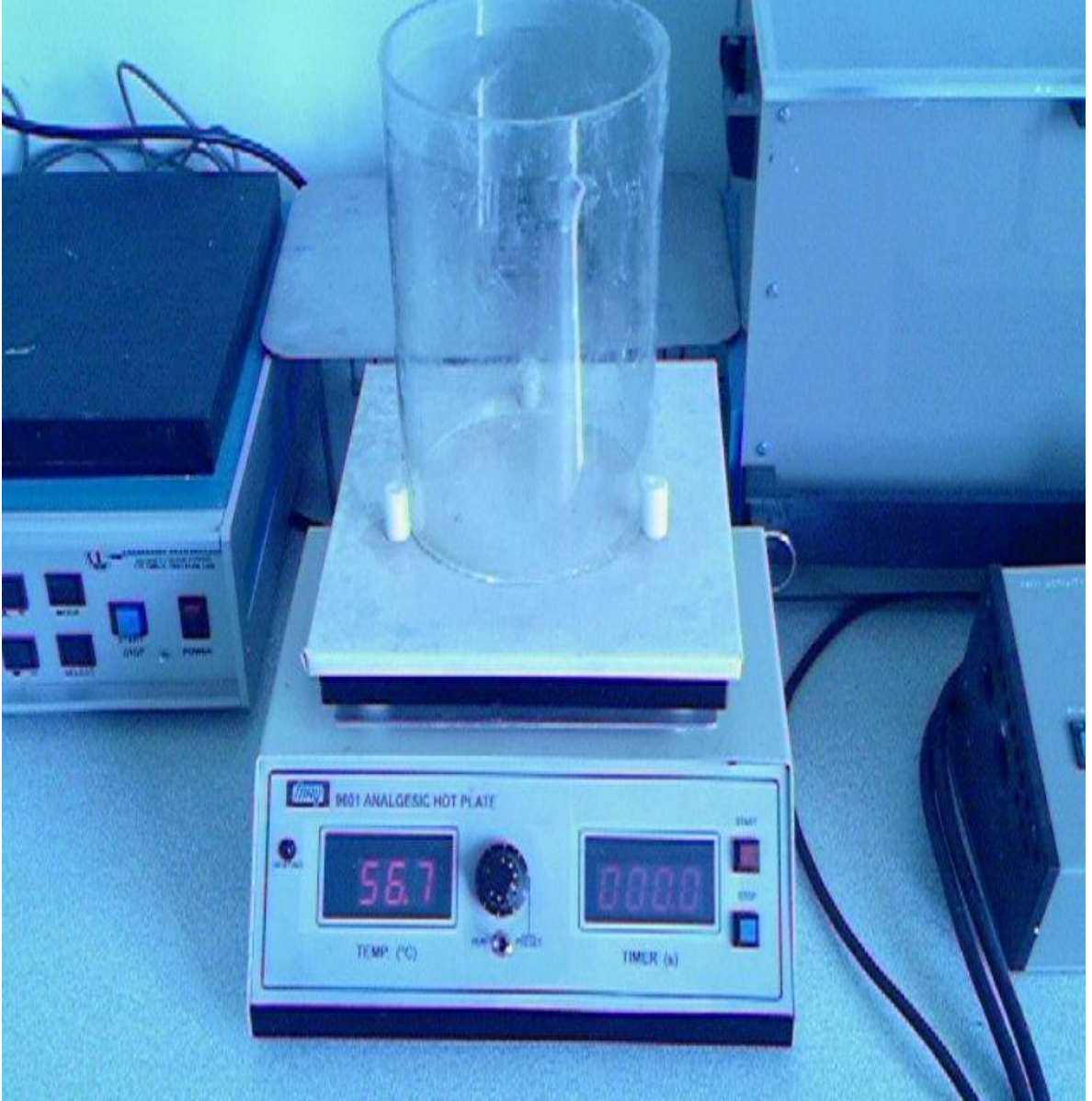
Termal Uyarı İle Oluşturulan Ağrı modelleri

Tail İmmersiyon testi: Hayvanın kuyruğu bir termostat vasıtasıyla sabit ısıda tutulan suya (veya prensip olarak 0°C'nin altında sıvı olarak kalabilen herhangi bir solüsyona) batırılır. Kuyruğun sıcak suya batırılması birkaç saniye içinde kuyruğun bazen de tüm bedenin çekilmesi ile sonlanır. Tail flick testinde olduğu gibi reaksiyon süresi hayvanın ağrı eşiğini belirler. Tail flick testinden en büyük farkı ve avantajı düşük ısılarda da çalışılabileceği için düşük analjezi potansiyeli olan ilaçlar için de kullanılabilmesidir.

Tail flick testi: Test direkt ağrı ölçümünden çok spinal nosiseptif refleksin değerlendirilmesinde kullanılır. Bu testin esası fare veya sıçanın bir lambadan gelen ve şiddeti ayarlanabilir odaklanmış ışığa, kuyruğunu çekmek sureti ile verdiği yanıtın değerlendirilmesidir. Analjezik etkisi olan ilaçlar kuyruk çekme süresini uzatırlar. Bu testte dikkat edilmesi gereken nokta deney hayvanlarının kuyruklarında önemli, kalıcı bir hasar meydana gelmeyecek şekilde bir süre belirlenmesidir. Genelde 15 sn.lik bir kesme (cut-off-time) süresi uygun olmaktadır. Hayvanlarda tail flick refleksini oluşturan sıcaklık eşik değeri sabit olmamasına rağmen, sıcaklık arttıkça, eşik değerinde arttığı bilinmektedir. Yöntemin en önemli özelliği basit olması ve reaksiyon süresinin çok fazla bireysel değişkenlik göstermemesidir.

Hot plate testi: İlk olarak 1953 yılında Eddy ve Leimback tarafından tanımlanmış ve kullanıma girmiştir (28). Hot plate testi rodentlerin ağrı eşiğinin değerlendirilmesinde halen en çok kullanılan yöntemlerdendir. Temel olarak 50-56°C'ye kadar ısıtılmış bir yüzeyden (bakır veya alüminyum) oluşur. Hayvanın ısıtılan yüzey üzerinde belli bir bölge sınırlarında kalması için hareket kabiliyetini sınırlamayacak büyüklükte cam veya pleksiglas silindireler kullanılır. Yüzeye bırakılmasından hayvanın arka ayağını çekmesine kadar olan süre hesap edilir. Literatürde en çok kullanılan yöntemlerden biri olmasına rağmen hayvanın ağrıyı algıladığı gözlemlene kriteri çeşitlilik gösterir, hangi davranışın ağrı belirtisi olarak kabul edileceği konusunda sorunlar vardır ve zor bir deney metodudur. Davranış

sadece arka ayağın çekilmesi olabileceği gibi ayak çekme ve yalama, sallama veya sıçrama şeklinde olabilir. Nadiren hayvan sadece ön ayaklarını yalayabilir veya ön ayaklarla başlayan reaksiyon arka ayağın yalanmasıyla sonlanabilir. Bir farenin normal reaksiyon süresi ortalama 5 ile 20 saniye arasında değişir. Doku hasarına neden olacağı için test 30 sn'den fazla uygulanmamalıdır (Şekil 4).



Şekil 4. Hot plate cihazı

Mekanik Uyarı İle Oluşturulan Ağrı Modelleri

Paw withdrawal/paw pressure test (Pençe çekme testi): Temelde mekanik uyarın yardımıyla ağrı eşliğinin belirlenmesinde kullanılır. İnflamasyon gibi etkenlere bağlı olarak hiperaljezinin geliştiği durumlarda idealdir. Mekanik uyarın hayvanın pençesine (metatarsallar arasında bir noktaya) uygulanır.

Bir pedal aracılığı ile giderek artan oranda basınç uygulanır. Uygulamanın sonlandırılma noktası süre değil hayvanın göstereceği tepki davranışıdır. Temel yanıt vokalizasyondur. Çoğu kez vokalizasyona ayak çekme davranışı da eşlik eder. Bu model ağrı duyarlılığının çok fazla değişmediği akut ağrı deneyleri kadar kronik ağrı, nöropati ve uzun süreli inflamasyonunun eşlik ettiği hiperaljezi durumlarında da kullanılır. Yöntem genel olarak sağlıklı ayak ile inflamatuvar maddenin enjekte edildiği ayak arasındaki farkı tespit etmeyi amaçlar. Deneyin farklı zaman dilimlerinde tekrarlanması hayvanın ağrılı uyarana duyarlılığını arttırabilir. Rölatif olarak yüksek basıncın uygulanması gerektiği durumlarda uygulanan ilacın etkinliğini tespit etmek zor olabilir. Yanıtlar oldukça yüksek bireysel farklılık gösterebilir.

Tail Pinch/Tail clip test (Kuyruk sıkıştırma testi): Temel prensipler ve hayvanın olası davranışları açısından ayak çekme testi gibidir. Uygulanan basıncın büyüklüğüne bağlı olarak ya çok kısa sürede ya da daha uzun sürede kuyruğa/klipse tepki gösterir. Araştırmada farklı şiddette uyarı sağlayan farklı klipsler kullanılabileceği gibi belli bir klipsle eşik üstü süre tespit edilebilir.

Kimyasal Uyarı İle Oluşturulan Ağrı Modelleri

Writhing test (Karın germe/kıvrınma testi): En çok fenilkinon veya asetik asit (%0,6–%0,9) kullanılır. Kıvrınma injekte edilen maddeye karşı doğal refleks olarak meydana gelir. Temel davranış karın kaslarının kasılması ve onu izleyen arka ayaklarda ekstansiyondur. Abdominal kasılmalar enjeksiyondan birkaç dakika sonra başlar. 5–10 dakikada maksimuma ulaşır. Pek çok araştırmada süre 30 dakika ile sınırlandırılmıştır. Daha çok zayıf analjezi potansiyeli olan maddelerin etki gücünü tespit etmede kullanılır. Bu yöntemin en önemli dezavantajı seçici olmayışıdır.

Formalin Test (Pençe yalama testi): Formalin, en çok kullanılan kimyasal uyarandır. %37'lik formalin solüsyonu s.c. olarak arka ayağın dorsal veya ventral yüzeyine enjekte edilir. Bu miktar faredede oldukça değişkenlik gösterir. İnflamasyon

oluşturan karragenin, serotonin, kaolin, platelet aktive edici faktör ve hardal yağı gibi maddelerde aynı biçimde kullanılabilir. Enjeksiyonu izleyen temel davranış hayvanın ayağını yalanması ve/veya ısırmasıdır. Formalin yanıtı iki aşamalıdır. Erken/akut faz enjeksiyondan hemen sonra başlar ve 5-10 dk sürer. Geç/tonik faz ise enjeksiyondan yaklaşık 15 dk sonra başlar ve 1 saat kadar sürer. Erken fazda nosiseptiflerin kimyasalla direkt uyarılması söz konusudur.

NİTRİK OKSİT

Fizikokimyasal Özelliği

Molekül ağırlığı 30 olup, -151°C kaynama noktasına sahip, hem yağda hem suda çözünebilme yeteneği sayesinde biyolojik membranlardan çok rahat geçen ve bu sayede çok önemli biyolojik roller üstlenen, çözünen guanilil siklaza bağlanarak onun aktivitesini 400 kat arttırabilen, 3-5 sn kadar kısa yarılanma ömrüne sahip gaz tabiatında bir maddedir. Basit kimyasal yapısına rağmen oldukça farklı ve zıt yönde etkileri mevcuttur (29). Şekil 5. de görüldüğü gibi L-arginin'den NOS enzimi aracılığıyla sentezlenir.

NOS İzofomları

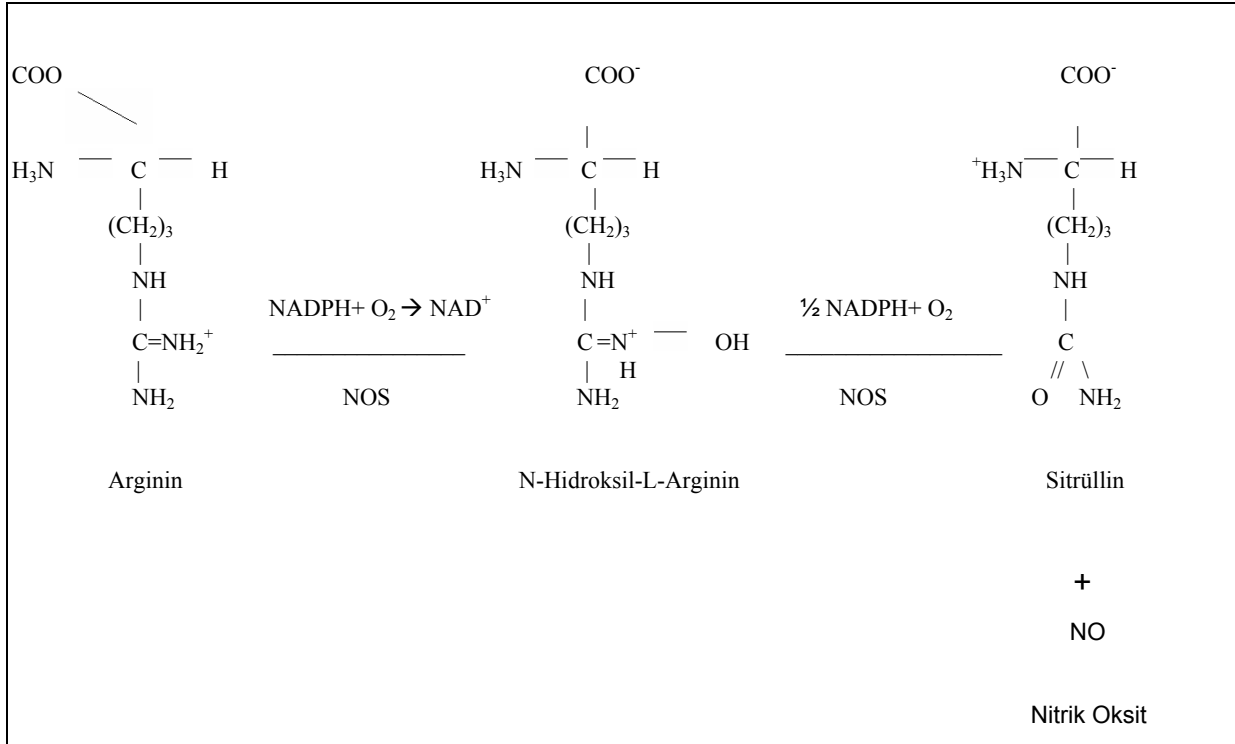
NO sentezinde kilit rol oynayan NOS enzimleri, fizikokimyasal ve kinetik özelliklerine göre 2 gruptur:

- A) Yapısal
- B) İndüklenebilir

NOS'ları sentezleyen 3 gen bulunur ve her gen bir NOS izoformunu sentezlemekten sorumludur. Yapısal NOS enzimleri hücre içerisinde lokalizedirler ve aktif hale gelebilmek için Ca^{2+} 'a ihtiyaç duyarlar. Bu özellikte, kromozom 12 tarafından kodlanan NOS1 (Nöronal NOS-nNOS) ve kromozom 16 tarafından kodlanan NOS3 (Endotelial NOS-eNOS) olmak üzere 2 adet enzimi vardır.

Kromozom 7 tarafından kodlanan NOS2, endotoksin ve/veya farklı sitokinlere cevap olarak makrofajlar ve diğer ilgili hücrelerce salgılanır ve bu indüklenebilme sayesinde iNOS olarak anılır.

- 1- Sinir ve bazı dokularda (akciğer, uterus, pankreas, mide, vb.) bulunan nöronal NOS (nNOS)
- 2- Endotel hücrelerinde yer alan endotelyal NOS (eNOS)
- 3- İmmünolojik uyarılarla indüklenen ve neredeyse bütün çekirdekli hücrelerde bulunan indüklenebilir NOS (iNOS)



Şekil 5. Nitrik oksitin NOS enzimi etkisi ile L-arginin aminoasidinden sentezlenmesi

NOS İnhibitörleri

İki grupta sınıflandırmak mümkündür;

L-Arginin Analogları: L-NMMA (monometil-L-arginin), L-NA (nitro-L-arginin), L-NAME (nitro-L-arginin metil esteri).

L-Arginin Analogu olmayanlar: 7-NI (7-nitroindazol), L-NIO (iminoetil-l-ornitin), N-(1-iminoetil)-L-lizin, merkaptometilguanidin, L-kanavanin ve aminoguanidin.

NO'nun Santral Sinir Sistemine Etkileri

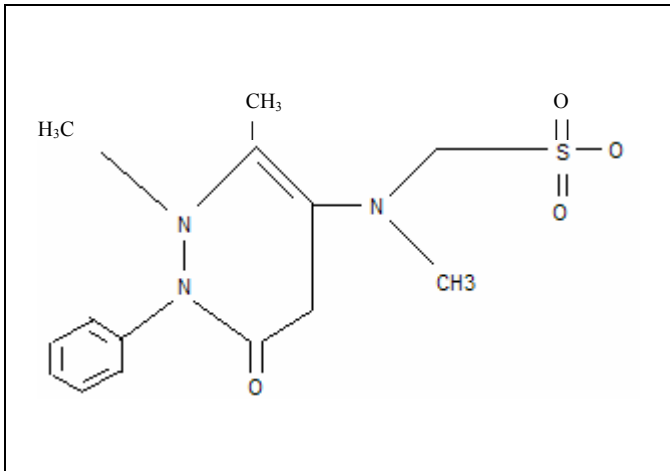
NOS enziminin serebellum, orta beyin, hipotalamus, striatum ve hipokampusta yüksek, medulla oblongatada ise düşük düzeyde mevcut olduğu belirlenmiştir. NOS'un kaynağı endotel ve nöron hücreleridir.

NO'nun öğrenme ve bellekte önemli rol oynayan *long-term potentiation* (LTP)'ye hipokampusta ve *long-term depression* (LTD)'ye serebellumda neden olduğu gösterilmiştir. Glutamat, NMDA reseptörlerini aktive ederek öğrenme ve belleğin temeli olan LTP'yi NO üreterek oluşturur. Glutamat reseptörlerinin aşırı stimülasyonu sonucunda fazla miktarda oluşturulan NO'nun nörodejeneratif yaralanmalara neden olduğu ileri sürülmektedir. 1974 yılında glutamatın serebellar dilimlerde siklik GMP düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir (30).

DİPİRON

Farmakolojik etkileri: Non-opioid analjezik olup, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlardan pirazolon türevidir (Şekil 6).

Siklooksijenaz enzimini inhibe edici ve antiinflamatuvar etkileri az olmasına karşın ağrı kesici özelliği kuvvetlidir. *In vivo* olarak antipiretik ve az miktarda antispazmodik etkisi de mevcuttur. Kemik iliğinde yol açtığı agranülositoz nedeniyle Amerika Birleşik Devletleri ve bazı Avrupa ülkelerinde kullanımı yasaklanmıştır (31). Ayrıca ciddi diğer bir yan etkisi de su ve tuz retansiyonuna sebep olmasıdır.



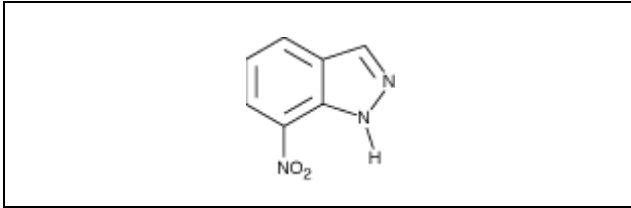
Şekil 6. Dipironun kimyasal yapısı

Suda kolay çözünür; bu nedenle enjeksiyonluk preparat yapılmaya elverişlidir. Ağızdan alındığında mide suyu içinde non-enzimatik olarak ve hızlı bir şekilde aktif metaboliti olan 4-metilaminoantipirin (4-MAA)' ya dönüşür ve o şekilde mide-barsak kanalından absorbe edilir. İntravenöz verildiğinde kanda hemen bu metabolite dönüşür. Mide-barsak kanalından absorpsiyon oranı %85 dolayındadır.

Dipiron, büyük olasılıkla kombine bir santral ve periferik etki şekline sahiptir. Aferent lifler, omurilik ve periakvaduktal gri madde düzeyindeki santral etki mekanizmaları dipironun analjezik etkisine katkıda bulunduğu sanılmaktadır.

7-NİTROİNDAZOL

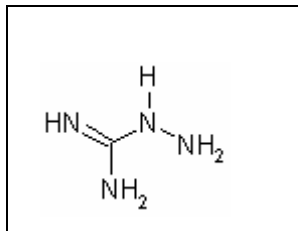
Kan basıncını arttırmaksızın antinosiseptif aktivite gösterir ve L-arginin analogu olmayan nöronal nitrik oksit sentaz inhibitörüdür (32) (Şekil 7).



Şekil 7. 7 Nitroindazolün kimyasal yapısı

AMİNOGUANİDİN

L-arginin analogu olmayan indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibitörüdür (Şekil 8).



Şekil 8. Aminoguanidinin kimyasal yapısı

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma IASP (International Association for the Study of Pain)'in Etik Komitesi'nin kurallarına uygun olarak yapılmış olup, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No: 2006/155).

DENEKLER, TOLERANS OLUŞTURULMASI

Çalışmamızda, 20–30 g olan, her iki cinsten Balb/c türü fareler kullanıldı. Hot plate testi kullanılarak yapılan bu çalışmalarda 3 farklı dozda dipiron (150, 300, 600 mg/kg) günde 2 kez i.p. olarak uygulandı ve kaç günde analjezik etkiye tolerans geliştiği belirlendi. Toleransın tam olarak gerçekleşmesi için konuyla ilgili önceki çalışmalara göre 5 ila 10 gün ilaç enjeksiyonu yapılmalıdır.

Biz çalışmamızda dipironun analjezik etkisine 7 günde tolerans geliştiğini saptadık.

Tolerans oluşturmak için yapılan deneyler yaklaşık 1 hafta boyunca devam ettiğinden, bu süre içerisinde aşırı zayıflayan ve hastalanan fareler deneyden çıkartıldılar. Deney bitiminde tüm hayvanlar yüksek dozda anestezi ile öldürüldüler.

Deneylerimizde kullanılan fareler, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edildiler ve daha sonra tüm deneyler boyunca Anabilim Dalı' mız Hayvan laboratuvarı'nda standart koşullar altında barındırıldılar.

HOT PLATE TESTİ

Bu metotta, denekler sıcaklığı 55°C olan pleksiglas silindirik bir yüzeye bırakıldıktan sonra arka pençelerini yaladıkları veya sıçradıkları zamana kadar geçen sürenin ölçümü yapıldı. Doku zedelenmesini önlemek için cut-off değeri olarak 30 sn belirlenmiş olup, bu süre içinde teste yanıt vermeyen hayvanlar cihazdan alındılar. İlaç uygulamalarından önce, stabil kontrol yanıtları elde edebilmek amacıyla deneklere 3 gün boyunca günde 1 kez hot plate testi uygulandı.

Antinosiseptif etkinin göstergesi olarak değerlendirilecek olan maksimal etki (ME) yüzdesi şu formüle göre hesaplandı:

$$\%ME = [(test\ süresi - kontrol\ değeri) / (cut-off\ süresi - kontrol\ değeri) \times 100]$$

DENEY DÜZENİ

Tolerans oluşturma ve doz belirleme çalışmaları: Öncelikle hot plate testi kullanılarak 3 farklı dozda dipiron (150, 300, 600 mg/kg, n=18) günde 2 kez i.p. olarak enjekte edilerek 7 günde analjezik etkiye tolerans geliştiği saptandı. Literatüre göre 5 ila 10 gün arasında tolerans gelişmektedir. Bu deneyler sonucunda, diğer gruplarda kullanılacak olan dipiron'un uygun dozu olarak 300 mg/kg'lık doz seçildi. Bu sırada kontrol grubu olarak kullanılacak bir grup fareye de benzer şekilde günde 2 kez i.p. olarak serum fizyolojik (SF) verildi (n=6).

Bu aşamadan sonra yapılan deneyler aşağıdaki şekilde gruplandırılmıştır:

Grup I: Dipiron (300 mg/kg) ile birlikte 7 gün boyunca 7-NI (50 mg/kg) verildi (n=6).

Grup II: Dipiron (300 mg/kg) yerine SF verilerek 7-NI'nın (50 mg/kg) tek başına etkili olup olmadığı belirlendi (7-NI için kontrol grubu, n=6)

Grup III: Dipiron (300 mg/kg) ile birlikte 7 gün boyunca aminoguanidin (30 mg/kg) verildi (n=6).

Grup IV: Dipiron (300 mg/kg) yerine SF verilerek aminoguanidinin (30 mg/kg) tek başına etkili olup olmadığı belirlendi (aminoguanidin için kontrol grubu, n=6).

Grup V: Dipiron (300 mg/kg) ile birlikte 7 gün boyunca L-arginin (200 mg/kg) verilecek idi (n=6).

Grup VI: Dipiron (300 mg/kg) ile birlikte 7 gün boyunca 7-NI (50 mg/kg) + L-arginin (200 mg/kg) verilecek idi (n=6).

Grup VII: Dipiron (300 mg/kg) ile birlikte 7 gün boyunca aminoguanidin (30 mg/kg) + L-arginin (200 mg/kg) verilecek idi (n=6).

Ancak, gerek aminoguanidin gerekse 7-NI'nin dipirona gelişen tolerans üzerine etkili olmaması nedeniyle, bu ilaçların tolerans üzerine etkilerini nitrik oksit aracılığıyla yapıp yapmadıklarının belirlenmesini sağlayacak olan son 3 grubun araştırılmasına gerek kalmadığından bu gruplar araştırmadan çıkarıldı.

Tüm ilaçlar i.p. olarak uygulandılar. Teknikteki farklılıkları minimize etmek için, davranış deneyleri aynı araştırmacı tarafından gerçekleştirildi.

KULLANILAN İLAÇLAR

Dipiron, 7-nitroindazol, aminoguanidin ve L-arginin Sigma'dan satın alındılar. Tüm ilaçlar serum fizyolojik içinde çözündürülüp i.p. yolla ve 0.1 ml/10 g'lık bir volümde uygulandılar.

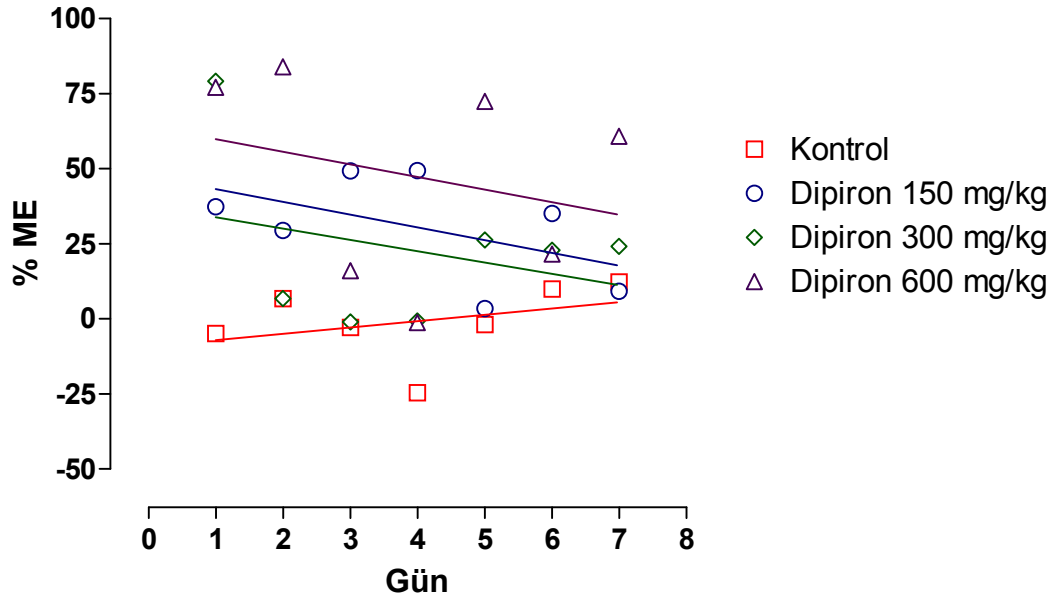
İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Deneye sokulan hayvanlar istatistik yapılabilecek minimum sayıda kullanıldılar (her grup için yaklaşık n=6). Elde edilen yanıtlar bilgisayara aktarılarak, analjezik tolerans üzerine ilaçların etkinliklerinin belirlenmesi için varyans analizi (ANOVA) ve takiben Tukey HSD testi ile istatistiksel değerlendirme yapıldı. $P < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Dipironun analjezik etkisine tolerans gelişmesi

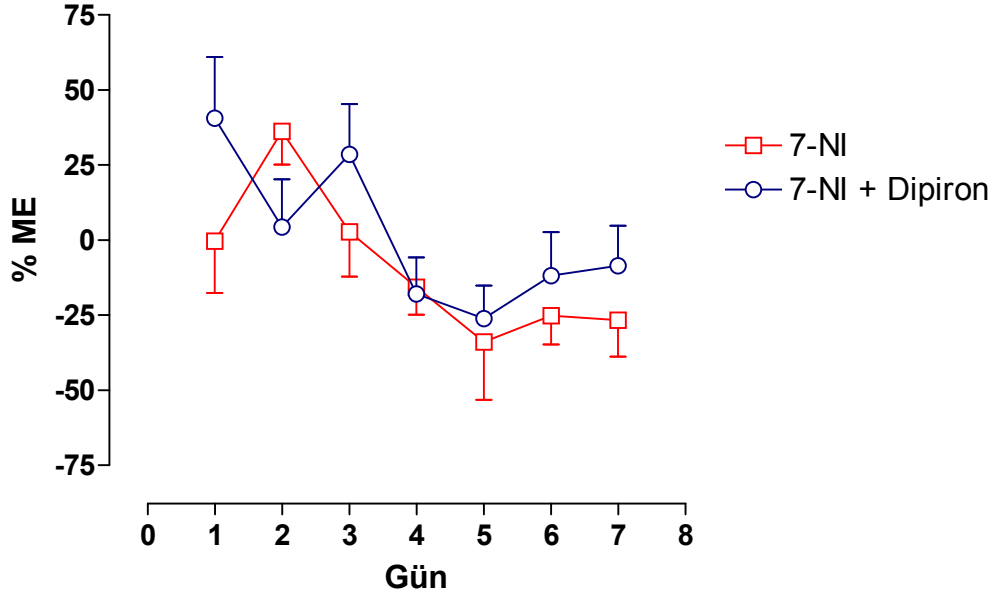
Dipiron 150 ve 300 mg/kg'lık dozlarında kullanıldığında analjezik etkisine 7 gün sonunda tolerans gelişti ($P<0.05$, Şekil 9). Buna karşılık, deneylerimizde kullandığımız en yüksek doz olan 600 mg/kg dozuna ise tolerans gelişmediğini gözledik (Şekil 9). Nitrik oksit sentaz inhibitörlerinin bu tolerans üzerine etkilerinin incelenmesi için, deneylerin daha sonraki aşamalarında kullanılmak üzere dipironun tolerans gelişen en yüksek dozu olan 300 mg/kg'lık dozu seçildi.



Şekil 9. Kontrol grubu (n=6) ve dipironun 3 farklı dozunun (150, 300, 600 mg/kg, i.p., her doz için n=6) hot plate testinde analjezi üzerine 7 günlük etkileri.

7-NI'nin dipirona karşı gelişen analjezik tolerans üzerine etkisi

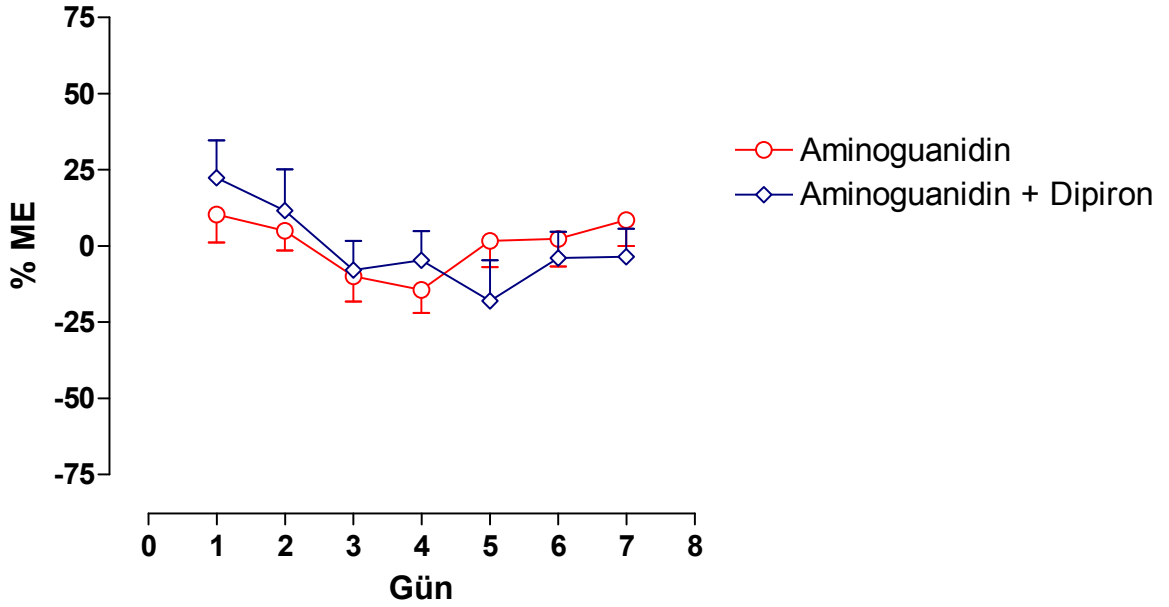
Nöronal NOS inhibitörü olan 7-NI tek başına kullanıldığında analjezik etki göstermeyen dozunda (50 mg/kg) dipirona karşı gelişen analjezik tolerans üzerine de etkili olmadı (Şekil 10).



Şekil 10. 7-NI'nin (50 mg/kg, i.p., n=6) tek başına ve dipiron (300mg/kg, i.p., n=6) ile birlikte kullanıldığında hot plate testinde analjezi üzerine 7 günlük etkileri.

Aminoguanidin'in dipirona karşı gelişen analjezik tolerans üzerine etkisi

İndüklenebilir NOS inhibitörü olan aminoguanidin tek başına kullanıldığında analjezik etki göstermeyen dozunda (30 mg/kg) dipirona karşı gelişen analjezik tolerans üzerine de etkili olmadı (Şekil 11).



Şekil 11. Aminoguanidin (30 mg/kg, i.p., n=6) tek başına ve dipiron (300mg/kg, i.p., n=6) ile birlikte kullanıldığında hot plate testinde analjezi üzerine 7 günlük etkileri.

TARTIŞMA

Opioid ilaçlar yeterli bir dozda uygulandıklarında hemen her türlü ağrı üzerine etkili ilaçlardır; ancak yüksek dozlarda kullanıldıklarında yan etki insidenslerinin artması, ajitasyon, canlı rüyalar, kabuslar, görsel veya sesli halüsinasyonlar, konfüzyon, myoklonik kasılmalar gibi toksisiteleri, bağımlılık yapma potansiyelleri ve etkilerinin önemli bir kısmına tolerans gelişmesi kullanımlarını kısıtlamaktadır (33). Bu istenmeyen özellikleri nedeniyle, özellikle şiddetli olmayan ağrılarda NSAİ ilaçlar opioid ilaçlara oranla çok daha sıklıkla kullanılmaktadırlar.

Opioid ilaçların en fazla tolerans gelişen etkilerinden birisi de analjezik etkileridir. Analjezik etkilerine karşı gelişen bu toleransı önlemek için çok sayıda araştırma yapılmış olmasına ve çok sayıda mekanizma ileri sürülmüş olmasına karşın, günümüzde opioidlerin analjezik etkilerine tolerans gelişimi halen önemli bir problem durumundadır.

Opioid ilaçların etkilerine karşı gelişen toleransta rol oynadığı düşünülen belki de en önemli mekanizma NMDA/NO sistemi ve nöromedyatör olarak da NO'dur (5,34,35). NOS tarafından ağrılı uyaranlara bir reaksiyon olarak indüklendiği düşünülen NO' nun ağrı ile yakından ilişkili olduğu kesindir (7,36). NO artan glutamat düzeylerine bağlı olarak da salıverilir. Glutamat, NMDA reseptörlerini aktive eden ve böylece sensitizasyonun başlamasında ve ağrı iletiminin sürdürülmesinde çok önemli rolü olan bir eksitatör aminoasittir. Aktive edilmiş NMDA reseptörünün kanalından kalsiyumun girişi ile NO oluşmakta ve plastisite ve santral sensitizasyon gibi olaylarda rol oynamaktadır (35).

NO'nun ağrı mekanizmaları arasında önemli rol oynadığının kabul edilmesine karşın, aynı zamanda dual etkileri olduğu da belirlenmiştir. Nosisepsiyonda temel nöromediyatörlerden biridir, ancak tonik kolinerjik ağrı inhibisyonunda da önemli bir ulak olduğu saptanmıştır (37). Nöropatik ağrı, ilaç tedavisine zor yanıt veren bir kronik ağrı durumudur. Güçlü analjezik etkili ilaçlar olmalarına karşın, opioidlerin bu endikasyondaki etkileri yeterli olmamaktadır. Ancak yüksek dozlarıyla etkili olabilmekteler, bu dozlarında da istenmeyen etkilerinin görülme insidensinin artması opioidlerin nöropatik ağrı tedavisinde kullanımlarını kısıtlamaktadır. Akut ağrıdakine benzer şekilde, nöropatik ağrı tedavisi sırasında da opioidlerin analjezik etkilerine tolerans geliştiği saptanmış, ancak bunun mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Sinir zedelenmesini takiben primer aferent nöronlarda dejenerasyon gelişmesi ve sonrasında presinaptik opioid reseptörlerde azalma görülmesi nöropatik ağrıda gelişen toleransa ilişkin kabul gören en önemli mekanizmadır (38). Ağrı iletimindeki dual etkisine benzer şekilde, nöropatik ağrı üzerine de NO'nun zıt yöndeki etkinliğine ilişkin çalışmalar vardır. Bir NOS inhibitörü olan L-NAME'in nöropatik ağrının davranışsal belirirlerini ortadan kaldırdığını gösteren çalışmalar olmasına karşın (39, 40), Lee ve ark. (6) spinal sinir ligasyonu yapılmış sıçanlarda gelişen nöropatik mekanik allodinide NO'nun rolü olmadığını ve L-NAME'nin preemtif ve terapötik etkilerinin NOS inhibisyonu aracılığıyla olmadığını bildirmişlerdir. Bu farklı sonuçların nedeni olarak, kullanılan deneklerin tür ve cinslerindeki farklılık, ilaç uygulama yöntemlerindeki farklılıklar, ölçüm yöntemlerindeki çeşitlilik, kullanılan deneysel modellerin farklılığı gösterilebilir.

Gerek akut ağrı gerekse nöropatik ağrı gibi kronik durumlarda NO'nun çok önemli rol oynadığının kabul edilmesinin yanısıra, opioid ilaçlara karşı gelişen analjezik toleransta da büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir (5,34,35). Bu konuda yapılmış olan çok sayıda araştırma özellikle morfinin farmakodinamikleri üzerine NOS inhibitörlerinin, NMDA reseptör antagonistlerinin, veya eksojen L-arginin uygulanmasının etkileri üzerine yoğunlaşmıştır. Örneğin, morfin ile non-spesifik NOS inhibitörlerinin veya NMDA reseptör antagonistlerinin kombine edilerek uygulanması sonucu NO konsantrasyonlarının azaldığı ve sonucunda antinosiseptif tolerans gelişiminin kısmen de olsa engellendiği gösterilmiştir (41, 42). Ayrıca, L-arginin ile kombine uygulanması NO düzeylerini artırmış ve morfinin analjezik etkisine fonksiyonel tolerans gelişmesiyle sonuçlanmıştır (34, 43). Beyin NO artışının hem

morfine yanıtı azaltması hem de nosiseptif uyarılara yanıtı artırması, NO üretimindeki değişikliklerin etki yerindeki opioid dispozisyonunun (farmakokinetik tolerans) yanısıra, opioid reseptör farmakolojisini de (farmakodinamik tolerans) etkileyebileceğini göstermektedir.

Opioid ilaçlara karşı gelişen analjezik toleransta NO'nun rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmasına karşın, NO düzeylerindeki değişikliklerin morfine yanıtı ne şekilde ve hangi mekanizmalarla değiştirdiğine ilişkin araştırma sayısı oldukça azdır. Bu amaçla son yıllarda NOS izoformlarına spesifik inhibitörler kullanılarak farklı NOS izoformlarının opioid ilaçlara karşı oluşan analjezik tolerans gelişimine katkıları incelenmektedir. Selektif nNOS inhibitörleri, ör. 7-nitroindazol, kullanıldığında veya antisense inhibisyonu ile opioidlere tolerans gelişmesi önlenmekte olup, nNOS konuyla ilişkili en önemli NOS izoformu olarak dikkat çekmektedir (5,34,44). Genel olarak iNOS inhibitörlerinin morfine karşı gelişen tolerans üzerine etkili olmadığını gösteren çalışmalar bulunmakla birlikte (5,45,46), yakın zamanda selektif iNOS inhibitörü aminoguanidinin NMDA reseptör aktivasyonunun sonuçları olan iNOS indüksiyonu ve NO aşırı üretimini inhibe ederek morfine tolerans gelişimini azalttığı belirlenmiştir (3). Spesifik olarak eNOS inhibisyonunun morfine antinosiseptif tolerans gelişimine etkisini gösteren bir araştırma ise henüz yapılmamıştır.

Opioidlere karşı gelişen analjezik toleransta rol oynayan en önemli mekanizma olarak NMDA reseptör aktivasyonu ve NOS aktivitesi kabul edilmektedir; bu süreç eksitator nöromediyator glutamat tarafından başlatılmakta ve retrograd sinyal ajanı NO tarafından sürdürülmektedir (35,47). Ancak, her ne kadar NMDA/NO sistemi ön plana çıksa da, çok sayıda diğer nörotransmitter ya da nöromodülatörün de analjezik toleransta rol oynadığı belirlenmiştir. Bunlar arasında serotonin, noradrenalin, dopamin, GABA-benzodiazepin, adenozin, asetilkolin, oksitosin, vazopressin vb. sayabiliriz (48). Bu nörotransmitterlerin veya nöromodülatörlerin fonksiyonlarının modülasyonu morfin toleransının indüksiyonunda ve ekspresyonunda farklı roller oynamaktadır. Raghavendra ve Kulkarni (49), melatoninin morfine karşı gelişen analjezik toleransı tersine çevirdiğini göstermişler, bu etkide melatonin reseptörlerinin ve santral benzodiazepin reseptörlerinin rol oynamadığını, buna karşın NOS aktivitesinin supresyonunun ve periferik benzodiazepin reseptörlerinin modülasyonunun bu etkiye kısmen de olsa aracılık ettiklerini göstermişlerdir.

Agmatin (dekarboksile arginin) santral sinir sisteminde bulunan, NMDA reseptörlerini antagonize eden ve NOS'u inhibe veya inaktive eden bir endojen amindir (50,51,52). Santral sinir sisteminde saptanmasından kısa süre sonra, hem sistemik hem de intratekal, yakın zamanda ise supraspinal uygulamalarıyla morfin toleransını önlediği belirlenmiştir (53,54,55). Agmatinin bu etkisinde NMDA reseptör/NOS yolağının yine ön planda gözükmesiyle birlikte, bu ilacın etkisinde imidazolin ve alfa-adrenerjik reseptörlere bağlanmasının da etkili olabileceği belirtilmektedir (55).

Opioid ilaçlara tolerans gelişmesinde glia hücrelerinin aktivasyonunun önemi son senelerde üzerinde en fazla araştırma yapılan konular arasındadır. Proinflamatuvar sitokinlerin inhibisyonunun nöropatik ağrılı durumlarda morfine karşı gelişen analjezik toleransı önlediği gösterilmiştir (56,57), terapötik olarak sitokin antagonistleri, İL-1 reseptör antagonisti, anti TNF ve anti İL-6 verilmesiyle morfine tolerans gelişmesinin engelleneceği ve morfin analjezisinin restore edileceği ileri sürülmektedir (56). Benzer etki mekanizması nedeniyle üzerinde en fazla çalışılan ilaçlardan biri de minosiklidir; bu ilaç glial aktivasyonu inhibe etmekte ve böylelikle nöropatik ağrının davranışsal belirtileri üzerine etkili olmaktadır (58,59).

Tüm bu veriler birleştirildiğinde, opioid analjeziklere karşı gelişen analjezik toleransın son derece karmaşık bir fenomen olduğu görülmektedir. Bu fenomende başta NO olmak üzere çok sayıda nörotransmitter veya nöromodülatör rol oynamakta olup, öne sürülen çok sayıda mekanizma arasında opioid reseptörlerinde *down-regulation*, peptidin reseptöre bağlanmasındaki değişiklikler, G-protein kenetli reseptör aktivasyonunun modülasyonu, reseptör bölgesindeki ilaç dispozisyonundaki olası değişiklikler en fazla kabul görenlerdir (60,61).

Opioidlere karşı gelişen toleransa benzer şekilde NSAİ ilaçların analjezik etkilerine karşı da tolerans gelişip gelişmediği konusu da araştırılmaktadır. Bu konuda genel olarak kabul edilen görüş NSAİ ilaçların antinosiseptif etkilerine karşı tolerans gelişmediği şeklindedir (62,63). Ancak, son senelerde NSAİ ilaçların etkilerine de tolerans gelişebileceğini gösteren araştırmalar yapılmıştır; bu çalışmaların çoğunda NSAİ ilaç olarak dipiron kullanılmıştır. Tortorici ve Vanegas (64) sıçanlarda dipironu periakuaduktal gri cevhere günde iki kez enjekte etmişler ve *tail flick* ve *hot plate* testlerinde 2 gün içinde antinosiseptif etkisine tolerans geliştiğini gözlemişlerdir. Hernandez-Delgado ve ark. (4) ise 600 mg/kg dipironu günde iki kez

i.v. olarak uyguladıklarında toleransın 11 gün sonunda geliştiğini saptamışlar ve morfin ile karşılaştıklarında dipirona karşı gelişen antinosiseptif toleransın daha uzun sürede ortaya çıktığını göstermişlerdir.

Analjezik ilaçlara tolerans gelişmesine ilişkin yapılan çalışmalarda genellikle atipik bir NSAİ ilaç olan dipiron kullanılmış olmasına karşın, diğer NSAİ ilaçların insanlardaki etkilerine karşı tolerans gelişmesine ilişkin şüpheler her zaman olmuştur (65). Bu şüphelere ek olarak, Walker ve Levy (66) sıçanlarda bir salisilat türevi olan diflunisalin farmakodinamik toleransa neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, sık kullanılan bir NSAİ ilaç olan ibuprofenin analjezik etkilerine karşı da insanlarda tolerans geliştiği belirtilmiştir (67). NSAİ ilaçların prototipi olan asetilsalisilatın enjektabl formu olan lizin-asetilsalisilat kullanılarak yapılmış olan bir diğer çalışmada da, bu ilacın tekrarlayan enjeksiyonlarının üç günde tam bir analjezik toleransa yol açtığı gösterilmiştir (68). Ayrıca, lizin-asetilsalisilatın bu etkisine morfine benzer şekilde endojen opioidlerin aracılık ettiği, morfin ile arasında bir çapraz tolerans ilişkisinin olduğu, böylelikle NSAİ ilaçlarla opioid ilaçların belirli etkiler açısından ortak etki mekanizmalarına sahip oldukları belirtilmektedir (68).

Yakın zamanda da NSAİ ilaçların analjezik etkilerine karşı gelişen toleransa ilişkin yeni araştırmalar yapılmış olup, Tsagareli ve Tsiklauri (1) 5 günlük i.p. uygulamadan sonra hem 250 mg/kg dipirona hem de 12 mg/kg ketorolaka tolerans geliştiğini ve morfin ile kullandıkları NSAİ ilaçların aralarında aynı zamanda bir çapraz-tolerans ilişkisinin olduğunu gözlemişlerdir. Araştırmacılar bu bulgulardan yola çıkarak opioid olmayan analjeziklerle endojen opioidler arasında yakın bir ilişkinin olduğu ve dipiron ile ketorolaka karşı gelişen toleransın büyük olasılıkla opioid toleransına bağlı olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Vazquez-Rodriguez ve ark. (2) da benzer şekilde, tekrarlayan morfin uygulamalarının analjezik toleransa neden olduğunu ve ilginç olarak aynı morfin uygulamalarının opioid olmayan bir analjezik olan dipironla aralarında da bir çapraz-toleransa yol açtığını saptamışlar ve opioid ilaçlarla NSAİ ilaçların terapötik dozlarda sistemik uygulandıklarında aynı mekanizmaları paylaşabileceği görüşünü ileri sürmüşlerdir. Araştırmamız sonucunda biz de yakın zamanda yapılmış olan bu araştırmalara benzer sonuçlar elde ettik; 150 ve 300 mg/kg dozlarında i.p. olarak günde 2 kez uygulandığında dipironun analjezik etkisine tolerans geliştiğini, 600 mg/kg dozunda ise herhangi bir etkinin oluşmadığını gösterdik.

NSAİ ilaçlar ile opioid ilaçların kombine edilerek tedavide kullanılmaları konusunda araştırmacılar arasından bir fikir birliği bulunmaktadır (69,70). Birlikte kullanıldıklarında gerek analjezik etkilerinde görölen potansiyalizasyon gerekse her iki ilaç grubunda da doz indirimi sonucu istenmeyen etkilerde görölen azalma bu kombinasyonların yapılmasının en önemli nedenlerindedir. Opioid ilaçlar arasında morfin, NSAİ ilaçlar arasında ise dipiron kendi gruplarının en fazla tercih edilen ilaçlarıdır. Opioid-NSAİ ilaç kombinasyonunun akut antinosiseptif etkide artış sağladığı ve tolerans gelişimini önlediği öncelikle hayvan modellerinde yaygın olarak gösterilmiş, daha sonra klinisyenler tarafından da uygulanmaya başlanmış olup, günümüzde Dünya Sağlık Örgütü tarafından da önerilmektedir (69,70,71). Ayrıca, son senelerde kronik tedavide de kombine analjezik uygulamasının antinosiseptif etkide artış sağladığını ve tolerans gelişimini geciktirdiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (4). Dipiron dışında diğer NSAİ ilaçlar, ör. ketorolak, ibuprofen, indometazin, kullanılarak opioidlerle yapılan kombinasyonlara ilişkin araştırmalar da vardır (69,71,72), ancak bu ilaçların etkilerinin dipirona oranla farklılık gösterip göstermediği bilinmemektedir.

Bizim bu araştırmamız da dahil olmak üzere, bu çalışmalar farklı ilaçların farklı dozlarda ve farklı yollardan uygulanmalarıyla ortaya nasıl bir etkileşimin çıktığını incelemeye yönelik olup, gerek antinosiseptif etkideki artışın gerekse toleransın gecikmesinin altında yatan mekanizmalar üzerinde durulmamıştır. Örneğin, morfin ile dipiron arasında farmakokinetik bir etkileşim olma olasılığı her zaman vardır ve bu konu üzerinde mutlaka çalışmalar yapılması gerekir (4). Bu farmakokinetik etkileşim dışında, analjezinin güçlenmesinin ve toleransın gecikmesinin nedeni olarak düşünülen mekanizmalar arasında dipironun inisi ağrı yollarında endojen opioidlerin salınımına neden olması gösterilebilir (64,73). Ancak bu mekanizma analjezik etkinin artışını açıklayabilir, fakat toleransın gecikmesini açıklayamaz, çünkü eğer dipiron endojen opioid miktarını artırıyorsa toleransın daha hızlı ortaya çıkması beklenir. Tüm NSAİ ilaçların siklooksijenaz enzim inhibisyonu yapmasının yanı sıra, NMDA reseptör antagonizması da yapılan kombinasyon sonucu ortaya çıkan analjezi potansiyalizasyonunun ve toleransın önlenmesinin nedeni olma olasılığı olan mekanizmalar arasında gösterilebilirler (72,74,75).

Biz de yukarıdaki verilerden yola çıkarak, opioidlere benzer şekilde NSAİ ilaçlara karşı gelişen toleransta da nitrik oksidin rol oynayabileceği düşündük. Bu

amaçla farelerde, dipirona tolerans geliştirdikten sonra, nöronal NOS inhibitörü 7-NI ve indüklenebilir NOS inhibitörü aminoguanidin kullanarak, bu toleransın önlemeyi planladık. Bu şekilde, dipirona gelişecek toleransta hangi NOS tipinin daha önemli olduğunu belirlemeyi ve aynı zamanda NO prekürsörü L-arginin kullanarak, varsa inhibitörlerin önleyici etkilerinin nitrik okside bağlı olup olmadığını göstermek amaçladık. Araştırmamız sonuçları, yakın zamanda yapılanlara benzer şekilde, bir NSAİ ilaç olan dipironun analjezik etkisine tolerans geliştiğini göstermektedir (1, 2). Ancak gerek nöronal NOS inhibitörü 7-NI gerekse indüklenebilir NOS inhibitörü aminoguanidin dipirona karşı gelişen tolerans üzerine herhangi bir etki göstermediler. Sonuçlarımız, opioid ilaçlardan farklı olarak, dipirona karşı gelişen analjezik toleransta nitrik oksidin rolü olmadığını göstermektedir.

SONUÇ

Akut olarak 7 gün boyunca 150, 300, 600 mg/kg dipironun günde 2 kez i.p. olarak uygulanması, termal uyarı ile oluşturulan ağrı modellerinden hot plate testi uygulanması ile değerlendirilmesi sonucunda NSAİ ilaç olan dipironun analjezik etkisine tolerans geliştiğini göstermektedir.

Ancak gerek nöronal NOS inhibitörü 7-NI gerekse indüklenebilir NOS inhibitörü aminoguanidin dipirona karşı gelişen tolerans üzerine herhangi bir etki göstermediler.

Sonuçlarımız, opioid ilaçlardan farklı olarak, dipirona karşı gelişen analjezik toleransta nitrik oksidin rolü olmadığını göstermektedir.

Çok sıklıkla kullanılan ilaçlar olan NSAİ ilaçlar ile ilgili olarak son senelerde belirlenen ve çok önemli bir problem olarak gözüken analjezik etkilerine karşı gelişen toleransın mekanizmasının yapılacak benzer çalışmalarla mutlaka aydınlatılması gerekmektedir, aksi taktir de bu ilaçların uzun süreli kullanımlarında dozlarını artırma zorunluluğu ve buna bağlı olarak istenmeyen etkilerinde artış gibi belirgin sakıncalar ortaya çıkacaktır.

ÖZET

Yakın zamanda opioid ilaçlara benzer şekilde NSAİ ilaçların analjezik etkilerine de tolerans geliştiği belirlenmiştir. Opioidlere karşı gelişen analjezik toleransta nitrik oksidin rol oynadığının gösterilmiş olması nedeniyle, biz de bir NSAİ ilaç olan dipirona karşı gelişen toleransta nitrik oksidin rolü olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Dipiron farelerde hot plate testinde i.p. 150 ve 300 mg/kg'lık dozlarda kullanıldığında analjezik etkisine 7 gün sonunda tolerans gelişti, 600 mg/kg dozuna ise tolerans gelişmediğini gözledik. Gerek nöronal NOS inhibitörü olan 7-NI (50 mg/kg, i.p.) gerekse indüklenbilir NOS inhibitörü olan aminoguanidin (30 mg/kg, i.p.) tek başına kullanıldıklarında analjezik etki göstermeyen dozlarında dipirona karşı gelişen analjezik tolerans üzerine etkili olmadılar. Bu sonuçlar bir NSAİ ilaç olan dipirona karşı gelişen analjezik toleransta nitrik oksidin rol oynamadığını göstermektedir, ancak önümüzdeki senelerde önemli sakıncalar yaratabileceğini düşünülen bu probleme karşı yeni yapılacak çalışmalarla mekanizmasının aydınlatılarak önlem alınması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: NSAİ; dipiron; analjezi; tolerans; nitrik oksid

THE EFFECT OF NITRIC OXIDE ON DIPYRONE ANALGESIC TOLERANCE IN MICE

SUMMARY

Recent investigations have shown that, similarly to opioids, tolerance develops to the analgesic effects of NSAIDs. Nitric oxide has been shown to play an important role in opioid-induced analgesic tolerance; we, therefore, planned to determine if nitric oxide also plays role in the analgesic tolerance to dipyron, a NSAID. Using the hot-plate test in mice, an analgesic tolerance developed to dipyron with its 150 and 300 mg/kg i.p. doses after 7 days, no tolerance was observed with its dose of 600 mg/kg. Neither 7-NI (50 mg/kg, i.p.), a neuronal NOS inhibitor, nor aminoguanidine (30 mg/kg, i.p.), an inducible NOS inhibitor, had any effect on dipyron-induced analgesic tolerance with doses which also had no analgesic effect when used alone. Our results show that nitric oxide does not play role in the analgesic tolerance to dipyron, however further experiments are required to delineate the mechanisms and to take preventive measures against this problem which will possibly limit the use of NSAIDs.

Keywords: NSAIDs; dipyron; analgesia; tolerance; nitric oxide

KAYNAKLAR

1. Tsagareli MG. Study of non-opioid induced tolerance in rats. 5th Congress of the European Federation of IASP Chapters Abstract Book p.86, Istanbul, Turkey, 2006.
2. Rodriguez-Vazquez E, Ramirez K, Avila C, Escobar W, Vanegas H, Tortorici V. Repeated morphine administration induced analgesic tolerance to morphine and cross tolerance to systemic dipyron (metamizol). 5th Congress of the European Federation of IASP Chapters Abstract Book p.86, Istanbul, Turkey, 2006.
3. Abdel-Zaher AO, Hamdy MM, Aly SA, Abdel-Hady RH, Abdel-Rahman S. Attenuation of morphine tolerance and dependence by aminoguanidine in mice. *Eur J Pharmacol* 2006;540:60-6.
4. Hernandez-Delgadillo GP, Lopez-Munoz FJ, Salazar LA, Cruz SL. Morphine and dipyron co-administration delays tolerance development and potentiates antinociception. *Eur J Pharmacol* 2003;469:71-9.
5. Heinzen EL, Pollack GM. The development of morphine antinociceptive tolerance in nitric oxide synthase-deficient mice. *Biochem Pharmacol* 2004;67:735-41.
6. Lee DH, Singh JP, Lodge D. Experiments with nitric oxide synthase inhibitors in spinal nerve ligated rats provide no evidence of a role for nitric oxide in neuropathic mechanical allodynia. *Neurosci Lett* 2005;385:179-83.

7. Devulder JE. Could nitric oxide be an important mediator in opioid tolerance and morphine side effects? J Clin Anesth 2002;14:81-2.
8. Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definition of pain terms. 2nd ed. Seattle: IASP Pres; 1994: s.211-8.
9. Dökmeci İ. Opiyoid Analjezikler. Dökmeci İ (Editör). Farmakoloji-İlaçlar ve etkileri. 1. Basım. İstanbul: Alfa; 2007: s.553-78.
10. Kayaalp SO. Opioid analjezikler. Kayaalp SO (Editör). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 10.Baskı. Ankara: Hacettepe-Taş; 2002: s.916-37.
11. Türkoğlu M. Ağrının tanımlanması ve ölçümü. Yegül İ (Editör). Ağrı ve tedavisi. 1. Baskı. İzmir: Yapım Matbaacılık; 1993: p.19-27.
12. Erdine S. Ağrı ve akılcı analjezik kullanımı. 2. Basım. Ankara: TEB ve Sanovel İlaç; 1999: s.1-8.
13. Kayhan Z. Klinik Anestezi. 2. Baskı. İstanbul: Logos Yayıncılık; 1997: s.759-87.
14. Benjamin WJ. Pain mechanisms: Anatomy, physiology and neurochemistry. In: Raj PP (Ed.). Practical management of pain. 3rd ed. Missouri: Mosby Inc, 2000: p.117-45.
15. Kayaalp SO. Non-Steroid antiinflamatuvar ilaçlar. Kayaalp SO (Editör). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 10. Baskı. Ankara: Hacettepe-Taş; 2002: p.960-94.
16. Işık G. Ağrı Fizyolojisi. <http://.lokman.cu.edu.tr/anestezi/anestezinot/agri.htm>
17. Aydın ON. Ağrı ve ağrı mekanizmalarına güncel bakış. ADÜ Tıp Fak Derg 2002;2:37-48.
18. Durmaz B. Ağrı mekanizmaları. Turk Fiz Tip Rehab Derg 1998;44:14-20.
19. Ertekin C. Ağrının nöroanatomi ve nörofizyolojisi. Yegül İ (Editör). Ağrı ve tedavisi. 1. Baskı. İzmir: Yapım Matbaacılık; 1993: s.1-18.
20. Arçay A. Ağrı fizyolojisi, ağrı mekanizmaları ve ağrılı hastanın değerlendirilmesi. İlaç ve Tedavi Derg 1993;6:99-104.
21. Dost T, Dökmeci D, Akpolat M, Karadağ ÇH, Ulugöl A. Farelerde morfinin oluşturduğu analjezik etkide santral histaminergic sistemin rolü. Trakya Univ Tıp Fak Derg 2000;17:141-7.

22. Ulugol A, Dokmeci D, Guray G, Sapolyo N, Ozyigit F, Tamer M. Antihyperalgesic, but not antiallodynic, effect of melatonin in nevre-injured neuropathic mice: Possible involvements of the L-arginine-NO pathway and opioid system. *Life Sci* 2005;78:1592-7.
23. Morgan GE, Mikhail MG. Pain Management. In: *Clinical Anesthesiology*, 2nd ed. New Jersey: Prentice-Hall International Inc; 1996: p.274-316.
24. Raj PP. Ağrı taksonomisi. Erdine S (Editör). Ağrı. 1. Baskı. İstanbul: Alemdar Ofset; 2000: s.12-20.
25. Heavner JE, Willis WD. Pain pathways: Anatomy and physiology. In: Raj PP (Ed.). *Practical management of pain*. 3rd ed. St Louis: Mosby Inc; 2000: p.107-45.
26. Sorkin LS. Basic pharmacology and physiology of acute pain processing. In: Wallace MS, Dunn JS, Yaksh TL (Eds.). *Anesthesiology Clinics of North America*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997: p.235-50.
27. Yaksh TL. Central pharmacology of nociceptive transmission. In: Wall PD, Melzack R (Eds.). *Textbook of pain*. 4th ed. Hong Kong: Churchill Livingstone; 1999: p.253-308.
28. Eddy NB, Leimback D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutenylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 1953;107:385-93.
29. Lancaster JR, JR in *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology* Ignarro, LJ, ed. Academic Press, San Diego, CA 2000: p. 209-224
30. Büyükaşar K. Nitrik oksitin fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardaki rolü. Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Eğitim Sempozyumları. Nitrik oksidin farmakolojisi. Mersin, 2005. http://www.tfd.org.tr/mersin_kitap.pdf
31. Bar-Oz B, Clementi M, Di Giantonio E, Greenberg R, Beer M, Merlob P, et al. Metamizol (dipyrone, optalgin) in pregnancy, is it safe? A prospective comperative study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;119:176-9.
32. Moore PK, Babbedge RC, Wallace P, Gaffen ZA, Hart SL. 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br J Pharmacol* 1993;108:296-7.
33. Babacan A. Kanser ağrısında medikal tedavi. <http://www.algoloji.org.tr/content.asp?UnitID=2&menuID=1&parentID=7>

34. Babey AM, Kolesnikov Y, Cheng J, Inturrisi CE, Trifilletti RR, Pasternak GW. Nitric oxide and opioid tolerance. *Neuropharmacology* 1994;33:1463-70.
35. Elliott K, Minami N, Kolesnikov YA, Pasternak GW, Inturrisi CE. The NMDA receptor antagonists, LY 274614 and MK-801, and the nitric oxide synthase inhibitor, N^G-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the mu-opioid morphine but not to kappa opioids. *Pain* 1994;56:69-75.
36. Granados-Soto V, Rufino MO, Lopes LDG, Ferreira SH. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 1997;340:177-80.
37. Zhuo M, Meller S, Gebhart G. Endogenous nitric oxide is required for tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission. *Pain* 1993;54:71-8.
38. Przewlocki R, Przewlocka B. Opioids in neuropathic pain. *Curr Pharm Des* 2005;11:3013-25.
39. Ulugol A, Aslantas A, Karadag CH, 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 Commun* 2002;30:143-53.
40. Yoon YW, Sung B, Chung JM. Nitric oxide mediates behavioral signs of neuropathic pain in an experimental rat model. *NeuroReport* 1998;9:367-72.
41. Kolesnikov YA, Pick CG, Ciszewska G, Pasternak GW. Blockade of tolerance to morphine but not to kappa opioids by a nitric oxide synthase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5162-6.
42. Marek P, Ben-Eliyahu S, Vaccarino AL, Liebeskind JC. Delayed application of MK-801 attenuates development of morphine tolerance in rats. *Brain Res* 1991;558:163-5.
43. Bhargava HN, Bian JT, Kumar S. Mechanism of attenuation of morphine antinociception by chronic treatment with L-arginine. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281:707-12.
44. Bhargava HN, Cao YJ, Zhao GM. Effect of 7-nitroindazole on tolerance to morphine, U-50,488H and [D-Pen², D-Pen⁵] enkephalin in mice. *Peptides* 1997;18:797-800.
45. Ozek M, Uresin Y, Gungor M. Comparison of the effects of specific and nonspecific inhibition of nitric oxide synthase on morphine analgesia, tolerance and dependence in mice. *Life Sci* 2003;72:1943-51.

46. Homayoun H, Khavandgar S, Ejtemaei Mehr S, Namiranian K, Dehpour AR. The effects of FK506 on the development and expression of morphine tolerance and dependence in mice. *Behav Pharmacol* 2003;14:121-7.
47. Pasternak GW, Kolesnikov YA, Babey AM. Perspectives on the N-methyl-D-aspartate/nitric oxide cascade and opioid tolerance. *Neuropsychopharmacol* 1995;13:309-13.
48. Bhargava HN. Diversity of agents that modify opioid tolerance, physical dependence, abstinence syndrome and self administrative behavior. *Pharmacol Rev* 1994;46:293-324.
49. Raghavendra V, Kulkarni SK. Possible mechanism of action in melatonin reversal of morphine tolerance and dependence in mice. *Eur J Pharmacol* 2000;409:279-89.
50. Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshraghi J, Cooper R, Reis DJ. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science* 1994;263:966-9.
51. Auguet M, Viossat I, Marin JG, Chabrier PE. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by agmatine. *Jpn J Pharmacol* 1995;69:285-7.
52. Yang XC, Reis DL. Agmatine selectively blocks the N-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:544-9.
53. Kolesnikov Y, Jain S, Pasternak GW. Modulation of opioid analgesia by agmatine. *Eur J Pharmacol* 1996;296:17-22.
54. Fairbanks CA, Wilcox GL. Acute tolerance to spinally administered morphine compares mechanistically with chronically induced morphine tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:1408-17.
55. Kito KF, Fairbanks CA. Supraspinally administered agmatine prevents the development of supraspinal morphine analgesic tolerance. *Eur J Pharmacol* 2006;536:133-7.
56. DeLeo JA, Tanga FY, Tawfik VL. Neuroimmune activation and neuroinflammation in chronic pain and opioid tolerance/hyperalgesia. *Neuroscientist* 2004;10:40-52.
57. Song P, Zhao Z-Q. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *Neurosci Lett* 2001;39:281-6.

58. Ledebøer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 2005;115:71-83.
59. Özyiğit F. Nöropatik farelerde oluşan mekanik allodini ve termal hiperaljezi üzerine minosiklinin tek başına ve morfin ile birlikte kullanıldığındaki etkisi (tez). Edirne: TÜ Tıp Fak; 2007.
60. Taylor DA, Flemming WW. Unifying perspectives in the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:11-8.
61. Liu J, Anand KJS. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Rev* 2001;38:1-19.
62. Sunshine A, Olson NZ. Nonnarcotic analgesics. In: Wall PD, Melzack R (Eds.). *Textbook of Pain*. 3rd ed. USA: Churchill Livingstone; 1994: p.923-42.
63. Roberts LJ, Morrow JD. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A (Eds.). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th ed. USA: McGraw-Hill; 2001: p.687-731.
64. Tortorici V, Vanegas H. Opioid tolerance induced by metamizol (dipyrone) microinjections into the periaqueductal grey of rats. *Eur J Neurosci* 2000;12:4074-80.
65. Roberts MS, Owen SG, Friesen WT, Francis H, Flux W. Community surveillance study-perceived response of rheumatoid arthritis patients to NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs). Basis for variability in response. Basel: Birkhauser; 1985: p.41-54.
66. Walker JS, Levy G. Effect of multiple dosing on the analgesic action of diflunisal in rats. *Life Sci* 1990;46:37-42.
67. Walker JS. NSAID: an update on their analgesic effects. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;22:855-60.
68. Pernia –Andrade AJ, Tortorici V, Vanegas H. Induction of opioid tolerance by lysine-acetylsalicylate in rats. *Pain* 2004;111:191-200.
69. Malmberg AB, Yaksh TL. Pharmacology of the spinal action of ketorolac, morphine, ST-91, U50488H, and L-PIA on the formalin test and an isobolographic analysis of the NSAID interaction. *Anesthesiology* 1993;79:270-81.

70. Taylor J, Mellstrom B, Fernaud I, Naranjo JR. Metamizol potentiates morphine effects on visceral pain and evoked c-Fos immunoreactivity in spinal cord. *Eur J Pharmacol* 1998;351:39-47.
71. Picard P, Bazin JE, Conio N, Ruiz F, Schoeffler P. Ketorolac potentiates morphine in postoperative patient-controlled analgesia. *Pain* 1997;73:401-6.
72. Wong CS, Hsu MM, Chou YY, Tung CS. Intrathecal cyclooxygenase inhibitor administration attenuates morphine antinociceptive tolerance. *Br J Anaesth* 2000;85:747-51.
73. Vanegas H, Tortorici V. Opioidergic effects of nonopioid analgesics on the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:655-61.
74. Powell KJ, Hosokawa A, Bell A, Sutak M, Milne B, Quirion R, Jhamandas K. Comparative effects of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase inhibition on the development and reversal of spinal opioid tolerance. *Br J Pharmacol* 1999;127:631-44.
75. Trujillo KA, Akil H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* 1991;251:85-7.

RESİMLEMELER LİSTESİ

Sayfa No.

TABLolar

Tablo 1. Periferal duyarlılıkta oluşan nöroaktif maddeler..... 7

ŞEKİLLER

- Şekil 1. Kapı kontrol mekanizması.....8
- Şekil 2. Nosisepsiyon ile ilgili sistemler.....9
- Şekil 3. Ağrı yolları ile ilgili bölgeler.....13
- Şekil 4. Hot plate cihazı.....16
- Şekil 5. Nitrik oksit in NOS enzimi etkisi ile L-arginin aminoasidinden sentezlenmesi.....19
- Şekil 6. Dipironun kimyasal yapısı.....20
- Şekil 7. 7-Nitroindazolün kimyasal yapısı.....21
- Şekil 8. Aminoguanidinin kimyasal yapısı.....21
- Şekil 9. Kontrol grubu (n=6) ve dipironun 3 farklı dozunun (150, 300, 600 mg/kg, i.p., her doz için n=6) hot plate testinde analjezi üzerine 7 günlük etkileri.....26
- Şekil 10. 7-NI'nın (50 mg/kg, i.p., n=6) tek başına ve dipiron (300mg/kg, i.p., n=6) ile birlikte kullanıldığında hot plate testinde analjezi üzerine 7 günlük etkileri.....27
- Şekil 11. Aminoguanidinin (30 mg/kg, i.p., n=6) tek başına ve dipiron (300mg/kg, i.p., n=6) ile birlikte kullanıldığında hot plate testinde analjezi üzerine 7 günlük etkileri.....28

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Ş.Urfa'da doğdum. İlkokulu Ş.Urfa Şehitlik İlkokulu'nda, ortaokulu Ş.Urfa Merkez Ortaokulu'nda okudum ve liseyi Tekirdağ Namık Kemal Lisesi'nde tamamladım. 1994 senesinde kazanmış olduğum Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden 1999 senesinde mezun olup, eczacı unvanına hak kazandıktan sonra, 2 yıl Yılmaz Eczanesi mes'ul müdürü ve sahibi olarak eczane eczacılığı yaptım. 2005 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programına başladım.

T.C. Çalışma Ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı Tekirdağ S.S.K. Hastanesi'nde 2 yıl, T.C. Sağlık Bakanlığı Tekirdağ Devlet Hastanesi'nde 2 yıl çalıştım. Şu an T.C. Sağlık Bakanlığı Tekirdağ Göğüs Hastalıkları Ve Göğüs Cerrahisi Hastanesi'nde 657'ye tabi hastane baş eczacısı olarak çalışmaktayım.