

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

NO/cGMP YOLAĞININ SIÇANLARDA AĞRIYA, MORFİN
ANALJEZİSİNE VE MORFİNE KARŞI GELİŞEN TOLERANSA
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Nedim DURMUŞ

UZMANLIK TEZİ

SİVAS

2009

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**NO/cGMP YOLAĞININ SIÇANLARDA AĞRIYA, MORFİN
ANALJEZİSİNE VE MORFİNE KARŞI GELİŞEN TOLERANSA
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Nedim DURMUŞ
UZMANLIK TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi
Doç. Dr. İhsan BAĞCIVAN

SİVAS
2009

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun 12.03.2002 tarih ve 2002/1 sayılı kararı ve Cumhuriyet Üniversitesi Rektörlüğü'nün 28.03.2002 tarih ve 463 sayılı yazısı ile uygun görülen 'Tez Yazım Kılavuzu'na göre hazırlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tez döneminde değerli öneri ve yapıcı eleştirileri ile beni destekleyen değerli Hocam ve Tez Danışmanım Doç. Dr. İhsan BAĞCIVAN'a,

Her zaman desteklerini esirgemeyen ve iyi bir bilim insanı olma yolunda bize rehber olan Anabilim Dalı Başkanı'mız Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ'e,

Uzmanlık eğitimimde katkıları bulunan Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Prof. Dr. A. Serdar SOYDAN, Prof. Dr. M. Kemal YILDIRIM, Prof. Dr. Şahin YILDIRIM, Yrd. Doç. Dr. Bülent SARAÇ'a,

Deneylerin yapılması aşamasında her zaman yanımda olan Dr. Ahmet ALTUN'a,

Asistanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığımız Dr. Ahmet PARLAK, Dr. Ezgi BALCI ve Dr. Mesut PARLAK'a,

Bölümümüz çalışanları Feray GÜLER ve Bekir YILDIZ'a,

Çalışmanın istatistiklerinin yapılması aşamalarında yardımcı olan Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Hafize Sezer'e,

Tüm hayatım boyunca fedakarlıkla ve sabırla yanımda olan sevgili babam Ramazan DURMUŞ, annem Rahime DURMUŞ, kardeşlerim ve tüm aileme,

Son olarak uzmanlık eğitimim süresince ve tez aşamasında desteklerinden ve onlardan çaldığım zamanlara karşı gösterdikleri sabırdan dolayı eşim Meral DURMUŞ ve oğlum Zafer DURMUŞ'a,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Nedim DURMUŞ

Sivas, 2009

Bu alışma T-329 proje numarası ile Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (CÜBAP) tarafından desteklenmiştir.

Bu alışma Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No:173).

ÖZET

Ağrı vücudun herhangi bir yerinden kaynaklanan gerçek ya da olası bir doku hasarı ile birlikte bulunan, hastanın geçmişteki deneyimleri ile ilgili, duyuşal, afektif, hoş olmayan emosyonel bir duyum ve davranış şeklidir. Bu çalışmada ağrı mekanizmasında, morfinin analjezik etkisinde ve morfine karşı gelişen toleransta NO (nitrik oksit)/cGMP yolağının rolünü tail flick ve hot plate testlerini kullanarak araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda kullanılan 150 adet sıçan on beş gruba ayrıldı. Deney gruplarına L-NAME (NO sentaz inhibitörü), NOC-18 (NO donörü), BAY 41-2272 (Guanilat siklaz inhibitörü) ve SIN-1 (NO donörü ve guanilat siklaz inhibitörü) intraperitoneal olarak verildi ve bu maddelerin termal hiperaljeziye etkileri ve morfin analjezisine etkileri tail flick ve hot plate testleri kullanılarak ölçüldü. Ayrıca morfine tolerans geliştirilen gruplarda bu ilaçların morfin toleransına etkileri değerlendirildi.

L-NAME, hem tail flick hem de hot plate testlerinde kontrol grubuna göre anlamlı olarak analjezi oluştururken, NOC-18, BAY 41-2272 and SIN-1 kontrol grubuyla karşılaştırılınca hiperaljezik etki gösterdi ($p<0.05$). L-NAME morfinle kombine edildiğinde sadece morfin uygulanan gruba karşılaştırıldığında morfinin oluşturduğu analjeziyi anlamlı olarak artırdı ($p<0.05$). NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1 morfinle birlikte verildiğinde morfinin analjezik etkisini tek başına morfin verilen gruba karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalttı ($p<0.05$). L-NAME morfine karşı gelişen toleransı azalttı ($p<0.05$) ancak tamamen ortadan kaldırmadı. NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1 ise morfine gelişen toleransı daha da artırdı ($p<0.05$).

Sonuç olarak nitrik oksitin ağrı mekanizmasında hiperaljezik yönde rol oynadığı söylenebilir. NOS inhibitörlerinin morfinle birlikte uygulanması morfinin analjezik etkisini arttırabilir. Ayrıca NO/cGMP yolağı morfine karşı gelişen toleransta rol oynamaktadır ancak NOS inhibitörlerinin verilmesinden sonra tamamen toleransın ortadan kalkmaması morfine tolerans gelişiminde başka mekanizmaların da rolünün olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ağrı, morfin, nitrik oksit, morfin toleransı, sıçan

SUMMARY

Pain is an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage. In this study we aimed to investigate the role of NO (Nitric oxide)/cGMP pathway in the pain mechanism, the analgesic effect of morphine and the tolerance to morphine by tail flick and hot plate tests.

One hundred and fifty rats were allocated into fifteen groups. L-NAME (NO synthase inhibitor), NOC-18 (NO donor), BAY 41-2272 (Guanylate cyclase inhibitor) and SIN-1 (NO donor and guanylate cyclase inhibitor) were intraperitoneally given to the experimental groups and the effects of these agents to the thermal hyperalgesia and morphine analgesia assessed by tail flick and hot plate tests. Additionally the effects of these agents on the morphine tolerance development were evaluated.

L-NAME made an analgesic effect where NOC-18, BAY 41-2272 and SIN-1 showed a hyperalgesic effect compared with the control group both in tail flick and hot plate tests ($p < 0.05$). When L-NAME combined with morphine it enhanced the analgesic effect of morphine compared with the only morphine applied group ($p < 0.05$). But when NOC-18, BAY 41-2272 and SIN-1 combined with morphine, they all decreased the analgesic effect of it compared with the only morphine applied group ($p < 0.05$). L-NAME decreased the morphine tolerance development ($p < 0.05$) but cannot inhibit completely. NOC-18, BAY 41-2272 and SIN-1 increased the morphine tolerance development ($p < 0.05$).

In conclusion, NO plays a hyperalgesic role in pain mechanism. The application of NOS inhibitors with morphine may enhance the analgesic effect of morphine. NO/cGMP pathway seems to play a role in the morphine tolerance development but the partial inhibition of this tolerance by NOS inhibitors suggests the presence of possible other mechanisms in this tolerance development.

Keywords: Pain, morphine, nitric oxide, morphine tolerance, rat

İÇİNDEKİLER

• TEŞEKKÜR.....	i
• ÖZET.....	iii
• İNGİLİZCE ÖZET.....	iv
• İÇİNDEKİLER.....	v
• SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vii
• TABLOLAR.....	ix
• ŞEKİLLER.....	x
• RESİMLER.....	xi
• GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
• GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Ağrı.....	2
2.1.1. Ağrının tanımı.....	2
2.1.2. Ağrının Nörofizyolojisi.....	2
2.1.4. Ağrı Teorileri.....	15
2.2. Opioid Analjezikler.....	18
2.2.1 Opioid reseptörleri	19
2.2.2. Morfin.....	23
2.2.2.1. Morfinin merkezi sinir sistemine etkileri.....	24
2.2.2.2. Morfinin klinik kullanılışı.....	24
2.2.2.3. Tolerans ve morfin toleransı	25
2.3. Ağrı Ölçümünde Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri.....	29
2.3.1. Akut ağrı ölçüm modelleri	30
2.3.2. Kronik ağrı ölçüm modelleri	32
2.4. Nitrik Oksit.....	32
2.4.1. Tarihsel gelişimi	33
2.4.2. Biyosentezi.....	33
2.4.3. Nitrik oksit sentaz enziminin izoformları	35
2.4.4. Nitrik Oksit etki mekanizması.....	37
2.5. Nitrik Oksit ve Ağrı.....	37

2.6. Nitrik Oksit ve Morfin.....	40
• ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	42
3.1. Deney Hayvanlarının Seçilmesi.....	42
3.2. Deney Düzeni.....	43
3.3. Kimyasal Maddeler ve Uygulanışı.....	44
3.4. Akut Analjezi Değerlendirmesi.....	45
3.4.1. Tail flick testi.....	45
3.4.2. Hot-plate testi.....	46
3.5. Morfine Tolerans Geliştirilmesi ve Tolerans Gelişimine Maddelerin Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	47
3.6. Deney Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirmesi.....	47
• BULGULAR.....	48
4.1. Kontrol ve Morfin Grubunun Karşılaştırılması.....	48
4.2. L-NAME'in Tek Başına ve Morfinle Kombinasyonunun Etkileri.....	48
4.3. NOC-18'in Tek Başına ve Morfinle Kombinasyonunun Etkileri.....	50
4.4. BAY 41-2272'nin Tek Başına ve Morfinle Kombinasyonunun Etkileri.....	52
4.5. SIN-1'in Tek Başına ve Morfinle Kombinasyonunun Etkileri.....	54
4.6. L-NAME, NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1'in Etkilerinin Kontrol Grubu ve Birbirleriyle Karşılaştırılması.....	56
4.7. L-NAME, NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1'in Morfinle Kombinasyonlarının Etkilerinin Yalnız Morfin Grubu ve Birbirleriyle Karşılaştırılması.....	58
4.8. Morfine Karşı Tolerans Geliştirilen Grupta Morfinin Etkisi.....	60
4.9. Morfine Karşı Tolerans Gelişimine L-NAME, NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1'in Etkileri.....	62
• TARTIŞMA VE SONUÇ.....	64
• KAYNAKLAR.....	73

SİMGELER ve KISALTMALAR

- IASP:** Uluslar Arası Ağrı Araştırmaları Teşkilatı
CGRP: Kalsitonin geniyle ilişkili peptid
MS: Medulla spinalis
SSS: Santral sinir sistemi
NMDA: N-metil-D-aspartik asid
STT: Spinotalamik yolak
GABA: Gamma amino bütirik asit
GDA: Geniş dinamik aralıklı
SG: Substantia gelatinosa
M3G: Morfin-3-glukuronid
M6G: Morfin-6-glukuronid
GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormon
ADH: Antidiüretik hormon
KİBAS: Kafa içi basıncı
cAMP: Siklik adenozin monofosfat
Ach: Asetilkolin
NO: Nitrik oksit
NOS: Nitrik oksit sentaz
cNOS: Yapısal nitrik oksit sentaz
eNOS: Endoteliyal nitrik oksit sentaz
nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz
iNOS: İnflamatuvar (indüklenebilir) nitrik oksit sentaz
cGMP: Siklik guanozin monofosfat
L-NAME: *N*_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
NADP: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
FMN: Flavin mononükleotid
FAD: Flavin adenin dinükleotid
BH4: Tetrahidrobiyopterin
CAM: Kalmodulin
NANK: Non adrenerjik non kolinerjik
7-NI: 7-Nitroindazol

DMSO: Dimetil sülfoksid

NOC-18: 3,3-bis(Aminoethyl)-1-hydroxy-2-oxo-1-triazene

BAY 41-2272: 3-(4-Amino-5-cyclopropylpyrimidin-2-yl)-1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolol
[3,4-b]pyridine

SIN-1: 5-Amino-3-morpholinyl-1,2,3-oxadiazolium chloride

BLF: Bovin laktoferrin

TF: Tail Flick

HP: Hot Plate

TABLÖLAR

Sayfa

Tablo 2.1. Periferal duyarlılıkta oluşın doğal algojenik maddeler.....	9
Tablo 2.2. Medulla spinalisin laminaları ve öncelikli fonksiyonları.....	11
Tablo 2.3. Opioid reseptörleri ve klinik etkileri.....	20
Tablo 2.4. Opioidlerin bazı etkilerine tolerans gelişme dereceleri.....	27
Tablo 2.5. Ağrı deneylerinin karakteristikleri.....	29
Tablo 26. Nitrik oksit sentezleyen enzimler ve temel özellikleri.....	36
Tablo 3.1. Çalışmada oluşturulan gruplar.....	43
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve özellikleri.....	44

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1: Nosisepsiyon aşamaları.....	3
Şekil 2.2: Rexed'in tanımladığı laminer yapılar.....	5
Şekil 2.3: Ağrı ve nosisepsiyon ile ilgili sistemler.....	7
Şekil 2.4: Ağrı yolları.....	8
Şekil 2.5: Ağrı teorilerinde uyarı ve primer afferent sinyal arasındaki ilişkilerin şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.6: Opioidler ve diğer bazı analjezik ajanların spinal etki yerleri.....	18
Şekil 2.7: Opioid analjeziklerin putativ etki yerleri.....	21
Şekil 2.8: Opioid reseptör (MOR) analjezisi tarafından inen yolların modüle edici etkisi altında yatan beyin kökü lokal döngüsü.....	22
Şekil 2.9: Morfinin kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2.10: NO biyosentezi.....	34
Şekil 2.11: Nitrik oksit etki mekanizması.....	37
Şekil 4.1: L-NAME'in (25 mg/kg) tek başına ve morfinle (5 mg/kg) birlikte verildiğinde tail flick ve hot plate testlerinde gösterdiği etki.....	49
Şekil 4.2: NOC-18'in (0,4 mg/kg) tek başına ve morfinle (5 mg/kg) birlikte verildiğinde tail flick ve hot plate testlerinde gösterdiği etki.....	51
Şekil 4.3: Bay 41-2272'nin (4 mg/kg) tek başına ve morfinle (5 mg/kg) birlikte verildiğinde tail flick ve hot plate testlerinde gösterdiği etki.....	53
Şekil 4.4: SIN-1'in (0,4 mg/kg) tek başına ve morfinle (5 mg/kg) birlikte verildiğinde tail flick ve hot plate testlerinde gösterdiği etki.....	55
Şekil 4.5: L-NAME, NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1'in etkilerinin kontrol grubu ve birbirleriyle karşılaştırılması.....	57
Şekil 4.6: L-NAME, NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1'in morfinle kombinasyonlarının etkilerinin yalnız morfin grubu ve birbirleriyle karşılaştırılması.....	59
Şekil 4.7: Morfine karşı tolerans geliştirilen gruptaki morfinin (5 mg/kg) etkisinin kontrol ve tolerans gelişmemiş grupta yalnız morfin uygulanan grupla karşılaştırılması.....	61
Şekil 4.8: Morfine karşı tolerans gelişimine L-NAME, NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1'in etkilerinin tail flick ve hot plate testleriyle karşılaştırılması.....	63

RESİMLER

Sayfa

Resim 3.1. Tail flick testinin uygulanışı.....	45
Resim 3.2. Hot plate testinin uygulanışı.....	46

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Uluslar Arası Ağrı Araştırmaları Teşkilatı (International Association for the Study of Pain (I.A.S.P.) tarafından yapılan en geçerli tanımlamaya göre ağrı; vücudun herhangi bir yerinden kaynaklanan gerçek ya da olası bir doku hasarı ile birlikte bulunan, hastanın geçmişteki deneyimleri ile ilgili, duyuşsal, afektif, hoş olmayan emosyonel bir duyum ve davranış şeklidir.

Morfin ağrı tedavisinde en sık kullanılan doğal bir opioid olup opioidlerin karşılaştırılmasında prototip olarak kullanılır. Morfin genel anesteziyelere göre analjezik etki oluşturmada üstündür çünkü hem spinal hem de supraspinal düzeyde analjezi oluşturur. Opioidlerin çok çeşitli etkileri bulunmasına karşın primer kullanım alanı, cerrahi uygulama veya kanser gibi bir hastalık sonucu gelişen, anksiyetenin de eşlik ettiği ağrının tedavisidir. Morfinin analjezik etkisine çeşitli maddelerin etkilerinin araştırılması oldukça popüler bir konudur ve bir opioid prototipi olan morfin birçok madde ile kombine edilerek aralarındaki etkileşim araştırılmıştır. Opioid bir ilaç olan morfinin tekrarlayan sık kullanımları sonunda etkilerinde azalma görülür ve buna tolerans denir. Aynı etkiyi elde etmek için daha yüksek dozlar kullanılmalıdır.

Nitrik oksit L- Arjinin, oksijen ve kofaktörler varlığında nitrik oksit sentaz enzimiyle sitrülline dönüştürülürken açığa çıkan, biyolojik membranlardan çok kolay difüze olan, lipofilik özellikte olan, oksijensiz ortamda oldukça stabil olup suda eriyen ve birçok önemli fizyolojik işlevin gerçekleşmesinde rol alan bir gazdır. Nitrik oksitin ağrı mekanizmasındaki rolü araştırılırken ağrının algılanması sırasında nöronal yolların birçok seviyesinde rol oynadığı ve ağrının duyusunun düzenlenmesinde önemli bir işlevi olduğu pek çok çalışmada kabul edilmekle birlikte, bunun hangi mekanizmalar aracılığıyla olduğu tam olarak açığa kavuşmamıştır.

Bu çalışmada ağrı mekanizmasında, morfinin analjezik etkisinde ve morfine karşı gelişen toleransta nitrik oksitin rolünü tail flick ve hot plate testlerini kullanarak araştırmayı amaçladık.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1. Ağrı

2.1.1. Ağrının tanımı

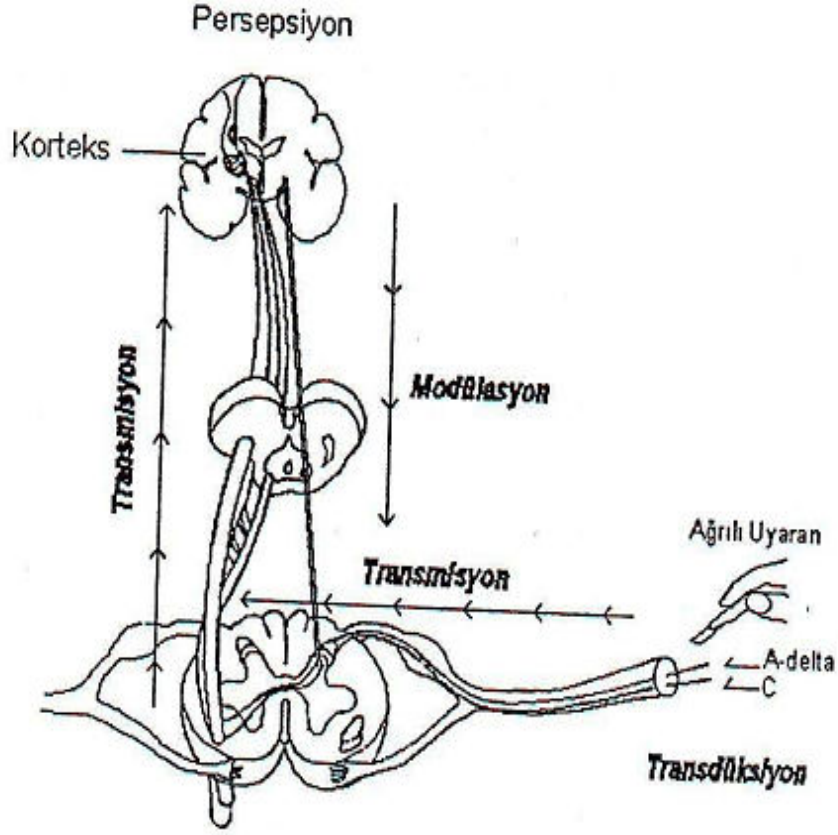
Ağrı , Latince ceza, işkence, intikam anlamında “Poena” sözcüğünden gelir ve tanımı oldukça güçtür. Uluslar Arası Ağrı Araştırmaları Teşkilatı (International Association for the Study of Pain (I.A.S.P.) tarafından yapılan en geçerli tanımlamaya göre ağrı; vücudun herhangi bir yerinden kaynaklanan gerçek ya da olası bir doku hasarı ile birlikte bulunan, hastanın geçmişteki deneyimleri ile ilgili, duyuşsal, afektif, hoş olmayan emosyonel bir duyum ve davranış şeklidir. Ağrı kişiye öznedir bu nedenle kişiden kişiye büyük farklılıklar gösterir. Bu farklılığın sebebi, kişilerin yaşam boyu karşılaştıkları ağrılı durumlardan edindikleri deneyimlerdir. Doku harabiyeti veya patolojik değışiklikler olmadan da ağrı hissinden bahsedilebilir ve bu durum ağrının hissel yönünün önemini göstermektedir (1, 2).

Vücudun bir bölgesinde bir doku yıkımı olduğu zaman, bunun özelleşmiş sinir uçları ile alınıp (nosiseptör), santral sinir sistemine götürülmesi, belirli bölge ve nöral yapılarda değerlendirilerek bu zararlı tehdit durumunun algılanması ve buna karşı gereken fizyolojik, biyolojik ve psikolojik önlemlerin harekete geçirilmesine nosisepsiyon denir. Ağrı, nosisepsiyon içinde bir algılama olayıdır. İşte nosisepsiyon doku hasarı ile ağrının algılanması arasında oluşan karmaşık elektrokimyasal olaylar serisinin bütünüdür (1).

2.1.2. Ağrının nörofizyolojisi

Doku hasarının başlaması ve ağrının algılanmasıyla son bulan karmaşık fizyolojik olayların tümüne nosisepsiyon adı verilir. Nosisepsiyon dört bölümden oluşur (3):

- 1) Transdüksiyon,
- 2) Transmisyon,
- 3) Modülasyon,
- 4) Persepsiyon (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Nosisepsiyon aşamaları (6)

Transdüksiyon ve transmisyon periferde, modülasyon spinal kordda, persepsiyon ise daha üst merkezlerde gerçekleşir. Ağrılı uyarana duyarlılık gösteren primer afferent sinirlerin periferik terminali olarak nosiseptörlerin transmisyon ve transdüksiyon olarak iki temel fonksiyonu vardır (4).

Transdüksiyon: Uyarının, duyuşal sinir uçlarında elektriksel aktiviteye dönüştürülmesidir. Örneğin mekanik, kimyasal ve termal bir uyarın kendileri ile ilgili reseptörleri uyardığı gibi nosiseptörleri de etkiler. Bu uyarınların elektrik enerjisine dönüştürülmesine transdüksiyon adı verilir (4, 5). Ağrı nosiseptör adı verilen, periferik terminalleri ağrılı uyarana duyarlı afferent sinir uçları tarafından algılanır (6). Bu sinir uçları ince miyelinsiz C lifleri ve miyelinli A delta liflerinin distal uzantılarıdır. A delta liflerinin uçları olan nosiseptörler termal ve mekanik nosiseptörler; C liflerinin uçları olan nosiseptörler ise mekanik, termal, kimyasal,

sıcak ve soğuk gibi birçok uyarana ile aktive olduklarından polimodal nosiseptörler adını alırlar (7). Transdüksiyon nosiseptörlerin bir uyarana ortamdaki fiziksel ve kimyasal değişikliklerin etkisi ile daha duyarlı hale gelmesini ifade eder.

Normal bir ısıya karşı duyarsız olan nosiseptörler, ısının artışı ile daha duyarlı hale gelir. Nosiseptör aktivasyonu sürecinde çeşitli etkenler devreye girer. Örneğin, bir cilt hasarını takiben tahrip olan bölgelerde makrofaj, lenfosit ve mast hücrelerinden çeşitli intraselüler maddeler salınır. Bunların bazıları potasyum, serotonin, bradikinin, histamin, prostaglandinler ve lökotrienlerdir. Salınan bu maddeler ve nosiseptör uçlarından salınan P maddesi, nörokinin A, Kalsitonin geniyle ilişkili peptid (CGRP) gibi nöropeptitlerin etkisiyle nosiseptörlerin uyarılma eşikleri düşer. Periferik sensitizasyon denilen bu olay sonunda düşük şiddetteki mekanik uyarılar normalde ağrı oluşturmazken ağrılı olarak algılanmaya başlarlar (6).

Transmisyon: Merkezi sinir sistemine (MSS) bilginin iletilmesidir. Transmisyonda nöral yollar 3 bileşenden oluşur:

- Spinal korda ulaşan primer duyuşal afferent nöronları,
- Spinal korddan beyin sapı ve talamusa uzanan “çıkan kontrol sistemi” nöronları,
- Talamokortikal projeksiyon (5).

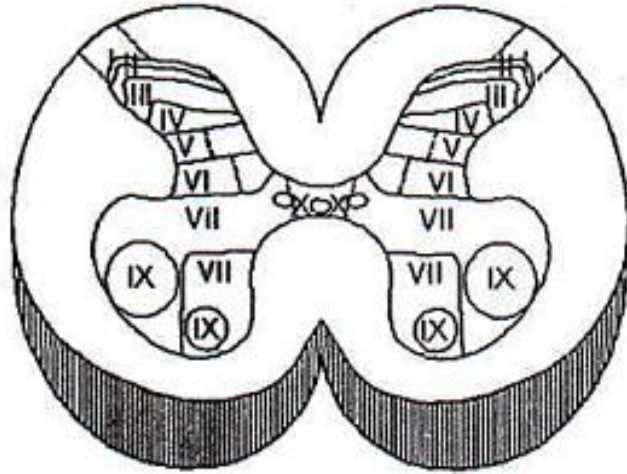
Nosiseptörlerin uyarılmasıyla başlayan ağrı üst merkezlere A delta ve C lifleriyle taşınır (6). A delta lifleri, miyelinli lifler olup impulsları hızlı iletirler. C tipi lifler ise çok ince, miyelinsiz liflerdir ve impulsları çok düşük hızda iletirler. Ağrıyı ileten bu lifler, arka kök gangliyonunda sinaps yaptıktan sonra arka kökler ile medulla spinalise (MS) girerler. MS’de arka boynuzun hemen gerisinde yer alan Lissauer traktusunda, birkaç segment yukarı veya aşağı inerler. Diğer sinir lifleri de çeşitli biçimlerde ağrı iletimine katılır. Temel olarak dokunma duyusuna duyarlı A beta lifleri de zaman zaman ağrı iletiminde rol alırlar (8).

Modülasyon: İnen nöral yollar aracılığıyla transmisyon iletiminin azaltılmasıdır (5). Başlıca medulla spinalis seviyesinde gerçekleşmektedir. Ağrılı uyarana spinal kord düzeyinde bir değişime uğramakta ve bu değişim sonunda uyarı daha üst merkezlere iletilmektedir (9). MS dorsal boynuzunda ağrı iletimi ve modülasyonunda yer alan çeşitli nöronlar ve laminalar vardır. Afferent lifler dorsal kökte birinci sıra

nöronlar ile sinaps yaparlar. Birinci sıra nöronların aksonları dorsal boynuzda girdikten sonra dorsal boynuzdaki sekonder nöronlar (ikinci sıra nöronlar) ile sinaps yapar (10). Dorsal boynuzda bulunan nöronlar başlıca üç grupta incelenebilir:

- a) Projeksiyon nöronları,
- b) İnhibitör ara nöronlar,
- c) Lokal eksitatör ara nöronlar (7).

Hücre tipleri, afferent-efferent bağlantıları ve biyokimyasal özelliklerine göre dorsal boynuz, on adet laminaya ayrılır. Rexed laminaları da denen bu laminalarda spesifik reseptör-sinir lifi üniteleri tanımlanmıştır (10, 11) (Şekil 2.2). Lamina I, II, III ve V ağrının algılanmasında daha belirgin rol almaktadır (9, 11). Geçmişte MS'nin ağrının MSS'ne iletilmesinde yalnızca bir ara durak olarak görev yaptığına inanılmaktaydı. Ancak 1965 yılında Melzack ve Wall tarafından ileri sürülen Kapı Kontrol Teorisi ile ağrılı uyarının MS'de önemli bir engelle karşılaştığı ve modülasyona uğradığı anlaşılmıştır (6).



Şekil 2.2. Rexed'in tanımladığı laminer yapılar (5)

Transmisyon, transdüksiyon ve persepsiyon birlikte sübjektif, emosyonel ve kişisel psikolojik özellikler ile etkileşerek ağrının algılanmasının sağlandığı son aşamadır (5).

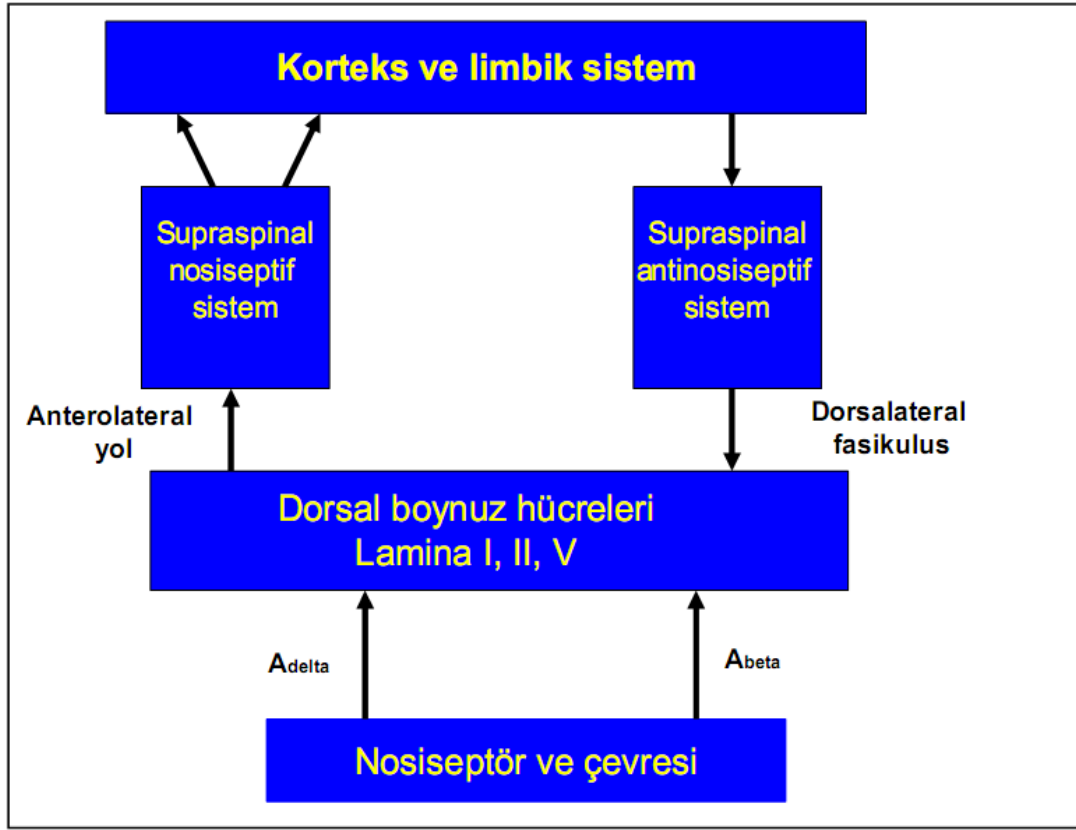
Persepsiyon: Kişisel sübjektif duyusal emosyonel deneyimleri ile ağırlı uyarıyı algılamasıdır (12). Ağırlı impulsler sinir sisteminin üst merkezlerine nosiseptif çıkıcı sistemler ile iletilir. Bunların başlıcaları spinotalamik yol, spinoretiküler yol ve spinomezensefalik yoldur (6). Spinomezensefalik yol antinosiseptif mekanizmalar içinde yer alır (7). MS'de yer alan dorsal funikulus, spinohipotamik, spinotelensefalik ve spinoservikal traktuslar da ağırlı impulsarı iletme özelliğine sahiptir. Ancak birinci derecede önem taşımazlar (7, 10).

Ekspresyon: Bilginin kortekste değerlendirilmesi, hasar bölgesine iletilmesi ve kişi tarafından ifade edilmesi olayıdır. Bunun sonucunda ağrı davranışı sergilenmektedir (13).

Serebral korteks ve ağrı arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır. Beyinde birinci ve ikinci duyusal alanlar, frontal lob, özellikle 9. ve 12. alanlar ve posteriyor pariyetal bölgeler ile bu bölgeler arasındaki assosiyasyon lifleri ağrıyla ilişkilidir. Özellikle birinci duyusal alan (postsentral girus) ağrının hızlı algılandığı merkezdir. Bu bölgenin lezyonlarında diğer duyusal bozukluklar ile birlikte hipoaljezi durumu ortaya çıkar (7).

Ağrı nöroanatomi ve fizyolojisi dört grupta incelenebilir:

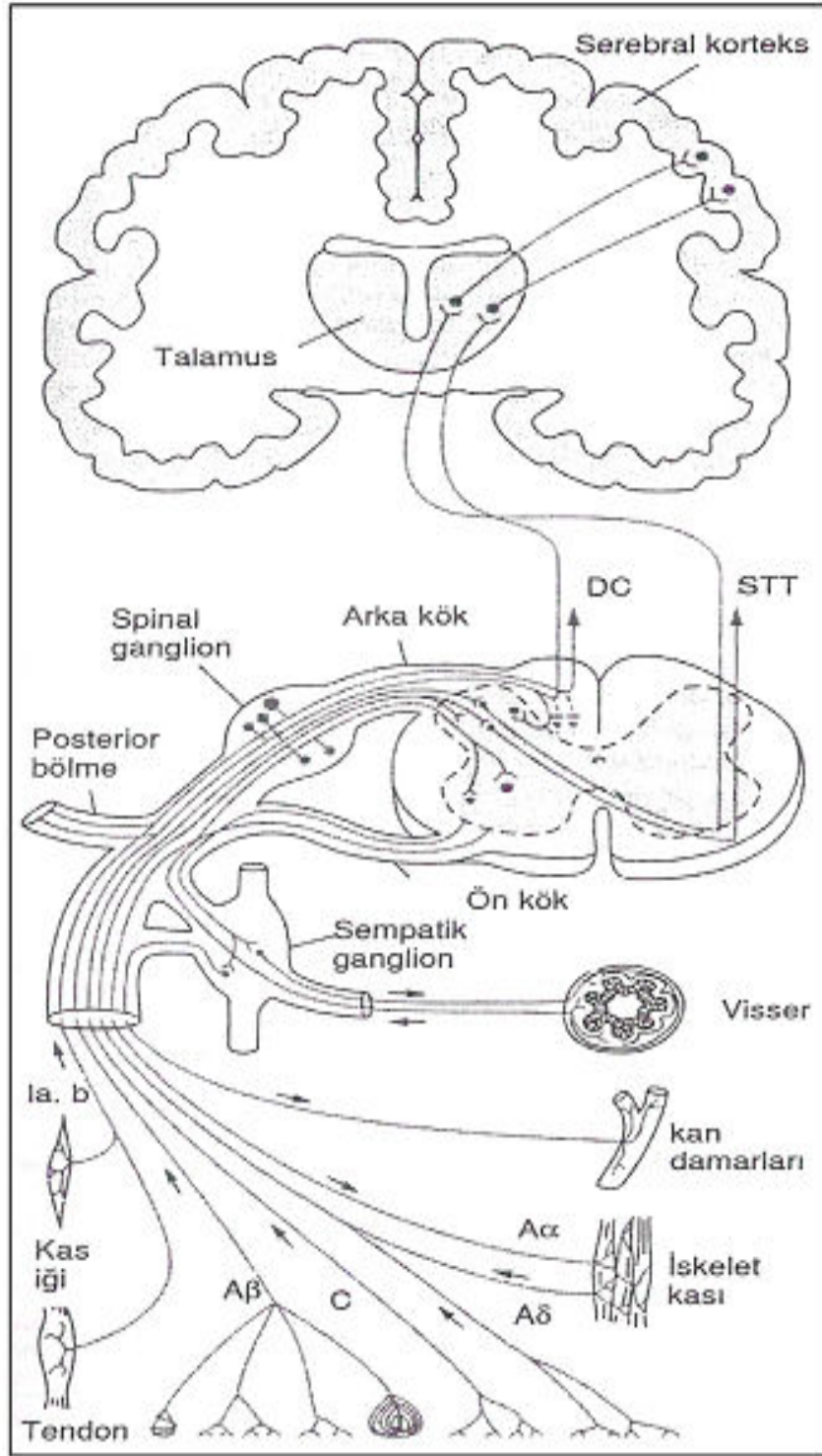
- A. Nosiseptör ve çevresi
- B. Dorsal boynuz nöronal sistemi
- C. Afferent sistemler
- D. Antinosiseptif inisi sistemler (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Ağrı ve nosisepsiyon ile ilgili sistemler (14)

A. Nosiseptörler ve primer afferent nöronlar

Deri ve deri altında serbest sinir sonlanmaları olan nosiseptörler ağrının periferel algılanmasında, mekanizmanın tetik noktalarıdır. Nosiseptörler, deri ve deri altı bölgesinden başka diş pulpası, kalp kası, iskelet kasları, kemik ve eklemlerde bulunur. Ayrıca visseral nosiseptörler adı verilen nosiseptörler, testisler, üreter ve biliyer sistem gibi bazı iç organlarda bulunurlar (15) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Ağrı yolakları

Nosiseptörlerin işlevleri şunlardır:

a. Transdüksiyon: Kimyasal, mekanik veya termal bir uyarının ağırlı uyarın biçimine dönüştürülmesi.

b. Transmisyon: Ağırlı uyarının üst merkeze iletilmesi.

Buldukları dokularda oluşan zararlı uyarıların, bu serbest sinir uçlarında da polarizasyonu başlatmaları ile nosiseptörler aktive olur. Çok değişik uyarılar ve doğal uyarıların yüksek şiddete ulaşmaları ağrıya neden olmaktadır (16). Bu stimulusların ortak özellikleri dokuya zararlı olmalarıdır. Bu uyarılar fiziksel hasara neden olan mekanik ve termal uyarılar, laktik asit birikimine neden olan iskemi, toksin, infeksiyon ve çeşitli kimyasal maddelerin neden olduğu inflamasyon olabilir.

Yapılan çalışmalarda hem ağırlı uyarıyı algılayan reseptörlerin hem de ya ağrı uyandırarak veya ağrı hissinin iletimini etkileyerek mediatör işlevi gören birçok endojen maddenin varlığı saptanmıştır (17) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Periferel duyarlılıkta oluşan doğal aljojenik maddeler

Madde	Kaynak	Sinir sonundaki etkileri
Substans P	Sinir terminalleri	Sensitizasyon
Bradikinin	Plazma kininojen	Aktivasyon
Histamin	Trombositler, Mast hücresi	Aktivasyon
Protonlar	İskemi	Aktivasyon
(Düşük pH) Prostaglandinler	Zedelenmiş hücreler, Araşidonik asit	Sensitizasyon
Lökotrienler	Zedelenmiş hücreler, Araşidonik asit	Sensitizasyon
İnterlökinler	Zedelenmiş hücreler, Mast hücreleri	Aktivasyon, Sensitizasyon
Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α)	Mast hücreleri	Aktivasyon, Sensitizasyon
Kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP)	Primer aferent lif	Sensitizasyon

Nosiseptörler uyarılabilirlik nedenlerine göre sınıflandırılırlar:

- a. Mekanik nosiseptörler
- b. Mekanotermal nosiseptörler
- c. Polimodal nosiseptörler

Nosiseptörler, buldukları yerdeki düz kaslar, kapillerler, efferent sempatik sinir uçları ile bir bütündürler. Bu bölgeye yapılacak mekanik uyarılarla veya endojen aljezik maddelerin ortaya çıkmasına neden olacak uyarılarla nosisepsiyon olayı başlatılır (18). Mekanik uyarı, nosiseptörü fiziksel etki ile doğrudan uyaracak, uyarının ani ve ilk ağrı algılanmasını sağlamak üzere A delta lifleri ile taşınması gerçekleşecektir.

B. Dorsal Boynuz Nöronal Sistemi

Periferik sinir sistemine göre MSS çok daha karmaşıktır. Primer afferentler daha dar bir alanı kapsarken, MSS nöronları çok geniş bir algılama alanına sahiptir. MSS nöronlarının ağırlı uyarana cevabı farklıdır çünkü beyindeki inhibitör etkiler de işe karışmaktadır. Kural olarak primer afferent nöronlar spinal kordda aynı tarafta ve arka köklerde sonlanırlar. Buna karşın bir kısım afferent lifler karşı tarafa geçebilirler. Afferent liflerin büyük bölümünün arka köklerde sonlanmasına rağmen Bell ve Magendie kanununa göre bir kısmı da ön köklere girmektedir. Dorsal rizostomide sonra ağrının tekrar ortaya çıkmasının primer afferent nöronların bir kısmının ön köklerle spinal korda girmesine bağlı olduğu düşünülmektedir (4).

Miyelinli ve miyelinsiz aksonlar kökün ventrolateral kısmından ayrıldıklarında primer afferentler arka köke ulaşmış olurlar. Miyelinli lifler mediale, miyelinsiz lifler ise inen ve çıkan dallara ayrılarak spinal gri maddenin dorsolateral kısmına giderler ve burada Lissauer traktusunu oluşturduktan sonra Rexed'in I., II., V. ve X. laminalarında sonlanırlar (4).

Lamina I'den VI'ya dorsal boynuz, lamina VII'den IX'a ventral boynuz oluşur ve lamina X ise spinal kordun santral kanalının çevresini saran hücreleri içerir. Ağrı iletiminde dorsal boynuzun lamina I kısmını oluşturan ve marjinal zone adını alan bölüm ile lamina II'yi oluşturan, iç ve dış olarak iki kısma ayrılan substantia gelatinozanın önemli rolü vardır (4) (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Medulla spinalisin laminaları ve öncelikli fonksiyonları (4)

Lamina	Önde gelen fonksiyonu	Giriş	İsim
I	Somatik nosisepsiyon, termoresepsiyon	A δ , C	Marjinal tabaka
II	Somatik nosisepsiyon, termoresepsiyon	C, A δ	Substantia jelatinoza
III	Somatik mekanoresepsiyon	A β , A δ	Nucleus proprius
IV	Mekanoresepsiyon	A β , A δ	
V	Visseral ve somatik nosisepsiyon, mekanoresepsiyon	A β , A δ , C	Nucleus proprius, WDR nöronları
VI	Mekanoresepsiyon	A β	Nucleus proprius
VII	Sempatik		Columna intermediaris
VIII		A β	Motor boynuz
IX	Motor	A β	Motor boynuz
X		A δ	Santral Kanal

Nosiseptif nöronlar arka boynuzda projeksiyon nöronları denilen 2. sıra nöronları ile sinaps yaparlar. Dorsal boynuzda 3 tip nöron bulunur (19):

a. Projeksiyon nöronları: Bu hücreler uyarıldıkları zaman meydana gelen impulslar anterolateral afferent sisteme geçer ve ağrı üst merkezler tarafından algılanır. Bu nöronların aktivitesi bazı daha küçük ara nöronlar tarafından kontrol edilir.

b. Lokal eksitatör ara nöronlar: Bunlar gelen duysal bilgiyi veya ağırlı sinyalleri projeksiyon nöronlarına geçirir ve uyarılmalarına yol açar. A delta ve C liflerinden gelen sinyallerle aktive olan bu lokal ara nöronlar ağırlı sinyalleri projeksiyon nöronlarına geçirmekle görevlidirler.

c. İnhibitor ara nöronlar: Daha yüksek merkezlere ağrı sinyallerinin iletimini düzenler. Genellikle geniş çaplı ve miyelinli olan A beta lifleri ile uyarılırlar ve projeksiyon nöronlarında inhibisyon meydana getirirler. Spinal kord dorsal boynuzunda iki tip projeksiyon nöronu bulunur (20):

a. Nosiseptif spesifik nöronlar: Daha çok lamina I'de yoğun olarak bulunurlar. Sadece A delta ve C lifleri tarafından uyarılırlar.

B . Geniş dinamik aralıklı nöronlar: Hem nosiseptörlerden hem de düşük eşikli mekanoreseptörlerden uyarı alırlar.

Primer afferentler ve spinal kord nöronları arasındaki sinapslar MSS ve periferik afferentler arasındaki ilk duraktır. Bu sinapslarda periferden gelen bilginin iletiminde önemli rol oynayan kimyasal maddeler vardır. Bu maddelere

nörotransmitter adı verilir. Nörotransmitterlerin belli özelliklerinin olması gerekmektedir (19). Bu özellikler şöyle sıralanabilir:

- Primer afferent sinapsta bulunmalı,
- Ağırlı uyararla serbestleşmeli,
- Her nöronda primer afferentte yaptığı etkiyi göstermeli,
- Antagonist bulunmalı.

Bir veya birden fazla eksitatör aminoasit ve peptid nörotransmitter, dorsal boynuzdaki nosiseptif nöronlar tarafından salgılanabilir. Bunlar eksitatör aminoasitlerden olan glutamat, aspartat ile peptid yapılı nörotransmitterlerden olan substans P, kolesistokinin, somatostatin, bombesin, kalsitonin, nörokinin A'dır.

Glutamat, omurgalılarda sinaptik eksitasyon yapan primer nörotransmitterdir. Glutamat başlıca A delta ve motor nöronlar ile sinaps yapan 1A afferentlerinden salgılanır. Glutamat NMDA reseptörlerini etkilediğinde uzun bir depolarizasyon meydana getirirken, NMDA olmayan reseptörlerini etkilediğinde çok kısa süreli depolarizasyona neden olur. Kısa depolarizasyon glutamatın ligand kapılı Na^+ , Ca^{2+}/K^+ iyon kanallarını açması ile meydana gelir. Uzun depolarizasyon ise glutamatın NMDA reseptörleri aracılığı ile oluşturduğu etkidir.

Peptid yapıda olan nörotransmitterler ise daha çok C lifleri tarafından salgılanır ve projeksiyon nöronlarında çok yavaş ve çok uzun süreli depolarizasyona neden olur. C liflerinin santral ucundan salgılanan peptid nörotransmitterler spinal korda ağrı olayını ve devamını bildirirken, periferdeki sinir ucundan da salgılanıp periferik dokunun bütünlüğünü korumaya ve savunmaya yönelik bir takım olayları da tetikler. Projeksiyon nöronları üzerine özellikle beyin sapı üzerinden inisiy nöronal bağlantılar gelir. Bu inisiy bağlantılar projeksiyon nöronları üzerinde antinosiseptif kontrol sağlamaya yönelik çalışırlar (19).

Ağırlı uyarının sürekli orta ya da sürekli sabit şiddette verilmesi ağrının daha şiddetli algılanmasına yol açar. Bu duruma sumasyon adı verilir. Sumasyon C liflerini sensitize etmeyen şiddetteki uyarılarla da görülebilir. Miyelinli A delta lifleri uyarıldığında keskin, iğne batması şeklinde bir ağrı, C lifleri uyarıldığında ise künt, yanma tarzında bir ağrı ortaya çıkmaktadır. Miyelinli lifler bloke edildiğinde keskin ağrı kaybolmakta, yanma tarzındaki ağrının hem şiddeti hem de süresi

artmaktadır. Bu gözlem miyelinli liflerin spinal kord düzeyinde hem inhibitör hem de eksitator olarak etki gösterdiği anlamına gelmektedir.

Daha hızlı iletilen miyelinli nosiseptörlerden gelen uyarı, spinal korda daha erken ulaşır. Projeksiyon hücrelerini uyararak keskin ağrıya neden olurken, inhibitör nöronları aktive etmektedir. Primat spinotalamik traktus nöronlarında bu inhibitör mekanizmaların varlığı gösterilmiştir. Spinotalamik traktus nöronları eksitatuvar inputlara ek olarak derin tabakalardan ve vücut yüzeyinden geniş bir inhibitör input almaktadır. Miyelinli A delta nosiseptörlerinin aktivasyonu ile kuvvetli bir inhibisyon ortaya çıkmaktadır. Kapı kontrol teorisinin temelini de bu veriler oluşturmaktadır (19).

C. Nosiseptif çıkıcı yollar

I. duyu siniri ile dorsal boynuzda gelen nosiseptif bilgi, burada II. duyu sinirine geçip, projeksiyon nöronları ile yukarıya iletilirler. A delta, C lifleri MS'e girdikten sonra birkaç segment aşağıya ve yukarı doğru ilerleyerek Lissauer Traktus'unun bir bölümünü oluştururlar. A delta ve C lifleri ile spinal kordun arka boynuzuna gelen impuls aynı segmentteki antero-lateral boynuz sempatik nöronlarını uyararak sempatik reflekse, anterior boynuzdaki motor nöronları uyararak da motor reflekse neden olur. Böylece oluşan spinal refleksi nosiseptif stimulusun segmental refleks cevabını oluştururlar (21).

Transmisyon olayında kilit nokta, arka boynuzda gelen nosiseptif impulsun aynı segmentte substantia jelatinozayı çaprazlayarak karşı taraftaki anterolateral alanda spinotalamik trakt (STT) boyunca ilerlemesidir.

1. Spinotalamik yolak: Birinci nöronun sonlandığı spinal kord arka boynuzdaki segmentten başlayarak talamus'a ulaşan 2. nöron çıkan sistem, transmisyonun önemli bir bölümünü oluşturur. Ağrının yer, şiddet ve zaman gibi ayırma boyutları ile algılanmasını sağlar (22).

2. Spinoretiküler yolak: Bu sistem korteksi ve subkortikal yapıları (limbik sistem ve diensefalon) genel bir uyanıklık içinde tutar ve zararlı uyarana karşı genel bir alarm hali yaratır (23).

3. Spinomezencefalik yolak: Bu yolun periakvaduktal bölgeye bağlantı yapması nosisepsiyon bakımından çok önemli görülmektedir. Çünkü burada analjezik etki

sağlayan enkefalinergic nöronlar vardır (24). Periaquaduktal gri cevher, antinosiseptif mekanizmaların tetiklendiği en önemli bölgelerden biri gibi görünmektedir. Dördüncü yolaktan başlayarak sonrakiler ağırlı sinyalleri götürebilme yeteneğine sahiptirler. Gereksinimlere göre devreye girerler. Buna örnek, ağrı cerrahisinde anterolateral traktusun kesilmesine rağmen bir süre sonra ağrıların yeniden algılanmasıdır.

4. Dorsal postspinal kolon sistemi

5. Spinoservikal yolak

6 Propriospinal multisinaptik çıkıcı sistem

D. Antinosiseptif İnici Sistemler

Antinosiseptif inici sistem SSS'den başlayan ve ağrının yukarı merkezlere iletilmesini önleyen sistemlerdir (8). Ağrı mekanizmalarını tam olarak anlayabilmek için bu sistemlerin incelenmesi gereklidir. Bu sistem başlıca üç grup içerisinde incelenir:

1. Serebral korteks ve hipotalamus ile bağlantı içinde olan mezensefalik periaquaduktal gri cevherde yer alan enkefalinergic nöronlar muhtemelen hipotalamik nöronlar endorfin salgırlar. Bu yapılar, bulbusta nukleus rafe magnus ve nukleus retikularis gigantosellularisde bulunan serotonergic nöronlar ile sinaps yaparlar (18). Serotonergic nöronlar MS'de dorsolateral funikulus içinden inerek dorsal boynuzda projeksiyon nöronları üzerine presinaptik ve postsinaptik olarak inhibisyon meydana getiriler (7).

2. Noradrenalin, bulbus ve ponsdaki nukleusların temel nörotransmitteridir. Bu nöronların uzantıları da dorsal funikulus içerisinde inerek projeksiyon nöronlarını inhibe ederler (7).

3. Üçüncü bir inhibitör sistem de antinosiseptif spinal segmenttir. Burada özellikle spinal yerleşimli enkefalinergic nöronlar önemli rol oynar. Dinorfin taşıyan nöronlar da bu bölgede yer alır. Lokal enkefalinergic nöronlar hem C hem de A delta liflerinden gelen kollateraller ile eksite olur ve böylece hem presinaptik bir mekanizmayla hem de postsinaptik olarak projeksiyon nöronunda inhibisyon yapar. Spinal enkefalinergic nöronlar serotonin ve noradrenalin taşıyan inici inhibitör

sistemlerin eksitasyonu ile de primer afferent sinapslar üzerine inhibisyon meydana getirir (7).

Enkefalinergik ve monoaminergik antinosiseptif sistemler, projeksiyon nöronlarında hücresel düzeyde potasyumun membran iletkenliğini arttırarak ve hiperpolarizasyon meydana getirerek etki ederler (7, 25). Ayrıca genel inhibitör madde olan gamma amino bütirik asit'in de (GABA) antinosiseptif mekanizmalara katıldığı düşünülür. Bunların dışında somatostatin ve bombesin gibi periferik veya ara nöronlardan çıkan nöropeptitlerin de inhibitör etkiler yaptığı gösterilmiştir (7).

Hızlı ve kısa süreli inhibisyon projeksiyon nöronlarında en çok monoaminergik transmitterler (norepinefrin ve serotonin), GABA ve enkefalin ile olur. Daha uzun süreli inhibisyon endorfin, kısmen enkefalin ve somatostatin ile meydana gelir (7).

2.1.3. Ağrı teorileri

Ağrı gelişim mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamasına rağmen birçok teori ileri sürülmüştür. Bu teorilerden başlıcaları şunlardır (26):

1. Özgüllük teorisi: Bu teoriye göre, özelleşmiş duyu organları (nosiseptörler) daha güçlü zararlı uyarılarla artan eşik değerlere sahiptirler. Bu özel periferik afferent nöronların, belirli spinal ve beyin kökü projeksiyon nöronlarıyla seçici bağlantıları vardır ve ağrı spesifik lifler ile iletilir. Bu uyarılar merkezi sinir sisteminde spesifik bir alanda sonlanırlar (Şekil 2.5a). Bu teorinin doğru olmadığı kanıtlanmıştır.

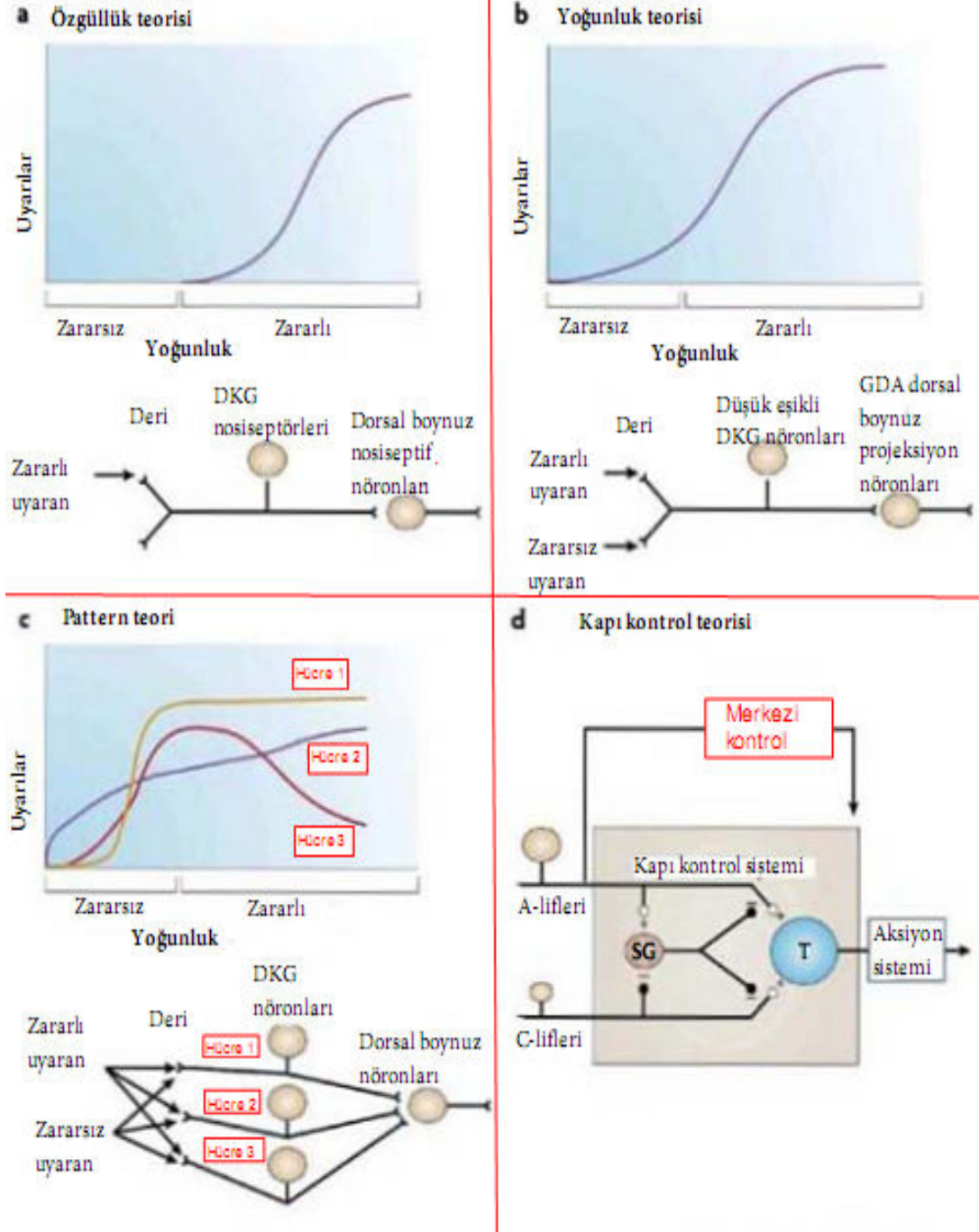
2. Yoğunluk teorisi: Bu teori periferik duyu organlarının düşük veya yüksek eşik değerli tiplere ayrılmadığını varsaymaktadır. Aynı zamanda, afferent liflerin zararsız uyarıları (örneğin, cilt basısı) belirli bir aktivite düzeyi meydana getirerek ilettiğini ancak zararlı uyarıların ise daha büyük bir akımla iletildiğini söyler. Yoğun primer afferent lifler, projeksiyon nöronlarını geniş dinamik aralıkla (GDA) aktive ederler. Geniş dinamik aralık projeksiyonlarının zayıf aktivasyonları zararsız uyarıları işaret ederken güçlü aktivasyon ağırlı (zararlı) uyarıları gösterir (Şekil 2.5b).

3. Pattern teori: İmpuls spinal korda girdikten sonra ağrı duyusunun başlaması için uyarının birikmesi gerekir. Nöronun bir kollaterali kendisinin yeniden uyarılması için uyarılır. Bu pozitif feedback mekanizma nöronu sürekli deşarj halinde tutar (Şekil 2.5c).

4. Kapı kontrol teorisi: İlk olarak 1965'te Melzack ve Wall tarafından ileri sürülen ve günümüzde işlevine mantıklı şekilde açıklık getirilen “Kapı-Kontrol Teorisi” otoritelerce en çok kabul gören teori olarak günümüzde de kabul görmektedir. Bu teoriye göre, ağrılı uyarılar algılanmadan önce kapı kontrol mekanizması ile karşılaşmaktadırlar. Ağrı yollarının ilk nöronunun uzantıları spinal kord arka boynuz hücreleri ile sinaps yapmaktadır. Bu lifler Rexed tarafından 10 laminaya ayrılan gri cevher içine çeşitli seviyelerden girerek laminalar arasında ilerlemektedir. Bu laminaların kapı kontrol teorisinin açıklanmasında en önemli olanları 2., 3. ve 5. laminalardır. İkinci ve 3. laminalardaki küçük hücreler, substantia gelatinosa (SG) 'yı oluşturmakta ve ciltten gelen afferent liflerin çoğu burada sonlanmaktadır. Bu hücreler 5. laminaya gidecek uyarıları modüle ve regüle etmektedirler. Bunu da 5. laminada bulunan ve sensoryal bilgiyi beyne iletmekten sorumlu olan transmission (T) hücrelerini frenleyerek yapmaktadır. Buna göre SG hücrelerinin uyarılması frenleyici etkiyi artırmakta inhibe edilmesi ise azaltmaktadır (26).

Bu bilgilere dayanarak Kapı Kontrol Teorisi şu aşamalarda toplanabilir:

- a.** Afferent sinirlerle taşınan uyarıların 5. laminaya ulaşması SG hücrelerince düzenlenmekte ve SG hücreleri T hücrelerini frenleyici etki yapmaktadır.
- b.** Kapı; kalın ve ince liflerin rölatif aktivitesince kontrol edilmektedir. Kalın lifler A beta) SG hücrelerini uyararak iletimi inhibe etmekte (kapıyı kapatmakta), ince lifler (A delta ve C) ise SG hücrelerini inhibe ederek iletimi kolaylaştırmaktadır (kapıyı açmakta).
- c.** T hücreleri ağrı hakkında bilginin iletilmesinde en önemli görevi yapmaktadır. Dokunma ve ısı duyularını taşıyan kalın lifler hem SG hem de T hücrelerini uyarır. Bu şekilde uyarılan SG hücreleri T hücrelerini inhibe eder, dolayısıyla T hücrelerinin doğrudan uyarılması kısa sürer. Aksine ağrılı uyarıları taşıyan ince lifler SG hücrelerini inhibe ederken, T hücrelerini uyarır. Bu uyarılar daha şiddetli olup, uzun sürer. Ağrının periferik sinir stimülasyonu ve akupunktur ile kontrol yöntemi bu teorisin direkt sonucu olup amaç, ağrının yukarı iletilmesini önleyici kalın lifler boyunca uyarıları arttırmaktır.
- d.** Kalın liflerce iletilen uyarıların bir kısmı da dorsal kolon içinde ilerleyerek, neospinotalamik yolla talamusa ulaşır. Bu yol ağrının niteliği, yeri ve uyarının şiddeti hakkında kesin bilgi oluşturur ve kısa sürede uyum sağlar (Şekil 2.5d).



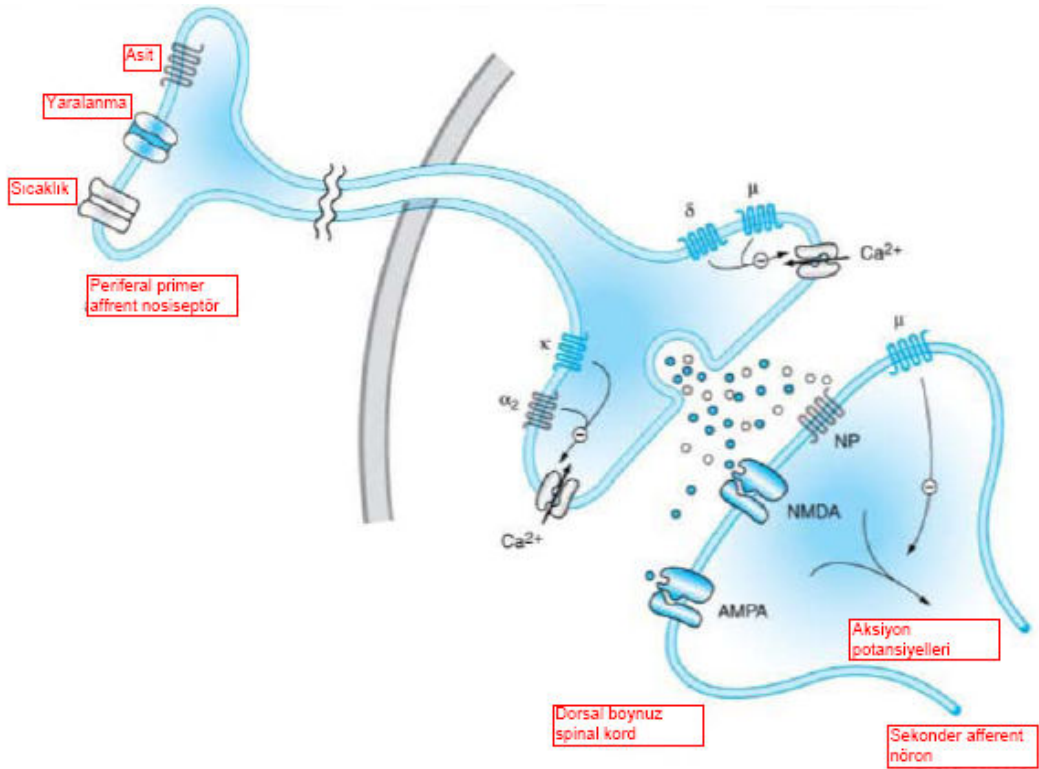
Şekil 2.5. Ağrı teorilerinde uyarı ve primer afferent sinyal arasındaki ilişkilerin şematik gösterimi (27). (DKG; Dorsal kök gangliyonu, GDA; Geniş dinamik aralıklı, SG; substantia gelatinosa, T; transmission)

2.2. Opioid Analjezikler

Opioidler etkilerini, merkezi ve periferik sinir sistemine yaygın olarak dağılan opioid reseptörleri ve transmitterlerden, endojen opioid peptidlerden meydana gelen endojen opioid sistemini aktive ederek gösterirler. Endojen opioid sistemi sadece sinir sisteminde değil, üreme sistemi, kromafin hücreleri, immün sistem gibi diğer sistemlerde de bulunur. Opioidlerde diğer analjezikler gibi MS'in değişik bölgelerini etkileyerek etkilerini gösterirler (Şekil 2.6).

Endojen opioid sistemi değişik biçimlerde harekete geçer:

1. Endojen opioid peptidlerin salgılanması
2. Reseptör bölgelerinde endojen opioid peptid yoğunluğunun artırılması
3. Opioid reseptörünün farmakolojik olarak aktivasyonu, opioid agonistlerin verilmesi (28).



Şekil 2.6: Opioidler ve diğer bazı analjezik ajanların spinal etki yerleri. Mü, delta ve kappa agonistler nosiseptif primer afferentlerin presinaptik uçlarından transmitter salınımını azaltırlar (özellikler glutamat ve eksitator nöropeptidlerin). Mü agonistler aynı zamanda inhibitör bir postsinaptik potansiyel oluşturan K^+ iletimini artırarak ikinci sıra ağrı iletim nöronlarını hiperpolarize eder.

2.2.1 Opioid reseptörleri

Opioid reseptörleri 1973'te tanımlanmıştır. Bugüne kadar 5 tip reseptörün varlığı kanıtlanmıştır. Bunlar mü (μ), kappa (κ), sigma (σ), delta (δ) ve epsilon (ϵ) reseptörleridir:

Mü (μ) reseptörleri: Spesifik agonisti morfindir. Morfinle uyarılır ve morfinin oluşturduğu supraspinal analjeziden sorumludur. Ayrıca solunum depresyonu, öfori, kas rijiditesi ve fiziksel bağımlılık oluşmasına katkıda bulunurlar (29).

Kappa (κ) reseptörleri: Spesifik agonistleri ketosiklazosin ve türevleri ile nalorfin ve pentazosindir. Spinal analjezi, miyozis ve sedasyondan sorumludur.

Sigma (σ) reseptörleri: Spesifik agonisti SKF 10047 adı verilen opioiddir. Agonistleri disfori ve halüsinasyona neden olur. Ayrıca solunum ve vazomotor merkezi stimüle eder.

Delta (δ) reseptörleri: Spesifik agonisti β -endorfin ve enkefalinlerdir. İşlevi kesin olarak bilinmemektedir. Motor entegrasyon ve idrar fonksiyonunda etkili olabilir.

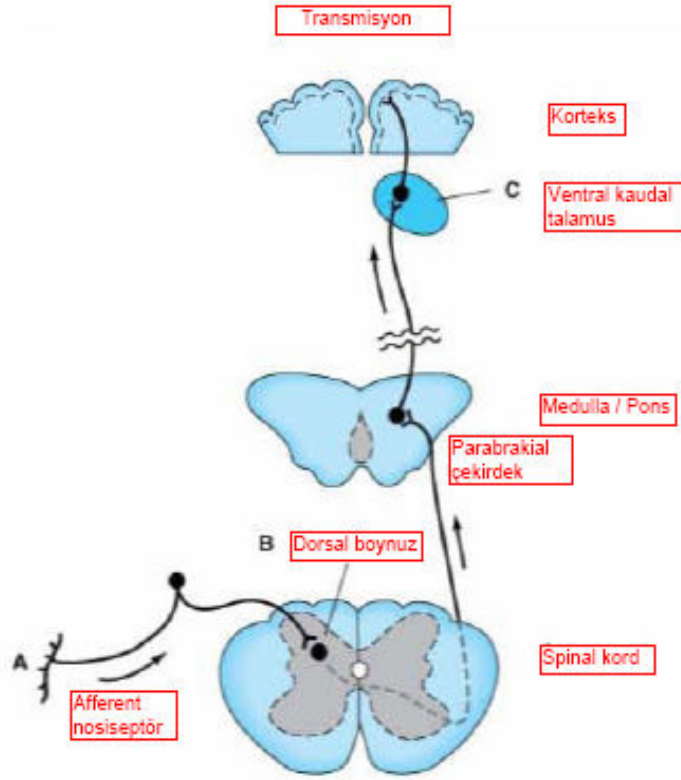
Epsilon (ϵ) reseptörleri: Hormonal etkilerden sorumlu tutulmaktadır.

Opioid reseptörleri santral sinir sisteminde birçok bölgede bulunur ancak gri madde, beyaz maddeden daha fazla reseptör içerir. Santral sinir sisteminde buldukları yerler; serebral korteks, hipotalamus, talamus, orta beyin, ekstrapiramidal alan, substantia jelatinosa ve sempatik preganglionik sinirlerdir. En yüksek konsantrasyonda buldukları yerler ağrı ile ilgili yapılar ve yollardır (30). Bu reseptörler buldukları yerlere göre farklı etkiler yapmaktadırlar (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Opioid reseptörleri ve klinik etkileri

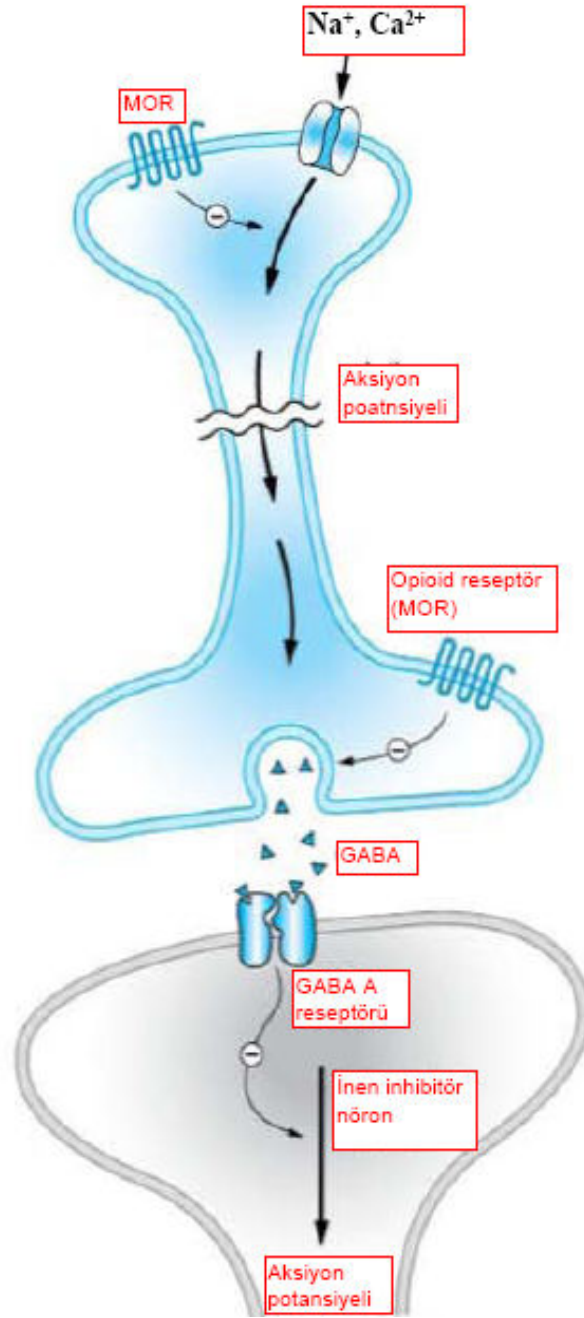
Reseptör	Klinik etki	Agonist
Mü	Supraspinal analjezi $\mu 1$ Respiratuar depresyon $\mu 2$ Kas rijiditesi Fiziksel bağımlılık	Morfin Met-enkefalin Beta-endorfin
Kappa	Respiratuar depresyon Spinal analjezi Sedasyon	Morfin Nalbufin Butorfanol Dinorfin
Delta	Analjezi Davranışsal ve respiratuar Depresyon Epileptojenik etki	Lö-enkefalin Beta-endorfin
Sigma	Disfori, deliryum, midriyazis Taşikardi, hipertansiyon Halüsinasyonlar Respiratuar stimülasyon	Pentazosin Nalorfin
Epsilon	Stres cevap	Beta-endorfin

Opioid analjeziklerin etkileri bu reseptörler aracılığıyla periferden afferent ağrı yollarıyla yüksek merkezlere gelen uyarılarla Şekil 2.7'deki gibi görülür (31).



Şekil 2.7: Opioid analjeziklerin putativ etki yerleri. A: Opioidlerin zarar görmüş periferel dokulara direkt etkileri B: İnhibisyon aynı zamanda spinal korda da oluşur. C: Talamustaki muhtemel etki yerleri.

Aynı zamanda opioidlerin bir başka etkisi olarak ağrı inhibitör nöronu eksojen veya endojen opioidler tarafından indirekt olarak aktive olur ve inhibitör internöronu (GABAerjik) inhibe eder. Bu da spinal kordun arka boynuzunda nosiseptif sürecin inhibisyonunun artmasına neden olur (31) (Şekil 2.8).



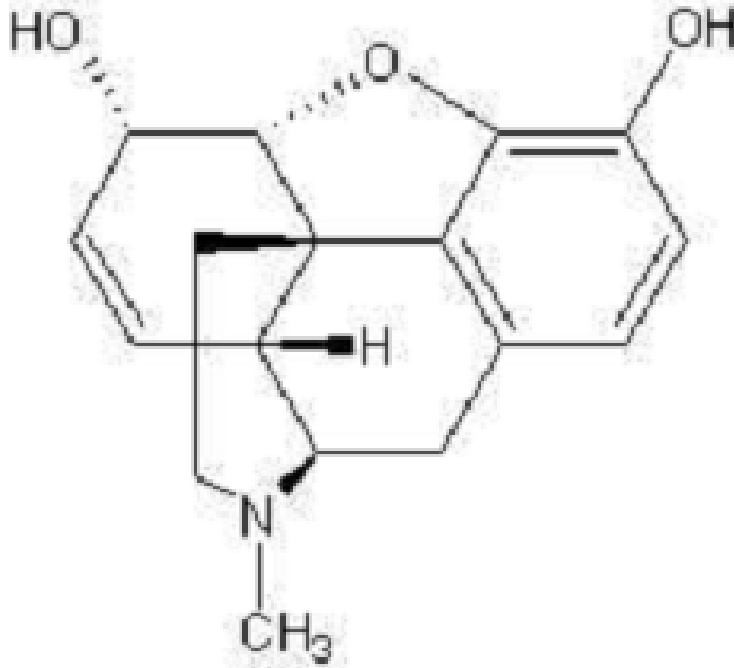
Şekil 2.8: Opioid reseptör (MOR) analjezisi tarafından inen yolların modüle edici etkisi altında yatan beyin kökü lokal döngüsü.

Bazı ilaçlar opioid reseptörleri üzerinde farklı etkiler yapabilir. Reseptörün türüne göre agonistik veya parsiyel agonistik etki gösterebilirler. Bu tür ilaçlara agonistik–antagonistik opioidler adı verilir (parsiyel antagonist nalorfin, nalbufin gibi). Morfin bilinen tüm reseptörler üzerinde agonist etki yapar. Nalokson ise tüm reseptörleri bloke eder. Naloksonun etkisi reseptörün türüne göre farklı derecelerde olur. Naloksonun antagonist etkisine en duyarlı reseptör mü (μ) reseptörüdür (32).

2.2.2. Morfin

İlk defa 1803'te ana alkaloid olan ‘principum somniferum’ bulunmuş ve 1817'de morfin ismini almıştır. Ağrı tedavisinde en sık kullanılan doğal bir opioid olup, fenantren grubunun üyesidir. Opioidlerin karşılaştırılmasında prototip olarak alınır (33). Morfin % 25 oranında non-iyonize formdadır ve 1/3'ü plazma proteinlerine bağlanır. Lipid eriyebilirliği azdır veya yoktur. Bu nedenle morfinin SSS'ne penetrasyonu geç olur ve etkisi geç başlar, uzun sürer. Yağ dokusunda aşırı miktarda depolanabilir (34).

Morfin kimyasal formülü: C₁₇H₁₉NO₃



Şekil 2.9: Morfinin kimyasal yapısı

2.2.2.1. Morfinin Merkezi Sinir Sistemine Etkileri

Genel anesteziyelere göre analjezik etki oluşturmada üstündür. Morfin hem spinal (kappa ve delta reseptörleri aracılığı ile) hem de supraspinal (mü1 reseptörleri aracılığı ile) düzeyde analjezi oluşturur (34, 35). Keskin akut ağrılardan çok kronik künt ağrılara karşı daha etkilidir. Ağrının hastayı rahatsız edici özelliği ortadan kalkmasına rağmen ağrı duyusu tamamen kaybolmuş değildir. Hasta sorulduğunda ağrının yerini gösterebilir (18). Ağrısı olan ya da bağımlı olan hastalara morfin verildiğinde öfori oluşurken (mü reseptörleri ile) normal bireylerde kappa ve sigma reseptörleri aracılığı ile disfori yapar.

İnsanda mü ve kappa reseptörleri aracılığı ile sedasyon oluşturur. Sedatif etkinin ortaya çıkmasında lokus seruleusun önemli etkisi olduğu kabul edilmektedir. Opioidler lokus seruleusun aktivitesini inhibe ederek korku, panik, anksiyete duygularının ortaya çıkmasını engellerler, mental bulanıklık meydana gelir. Çevreye ilgisizlik oluşturur. Bol rüyalı uykuya neden olur. Libidoyu ve seksüel performansı deprese eder. Antikonvülsan etkisi yoktur. Bunun aksine konvülsan ilaçlara duyarlılığı arttırır.

2.2.2.2. Morfinin klinik kullanılışı

Klasik olarak intramuskuler veya subkutan yol tercih edilir. Erişkin dozu ortalama 10 miligramdır. Çocuklara da subkutan 0,1-0,2 mg/kg kullanılır. Erişkinde intravenöz olarak 2,5-20 mg dozunda verilir. Parenteral dozlar 4 saatte bir tekrarlanabilir. Şiddetli ağrılarda 3 mg /kg iv dozda verilebilir. Morfinin oral uygulaması rutin olarak kullanılmaz. Terminal kanser ağrılarında tercih edilir. Morfinin intratekal ve epidural uygulamaları da vardır (36).

Morfin klinikte, akut ve kronik ağrılı durumlar, kanser ağrısı, pre- ve post-operatif ağrılara karşı analjezik olarak kullanılır. Ayrıca akut pulmoner ödem ve kalp yetmezliği tedavisi, öksürük, diyare ve anesteziyel uygulamalar da diğer endikasyonları arasındadır (31, 37).

2.2.2.3. Tolerans ve morfin toleransı

Morfin ve benzerlerinin tekrarlayan sık kullanımları sonunda etkilerinde azalma görülür ve buna tolerans denir. Aynı etkiyi elde etmek için daha yüksek dozlar kullanılmalıdır. Tolerans yanında fiziksel bağımlılıkta oluşur. Fiziksel bağımlılık, ilacın kesilmesi durumunda veya antagonist uygulanması durumunda çekilme sendromu veya yoksunluk sendromu görülmesiyle karakterizedir (31).

Tolerans: Bir ilacın ya da benzerinin belli bir süre devamlı kullanılması sonucu, başlangıçta ilaca karşı alınan farmakolojik cevabın azalmasıdır. Başlangıçtaki etkiyi oluşturmak için ilacın daha yüksek doz uygulanması gerekir. İlaçtan belli süre uzak kalınmasıyla tolerans kaybolur (38).

Çapraz tolerans: Aynı farmakolojik gruptaki ilaçlar veya ilaç grupları arasında ilaçlardan birine karşı gelişen tolerans sonucu diğer bir ilaca yanıtın azalması durumudur. Örneğin, alkol ve barbitüratlar.

Akut tolerans (Taşiflaksi): Duyarsızlaşmanın hızlı gelişen halidir. Hücre membranındaki hızlı değişikliklere bağlıdır. Taşiflaksi oluşturan ilaçların bir kısmı, dokuda endojen bir maddenin salıverilmesine neden olarak etki yapar. Örneğin efedrin, tiramin gibi sempatomimetik aminlerin sık aralıklarla verilmesi bazı etkilere karşı akut tolerans oluşturur.

Kısmi tolerans: Kullanılan ilacın bazı etkilerine tolerans geliştiği halde, diğerlerine karşı tolerans gelişmemesi ya da az gelişmesidir. Örneğin, morfinin miyotik ve konstipan etkilerine karşı tolerans gelişmez.

Doğuştan tolerans: Bir kişide maddenin dispozisyonunun hızlanmış olmasına ya da o maddenin aktive ettiği reseptörün veya post-reseptör olayların duyarlılığının düşük olmasına bağlıdır. Genetik polimorfizm nedeniyle görülür. Bu kişilerde ilacın ilk dozu bile yeteri kadar etki oluşturamaz.

Kazanılmış tolerans: Üçe ayrılır;

a. Farmakokinetik: Metabolizmasının hızlanmasına veya dağılım hacminin artmasına bağlıdır.

b. Farmakodinamik: Nöronal etkiye aracılık eden reseptör sayısının azalmasına, desensitize olmasına ya da post-reseptör olaylardaki adaptif değişikliklere bağlıdır.

c. Öğrenilmiş: Bu da ikiye ayrılır;

— Davranışsal: Madde kullanımının yol açtığı işlev bozukluğunun kullanıcı tarafından öğrenilmesi sonucu kişinin çabasıyla bastırılması durumudur. Örneğin alkoliklerde yalpalayarak yürümenin azalması.

— Koşullandırılmış: Bir durum, ortam ve olaylar gibi çevresel ipuçlarının öğrenilmesine bağlı olarak gelişen bir koşullandırma madde uygulamasına eşlik eder. Burada madde verileceğinin habercisi olan ipuçları veya ilaç beklentisi zıt yönlü adaptif veya refleks savunma mekanizmalarını daha madde verilmeden tetikler; kullanıcının bazal durumunu değiştirir.

Tolerans ve fiziksel bağımlılık gelişim mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılammıştır ancak reseptörlerin devamlı uyarıldığı şiddetli kronik ağrı tedavisinin oluşması ve devamına katkıda bulunduğu bilinmektedir. Son zamanlarda, toleransın siklik adenozin monofosfat (cAMP) sistemi up regülasyonu ile ilişkisinin olduğuna dair görüş zayıflamıştır. Bu süreç tolerans gelişimiyle ilgili olmasına rağmen açıklamak için yeterli değildir. Toleransı açıklamak için kullanılan ikinci hipotez, endositoz ile reseptörlerin down regule olması üzerine bina edilmişti. Ancak, yapılan araştırmalar morfinin opioid reseptörlerinin endositozunu indüklediği yönde bir bilgi elde edememiştir. Bu da reseptörlerin normal duyarlılığının devamı için endositoz veya geri dönüşüm ile reaktif edilmesi gerektiğini önermektedir. Araştırmanın bir başka alanı, opioid reseptör fonksiyonlarının toleransın sürdürülmesinde bağımsız bir komponent olduğudur. Ayrıca, reseptör kenetlenmemesi şeklinde görüş gittikçe önem kazanmaktadır. Bu hipoteze göre tolerans, reseptörlerle G proteinleri, ikincil haberci sistemleri ve onların hedef iyon kanalları arasındaki disfonksiyona bağlıdır. Üstelik bir iyon kanal kompleksi olan NMDA reseptörünün toleransın oluşması ve sürdürülmesi konusunda kritik bir rol oynadığı ileri sürülmüştür. Hatta bir NMDA reseptör antagonisti olan ketaminin opioidlere karşı tolerans gelişimini engelleyebileceği gösterilmiştir (39).

Tolerans gelişiminin yanında opioid analjeziklerin sıklıkla uygulanması hiperljeziye benzer bir ağrı algılanmasında artışa neden olmuştur. Bu fenomen morfin, fentanil ve remifentanil gibi bazı opioidlerin kullanımı sırasında görülmüştür.

Spinal dinorfinler opioidlerin indüklediği ağrı ve hiperljezi için önemli bir kanıt olarak ortaya çıkmaktadır (50).

Opioidin normal terapötik dozlarda ilk alınmasıyla tolerans gelişimi başlamasına rağmen, genellikle tolerans 2–3 haftalık kullanımdan önce klinik bulgu vermez. Yüksek dozların kısa aralıklarla verilmesi tolerans gelişimin hızlandırırken, düşük dozların geniş aralıklarla verilmesi ise yavaşlatır (31).

Kullanılan bileşiğe ve ölçülen etkiye bağlı olarak değişmek üzere gelişen tolerans 35 kat kadar olabilir. Tolerans gelişimi belirgin olarak analjezik, sedatif ve solunumu deprese edici etkilere karşı gelişir. Morfine karşı tolerans gelişmemiş bir kişide 60 mg ile solunum deprese olabilirken, tolerans gelişmiş bir kişide 2–3 saat içerisinde alınmış 2000 mg morfine karşı solunum depresyonu gelişmeyebilir. Tolerans aynı zamanda antidiüretik, emetik ve hipotansif etkilere karşı gelişirken miyotik, konvülzan ve konptipasyon yapıcı etkilere karşı gelişmez (35) (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Opioidlerin bazı etkilerine tolerans gelişme dereceleri

Yüksek derecede tolerans gelişen etkiler	Orta derecede tolerans gelişen etkiler	Çok az ya da hiç tolerans gelişmeyen etkiler
Analjezi Öfori, disfori Sedasyon Solunum depresyonu Antidiürezis Bulantı, kusma Öksürük kesici etki	Bradikardi	Miyozis Konstipasyon Konvulsiyonlar Antagonist ilaçların etkileri

Morfin bağımlılarında morfinin birden kesilmesi son dozdan 8–12 saat sonra başlayan yoksunluk (abstinens) sendromuna neden olur. Yoksunluk belirtilerinin şiddeti bireysel değişkenlik gösterir. Önce ıslak belirtiler (lakrimasyon, rinore, terleme, esneme) gözlenir. Daha sonra, uyku bozuklukları, irritabilite, tremor, midriyazis, taşikardi, kan basıncında artma, ciltte “kaz derisi” görünümü, bulantı, kusma, şiddetli hapşırma, diyare, esneme, kas ağrıları, bacaklarda klonik kasılma gibi belirtiler ortaya çıkar (35).

İlacın kullanılmasının bırakılmasından sonraki birkaç gün içinde opioidlerin sedatif ve solunum etkilerine karşı gelişen tolerans kaybolur. Emetik etkilerine karşı gelişen tolerans ilacın çekilmesinden sonra birkaç ay sürebilir. Toleransın oluşması, kaybolması veya toleransın derecesi, kullanılan opioidlere ve onu kullanan şahıslara bağlı olarak değişebilir. Örneğin metadona karşı gelişen tolerans morfine göre daha az ve yavaş gelişir (35).

Ağrı kesicilere karşı gelişen tolerans agonistlere göre farklı reseptörleri etkileyerek daha düşük derecede oluşur. Halüsinasyonlar, sedasyon, hipotermi ve solunum depresyonu gibi etkiler karışık reseptörleri etkileyen bileşiklerin tekrarlayan uygulamalarında azalır. Ancak bu ajanlara gelişen tolerans agonist ilaçlara olan çapraz toleransı içermez. Aynı zamanda bu değişik reseptörleri etkileyen ajanların antagonist etkilerine veya saf antagonistlerin etkilerine karşı tolerans gelişmez

Opioidlere karşı çapraz tolerans gelişimi bu ilaçların önemli bir karakteristik özelliğidir (35). Bu durum öncelikle reseptör agonist aktivitesi olan ajanlar için geçerlidir. Morfin ve benzerlerinin sadece analjezik etkilerine karşı çapraz tolerans gelişmez aynı zamanda öforik, sedatif ve solunumsal etkilerine karşı da gelişir. Ancak reseptör agonistleri arasında gelişen çapraz tolerans sıklıkla parsiyel ya da tam değildir. Bu klinik gözlem kanser tedavisinde yıllarca kullanılan opioid rotasyonu fikrini oluşturmuştur. Bir opioidin etkisinde azalma görülen bir hastaya başka bir opioid ilaç verilmiştir (örneğin morfin hidromorfinle, hidromorfin metadonla değiştirilmiştir) ve böylece eşit doz kullanımda daha iyi ağrı kesici etki elde edilmiştir. Başka bir yaklaşımda opioid ilacı opioid olmayan bir ajanla kombine etmektir. NMDA reseptör antagonistlerinin (örneğin ketamin) opioidlere tolerans gelişimi engellediği veya geriye döndürdüğü insan ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Ketamin başta olmak üzere bu ajanların kullanımı postoperatif ağrıyı azaltmak ve opioid toleran hastalarda opioid gereksinimini azaltmak gibi etkileri kontrollü klinik çalışmalarda gösterilmiştir (31).

Reseptör antagonistlerinin agonistlerle beraber kullanılmasının da tolerans gelişimini engelleyebilecek bir strateji olduğu ileri sürülmüştür. Bu kaniya opioid reseptörden yoksun farelerde opioid toleransı gelişmemesi sonucunda varılmıştır (35).

2.3. Ağrı Ölçümünde Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri

Ağrı ile ilgili yapılan çalışmalarda hedef ağrının özelliklerini, temelini açıklamak ya da herhangi bir maddenin ağrının algılanması üzerine olası etkisinin araştırmaktır. Hedef olarak ne belirlenirse belirlensin, hayvan modellerine ihtiyaç vardır ve seçilen modelin uygunluğu sonuçların daha doğru olmasına katkıda bulunacaktır (41) (Tablo 2.5).

Tablo 2.5. Ağrı deneylerinin karakteristikleri

Uyarının etiyojisi	Nosiseptif, kimyasal/inflamatuvar, nöropatik
Uyarının türü	Spontan (kimyasal)
Uyarının yoğunluğu	Uyarılmış (termal, mekanik)
Aktive primer afferentler	A-delta, C
Lokalizasyon	Kutanöz, subkutan, visseral, sinir sistemi
Süre	Akut, subakut, tonik, kronik
Yanıt tipi	Eşik, eşik üstü
Yanıt karakteristiği	Refleks (fleksiyon/ekstansiyon, doğrulma) Organize (vokalizasyon, kaçma)
Etkinin düzeyi	Spinal, supraspinal

Akut ağrı çalışmalarında çeşitli uyarılar kullanılmaktadır. Yeterli uyarı oluşturmak için, şiddeti belirlenebilen, tekrar üretilebilen ve non-invaziv olma özelliklere sahip bir uyarı uygulanmalıdır (42).

Kullanılan uyarılar:

- a. Elektriksel uyarı
- b. Termal uyarı
- c. Mekanik uyarı
- d. Kimyasal uyarı

2.3.1. Akut ağrı ölçüm modelleri

Termal uyarı kullanan testler: Termal uyarı; ağrı eşiğine kadar deri üzerinde ısıyı arttırmalıdır. Bu etkileşim bazı parametrelere bağlıdır;

a. Derinin yansıtma, geçirme ve absorban özellikleri

b. Derinin iletme özellikleri

c. Derinin başlangıç ısısı

d. Derinin belirli bir bölgesine verilen enerji miktarı; bu hem enerji kaynağının gücüne hem de enerjinin veriliş süresine bağlıdır (42).

1. Tail-Flick testi: Tail flick testi ilk olarak 1941 yılında D'Amour ve Smith tarafından tanımlanmıştır (43). Testin esası fare veya sıçanın bir lambadan gelen ve şiddeti ayarlanabilir odaklanmış ışığa, kuyruğunu çekmek sureti ile verdiği yanıtın değerlendirilmesidir. Deney hayvanının ışık uyarısını almaya başladığı andan, ışığın ağrılı uyarısını hissettiği ve kuyruğunu çektiği an arasındaki süre deneğin ağrı eşiği olarak kaydedilir. Analjezik etkisi olan ilaçlar kuyruk çekme süresini uzatırlar. Tail flick testlerinde önemli bir nokta da özellikle analjezik etkili ilaçlarla çalışırken uygulanan termal uyarının belli bir süre sonunda mutlaka kesilmesidir. Bu süre kuyrukta önemli bir hasar oluşturmayacak şekilde ayarlanmalıdır ve genellikle 7-15 sn bir testi kesme (cut-off) süresi olarak uygun olabilir.

2. Tail immersiyon testi: Bu testte ise hayvanın kuyruğu sabit ısıda tutulan suya batırılır. Kuyruğun ve bazen tüm bedenin çekilmesi ile sonlanır. Reaksiyon süresi hayvanın ağrı eşiğini belirler (41).

3. Pençe çekme testi: Mekanik uyarı yardımıyla ağrı eşiğinin belirlenmesinde kullanılır. İnflamasyon gibi etkenlere bağlı olarak hiperaljezinin geliştiği durumlarda idealdir. Mekanik uyarı hayvanın pençesine 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 değişmediği akut ağrı deneyleri kadar kronik ağrı, nöropati ve uzun süreli inflamasyonun 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 artırabilir. Rölatif olarak yüksek basıncın uygulanması

gerektiği durumlarda uygulanan ilacın etkinliğini tespit etmek zor olabilir. Yanıtlar oldukça yüksek bireysel farklılıklar gösterebilir.

4. Hot Plate testi: İlk olarak Woolfe ve MacDonald tarafından 1944'te tanımlanmış olmasına rağmen en çok 1953'te Eddy ve Leimbach tarafından tanımlanan modifiye formu kullanılmaktadır. Temel olarak 50-56°C'ye ısıtılmış bir yüzeyden oluşur. Hayvanın ısıtılan yüzey üzerinde belli bölge sınırında kalması için hareket kabiliyetini sınırlamayacak büyüklükte cam silindirler kullanılır. Yüzeye deneğin bırakılmasından hayvanın arka ayağını çekmesine kadar geçen süre tespit edilir. Davranış sadece arka ayağın çekilmesi olabileceği gibi ayak çekme ve yalama, tekmeleme, sallama, dans etme veya sıçrama şeklinde olabilir. Yöntemin en büyük dezavantajı reaksiyon süresinin çok fazla bireysel değişkenlik göstermesidir. Bu testte ayak çekme refleksi spinaldir, fakat modülasyonu supraspinaldir. Dolayısıyla testin sadece supraspinal düzeyde ağrı değerlendirilmesi için kullanıldığını kabul etmek doğru olmayacaktır (41).

5. Soğuk uyarı testi: Kronik ağrı/nöropatilerde kullanımı yaygındır. Bu test için soğuk platform düzeneği kurulabilir. Soğuk ağrı eşiğinin değerlendirilmesi için buzdolabında $+5\pm 0.5$ °C'ye kadar soğutulmuş buz kalıpları kullanılır. Bu kalıplar ile hazırlanan soğuk zemin üzerine yerleştirilen hayvanın ısı uyarısına vermiş olduğu cevap süresi ölçülerek ağrı eşiğinin tespiti sağlanır. Çalışmaya alınan her sıçanın ağrı eşiği ölçümü yapıldıktan sonra diğer sıçan için yeni bir buz kalıbı kullanılır. Kurulan bu düzeneğin yanları plastik saydam bir bariyerle hayvanların dışarı çıkmaları engellenecek şekilde kapatılır. Kalıplar üzerine sıçanlar bırakılarak test uygulanır. Sıçanların ortama bırakıldıkları andan itibaren, ekstremitelerini hızla çekmeleri veya yalamalarına kadar geçen süre saniye cinsinden kronometre kullanılarak belirlenir. Bu testin uygulanması esnasında da ortamın sessizliğine büyük önem verilir ve hayvan 100 saniye içerisinde cevap vermediği takdirde doku hasarını önlemek amacıyla bu zemin üzerinden alınır ve çalışmaya dahil edilmez (41).

Mekanik uyarı kullanan testler: Temelde mekanik uyarı yardımıyla ağrı eşiğinin belirlenmesinde kullanılır. Mekanik ağrı eşiği değerleri Randall-Selitto metodu ile Dinamik Plantar Esteziyometre kullanılarak ölçülür (44). Mekanik ağrı eşiği ölçümü sırasında denekler iki odalı kafeslere yerleştirilir. Stimulus ünitesindeki ayna ile sıçanın uygun arka pençesi gözlenir. Hareketli filamentin ayarlanması sonrası uyarı

başlatma düğmesine basılır. Bu uyarı ile sıçanın uygun arka pençesine hareketli filament dokunur ve 50 grama kadar kuvveti 20 saniye içine yayarak hasarlı arka pençeye uygular. Sıçanın arka bacağını geri çekmesi pozitif cevap olarak kabul edilir. Dijital ekrandaki değer gram biriminde mekaniksel ağrı eşiği olarak kaydedilir. Ardı ardına üç ölçüm yapılır ve ortalamaları alınır. Sıçanın hareketi sonucu oluşan değerler şüpheli olarak kabul edilir ve ölçüm tekrarlanır.

Elektriksel uyarı kullanan testler:

1. Kuyruğun elektriksel uyarılması
2. Diş pulpasının elektriksel uyarılması
3. Ekstremitenin elektriksel uyarılması

2.3.2. Kronik ağrı ölçüm modelleri

Bu modeller 3 başlık altında toplanabilir:

1. İntradermal enjeksiyonlar (Formalin testi, pençe yalama testi)
2. İrritan ajanların intraperitoneal enjeksiyonu (Asetik asit ile kıvrınma, writhing testi)
3. İçi boş organların uyarılması

2.4. Nitrik Oksit

Atmosferde, bakteriler, asid yağmurları, egzoz gazları ve sigara dumanı, çevre kirlenmesine neden olan, reaktif nitrojen oksitleri üretirler. Bu reaktif nitrojen oksitler, aynı zamanda karsinojenik etki de oluşturabilirler. Atmosferde kirletici bir gaz olarak bilinen nitrik oksitin, memeli hücrelerinde sentezinin gösterilmesi, birçok biyolojik araştırmalarda önemli bir süreci başlatmıştır (45, 46).

Bir azot ve bir oksijen atomu içeren esterleşmemiş bir elektrona sahip olan NO, renksiz gaz yapısında, küçük, yüksüz ve lipofil bir moleküldür. Bilinen en düşük moleküler ağırlıklı, memeli hücreleri sekresyon ürünüdür. Dayanıksız bir moleküldür. 3–5 saniye gibi çok kısa bir yarı ömre sahiptir. Biyolojik membranlardan çok kolay difüze olabilir (45–47). Lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda erir (48, 49). Düşük konsantrasyonlarda iken toksik değildir ve birçok önemli fizyolojik işlevin gerçekleşmesinde rol alır.

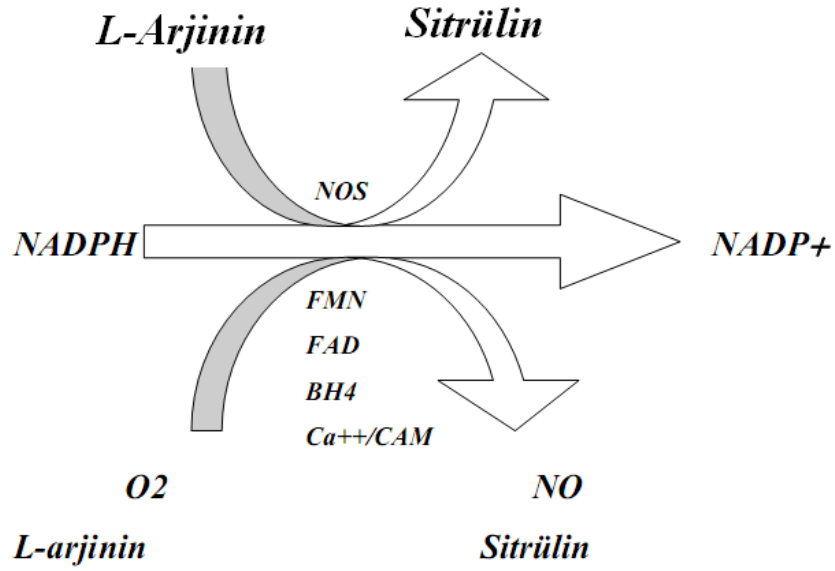
2.4.1. Tarihsel gelişimi

Amerika Birleşik Devletleri New York Downstate Üniversitesi Farmakoloji bölümünden Furchgott ve Zawadski (50) ilk olarak 1980 yılında tavşan aortik damar şeritlerinde noradrenalin, fenilefrin veya başka bir kasıcı agonistle submaksimal (maksimal kasılmanın % 60-70'i) bir kasılma sağladıktan sonra ortama asetilkolin (Ach) ilavesi ile gevşemelerin oluştuğunu gösterdiler. Bu gevşemenin endotelyuma bağımlı olduğunu ve bu etkiden endotelyumdan düz kasa geçebilen non prostanoid labil bir maddenin sorumlu olduğunu ileri sürdüler. Bu hazırlanan gevşeme izole aort halkalarında endotel mevcutsa olmakta, ancak endoteli alındıktan sonra gevşeme kaybolmakta veya kasılmaya dönüşmekteydi. Bu nedenle bu faktör "Endotelium Derived Relaxing Factor"(EDRF) olarak adlandırılmış ve EDRF ile olan araştırmalar hız kazanmıştır. Başlangıçta EDRF, araşidonik asitin lipooksijenaz yolundaki ara ürün olarak değerlendirilmiştir. 1987 yılında ise, Ignarro ve arkadaşları (51) ile Palmer ve arkadaşları (52) ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda, EDRF' yi damar endotelinden izole etmişler ve bu yapının dominant kısmının NO olduğunu tespit etmişlerdir. Palmer ve arkadaşları, EDRF ile ilgili yaptıkları araştırmada, bu molekülün yarı ömrünün çok kısa olduğu, aktivitesinin saniyeler içinde oluşup, bir başka forma dönüşerek sona erdiği görülmüş ve bu yapının NO olduğu düşünülmüştür. 1988' de Moncada ve arkadaşları (53) EDRF ile NO'nun aynı bileşik olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmalarda NO'nun L-Argininden sentezlendiği görülmüş ve reaksiyonu gerçekleştiren enzime nitrik oksit sentaz (NOS) adı verilmiştir. NO, 1992 yılının Aralık ayında, Amerika' da "Science" dergisi tarafından yılın molekülü seçilmiştir. Furchgott, Ignarro ve Murad 1998'de NO ile ilgili çalışmalarıyla Nobel ödülü almıştır.

2.4.2. Biyosentezi

NO, L-arjininden; sitokrom p-450 redüktaz homologu olan, NOS olarak bilinen enzim ailesi tarafından, birbirinden bağımsız iki monooksijenizasyon reaksiyonu ile sentezlenir. Yan ürün olarak L-sitrüllin oluşur. Normalde L-Arjinin seviyesi sürekli salınan NO sentezi için yeterlidir. Bu reaksiyonun yan ürünü olan L-sitrüllin, bir azotla birleşerek tekrar L-Arjinine dönüşür ve bu suretle de L-Arjinin temin edilmiş olur (54-58). L-Arjinin'den NO sentezinde, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), kalmodulin, oksijen ve dört kofaktöre (hem, FMN=flavin

mononükleotid, FAD=flavin adenin dinükleotid ve BH4=tetrahidrobiopterin) gereksinim duyulduğu anlaşılmıştır (46, 55, 59, 60) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. NO biyosentezi NOS: nitrik oksit sentaz; FMN: flavin mononükleotid; FAD: flavin adenin dinükleotid; BH4: tetrahidrobiopterin; CAM: kalmodulin.

NO salınımına birçok etken neden olmaktadır bu nedenlerden bazıları şunlardır: Asetilkolin, histamin, adrenalin, serotonin, vazopressin, bradikinin, prostasiklin, VIP, P maddesi, kalsitonin geni ile ilişkili peptid, insulin, alfa - adrenerjik reseptörler, kalsiyum iyonoforları, akıma bağlı sürtünme stresi, pıhtılaşma sırasında oluşan trombin, trombosit agregasyonu sırasında aktive edilen trombositlerin salıverdikleri ATP ve ADP, oksitosin ve PAF.

2.4.3. Nitrik oksit sentez enziminin izoformları

Nitrik oksit sentezini katalizleyen NOS enzimlerinin iki temel izoformu bulunur:

a) konstitütif (cNOS)

b) indüklenebilir (iNOS)

İki çeşit konstitütif enzim bulunmaktadır. Bunlardan birisi endotelial NOS (eNOS), diğeri nöronal NOS (nNOS)'dur. eNOS ağırlıklı olarak zarsal bir enzimdir ve endotel kaynaklı gevşeme faktörünün (EDRF) sentezinden sorumludur. eNOS, iki globuler protein molekülünden oluşmaktadır (redüktaz ve oksijenaz segmentleri). Bu iki segment esnek protein yapısı ile birbirine bağlanmıştır. Oksijenaz segmenti, NO üretimi için gerekli olan katalitik merkezden oluşur. L-arjinin, tetrahidrobiopterini (BH4) bağlar. Redüktaz segmenti, NO sentezi için NADPH'a bağlanarak dehidrojenasyonu katalize etmek için gerekli olan elektronları üretir. Elektronlar esnek protein yapıdan oksijenaz segmentine transfer edilir. Bu elektron transferi kalmodulinin (CAM), esnek protein parçasındaki spesifik bağlanma bölgesine kalsiyum aracılığıyla bağlanmasıyla aktive edilir (61).

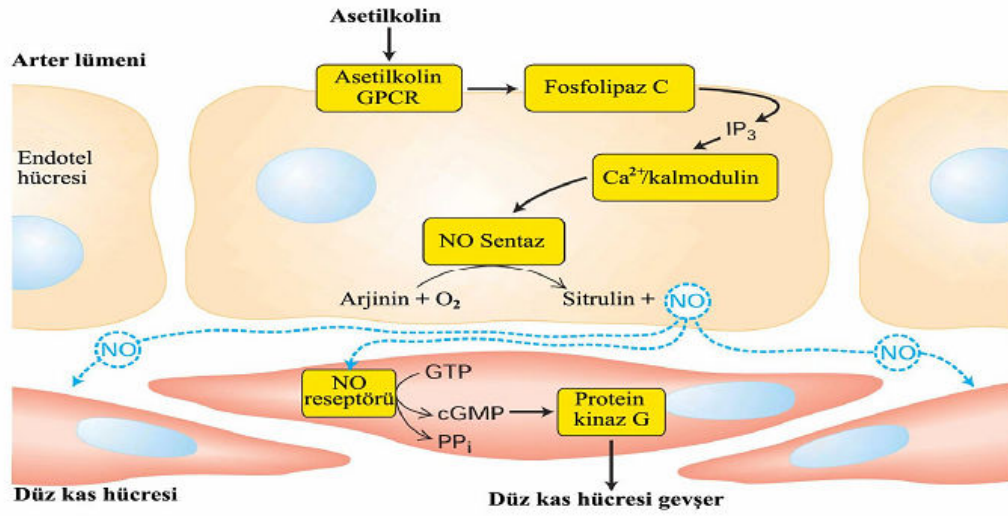
nNOS, MSS ve nöronlarda haberci molekül olarak kullanılan NO sentezinden sorumludur. Konstitütif enzimlerin aktiviteleri mutlak olarak Ca^{++} /kalmodulin bağımlıdır. NOS enzimlerinin indüklenebilir olan izoformu (iNOS, NOSIII) alt birim olarak kalmoduline ihtiyaç duyar. Aktivitesi için Ca^{++} 'a ihtiyaç yoktur. iNOS enziminin sentezini lipopolisakkaritler gibi çeşitli bakteriyel ürünler ile inflamatuvar sitokinler indüklerler (INF- γ , IL-1, IL-2, TNF- α gibi). iNOS sadece fagositik lökositlere özgü olmayıp uygun indüksiyonla tüm çekirdekli hücreler tarafından sentezlenebilir. NOS enzimlerinin aktiviteleri tamamıyla koenzimlere bağımlıdır ve NO sentezini katalizlemeleri için dimer yapı oluşturmaları gerekir. Bu enzimler alt birim başına FAD, FMN ve THB'e gereksinim duyarlar (52) (Tablo 2.6).

Tablo 2.6. Nitrik oksit sentezleyen enzimler ve temel özellikleri

NOS izoenzimi	Salınım	Kaynak	Regülasyon	NO miktarı
nNOS	Devamlı	Sinir hücreleri	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (pmol)
iNOS	Uyarıldığında	Makrofaj, damar düz kası, damar endoteli, miyokard, endokard, hepatosit, immün hücreler, hava yolu epiteli	Sitokinler, endotoksin ve oksidanlar tarafından indüklenme	Yüksek (nmol)
eNOS	Devamlı	Vasküler, endotel hücreleri, trombositler, miyokard ve endokard, mast hücreleri, nötrofiller	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (pmol)

2.4.4. Nitrik oksit etki mekanizması

NO endotel hücresi tarafından sentezlendikten sonra difüzyonla düz kas hücrelerine geçerek guanilat siklazı aktive edip cGMP seviyesini artırır. cGMP düz kas hücresi içindeki cGMP bağımlı protein kinazı aktive eder. Bunun sonucunda potasyum kanalları fosforile, Ca^{+2} kanalları hiperpolarize olur. Hücre içi Ca^{+2} miktarı azalır ve bu da düz kas hücresinde gevşemeye yol açar. NO, cGMP yolundan başka sodyum ve potasyum kanallarını doğrudan aktive ederek de vazodilatasyona katkıda bulunur (52, 61, 62) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Nitrik oksit etki mekanizması

2.5. Nitrik Oksit ve Ağrı

NO'nun ağrının algılanması sırasında nöronal yolların birçok seviyesinde rol oynadığı ve ağrının modülasyonunda önemli bir işlevi pek çok çalışmada kabul edilmekle birlikte, bunun hangi mekanizmalar aracılığıyla olduğu tam olarak açığa kavuşmamıştır (42, 43). NOS inhibitörlerinin antinosiseptif etkilerinin olduğunu, omurilik arka boynuzunda ağrılı impulsların NO tarafından potansiyelize edildiğini, öte yandan çeşitli bileşiklerin analjezik etkilerine NO'nun aracılık ettiğini ileri süren çalışmalar bulunmaktadır (63).

Mekanik, termal ve kimyasal hiperaljezinin mekanizmasına NO'nun katkıda bulunduğuna dair kanıtlar gittikçe artmaktadır (44, 64). L-Arjinin/NO/cGMP yolak

aktivatörleri ve inhibitörleri kullanılarak yapılan çalışmalarda NO'nun periferel dokulardaki L-Arjinin/NO/cGMP yolağında hem nosiseptif hem de antinosiseptif etki oluşturduğu gösterilmiştir (65). Dorsal kök hücrelerinde kutanöz veya viseral enflamasyon veya PAL hasarı sonucu veya NO donörleri veya inhibitörleri ile NO sentetazın aktive veya inhibe edilebildiği, bunun sonucunda da nosiseptif duyunun aktive veya inhibe edildiği gösterilmiştir. Ayrıca inflamatuvar doku hasarı veya PAL yaralanmasının C lifleri yolu ile dorsal kök hücrelerindeki NO sentetazı indüklediği gösterilmiştir (52, 62).

İmmünohistokimyasal çalışmalar sinir uçlarında ve spinal kanal dorsal boynuzunun süperfisya tabakalarının internöronlarında nNOS varlığını göstermiştir (66). L-arjinin analoglarının sistemik uygulaması nöropatik ve kimyasal ağrıya karşı antinosiseptif aktivite gösterir (44, 67). NOS inhibitörleri L-NAME ve L-NMMA, cGMP inhibitörü metilen mavisinin i.c.v. uygulaması opioidden bağımsız antinosiseptif etki oluşturur ve bu etki di-butiril-cGMP tarafından bloke edilir. Bu cGMP sisteminin nosiseptif informasyonun supraspinal transmisyonunda pozitif role sahip olduğunu gösterir (67). Bu sistemin spinal nosiseptif süreçteki rolü de davranışsal, elektro fizyolojik ve histokimyasal çalışmalarda gösterilmiştir (68). NOS inhibitörlerinin sistemik ve intratekal enjeksiyonunun formalin ve karregeninle oluşturulan hiperalejiye bağlı cevapları azalttığı bulunmuştur (67). Bunun aksine, bazı NOS inhibitörleri asetilkolin ve morfinin antinosiseptif etkisini önlemiştir (44, 68).

Periferel sinirlerin fonksiyonunda ve hastalıklarında NO önemli bir yere sahiptir. Spinal kordun dorsal boynuzunda afferent ağrı iletiminde ve nitrejik innervasyon ile otonomik kontrolde yer alır. NO periferel sinir sisteminin Wallerian dejenerasyonunda veya rejeneratif olaylarda sentezlenir. Sinirlere olan kan akımındaki etkilerinden dolayı NO hasarı takiben mikrovasküler değişikliklerde ve ayrıca akson ve myelin yıkımında ve rejenerasyon öncesi temizlikte yer almaktadır. NO bu süreç içerisinde nöropatik ağrının gelişiminde rol oynar. Enflamasyon sırasında ortaya çıkan aşırı miktardaki NO aksonlara ve sinir rejenerasyonu için gerekli gelişme konilerine zarar verebilir. Düşük dereceli kronik artışlar ise diyabette periferel sinir hasarı ve nöropatiye sebep olabilir (69).

Bir NO substratı olan L-Arjinin'in hiperaljezik ağrı modellerinde, antinosiseptif etkisini gösteren çalışmalar yanında, nosiseptif etkisinden söz eden çalışmalar da bulunmaktadır. Ayrıca, NMDA reseptörlerinin (64) ve periferik uygulanan L-Arjinininin hiperaljezi üzerine, doz bağımlı bifazik (nosisepsiyon ve antinosisepsiyon şeklinde) etkileri olduğunu gösteren çalışmalarda vardır (70, 71).

NMDA reseptörlerinin aktivasyonu nitrik oksit sentazı (NOS) aktive eder ve NO oluşur. Prostaglandinler ve NO medulla spinaliste uyarıcı aminlerin serbestleşmesini sağlar (72). Poliartritli rat modelinde NOS inhibitörlerinin ağrı ve enflamasyon üzerine olan etkilerini araştıran bir çalışma da, NO'nun mekanik değil ama termal duyu yollarında etkili olduğunu ve uyarılmış NOS aktivasyonunun selektif inhibisyonunun, oluşturulmuş enflamasyonu arttırdığını bildirilmiştir (67). Bu mediyatörün düşük konsantrasyonları hemostatik rol oynarken, büyük konsantrasyonları patolojik olur ve yıkıcı etki taşır.

Birçok çalışma L-arjinin/NO/cGMP yolağının morfinin (67) ve bazı NSAİİ'lerin (73) antinosiseptif etkisinde rolü olduğunu göstermektedir. Yapılan araştırmalarda, per oral (p.o) ve intraperitoneal (i.p) L-arjinin uygulamasının hot-plate, tail-flick ve abdominal kontraksiyon testinde doza bağımlı olarak morfinin antinosiseptif etkisini azalttığı ve bu etkinin L-NAME'in uygun dozuyla geri çevrilebileceği gösterilmiştir (67). Morfinin oluşturduğu antinosisepsiyonun L-arjinin tarafından azaltılması, etkide NO'nun rolünün olduğunu düşündürmektedir. Bu hipotez NO'nun substratı olmayan D-Arjinin ve de NO sentazı inhibe etmeyen NG-nitro-D-Arjinin-metil-ester (D-NAME)'in morfinin antinosiseptif etkisini değiştirmemiş olması ile desteklenmektedir (71). Bir başka çalışmada, L-NAME ve NSAİİ'lardan flurbiprofen ve indometazin'in farelerde sinerjistik antinosiseptif etki oluşturduğu gösterilmiştir (66). Buna karşın, diğer bir çalışmada da insan ve deney hayvanlarında analjezik etkisi olduğu kanıtlanmış non-kompetif NMDA reseptör blokörü anestezi bir madde olan ketaminin antinosiseptif etkisi L-NAME tarafından bloke edilmiştir (74).

2.6. Nitrik Oksit ve Morfin

Akut ve kronik morfin tedavisi fare beyinde Ca^{+2} bağımlı NOS miktarında artış yapmıştır ve morfinin akut etkisi naloksan eklenmesiyle bloke edilmiştir (65). Sıçan spinal kordunda, morfinin tekrarlı uygulanması NOS mRNA seviyesini yükseltmiştir. Aynı zamanda NOS pozitif hücre sayısı ve NOS immunoreaktivitesi yoğunluğu artmıştır. Bu çalışmanın sonunda araştırmacılar, tekrarlayan morfin uygulanmasının NOS biyosentezini artırdığı kanısına varmışlardır (109). Morfinin 25 mg pelletler halinde 24 saatlik tedavisinin ardından fare beyininin tüm bölgelerinde ve spinal kordunda NOS aktivitesinde azalma görülmüştür. Fakat 48–72 saatlik uygulamadan sonra hem serebellumda hem de kortekste NOS aktivitesi artmıştır. Morfin pelletinin yanında naltrekson pelletinde uygulanması NOS aktivitesindeki bu değişiklikleri engellemiştir (75). Bu çalışmadaki NOS aktivitesindeki azalma artmış motor aktiviteye, artma ise tolerans veya fiziksel bağımlılık gelişmesine bağlanmıştır.

Morfinin santral analjezik etkisi tail flick ve pençe çekme testlerinde metilen mavisinin intraserebroventriküler uygulanması ile inhibe edilmiş ve bir cGMP fosfodiesteraz inhibitörü tarafından artırılmıştır. Fakat bu etki NOS inhibitörleri L-NMMA ve N-iminoetil-L-ornitin tarafından bloke edilmemiştir (76, 77). Bu nedenle NO salınımından bağımsız olarak cGMP sisteminin aktive edilmesinin morfinin santral analjezik etkisinde rolünün olabileceği belirtilmiştir. İntraserebroventriküler olarak uygulanan L-NA morfin analjesini ortadan kaldırmıştır ve aynı yolla uygulanan L-Arjinin morfinin analjezik etkisini artırmıştır. Bu sonuçlar NO sentezinin morfin analjesisini artırabileceği sonucuna bağlanmıştır (78). Yapılan bir başka çalışmada Javanmerdi ve arkadaşları mezensefalik morfin antinosisepsiyonunun, MK-801 ve L-NAME'in ratların rostral ventromedial medullasına mikroenjeksiyonuyla azaldığını bulmuşlardır. Bu azalmada, bu maddelerin tek başına uygulanmasından farklı bulunmamıştır ve araştırmacılar bunu rostral ventromedial medulladaki NMDA reseptörleri ve NO oluşumunun periakuaduktal gri cevherden çıkan opioid ağrı inhibitör sinyallerinin düzenlenmesine bağlamışlardır (79).

Ayrıca, L-NAME farelerde belki de beyindeki direkt etkisine bağlı olarak opioidden bağımsız olarak antinosisepsiyon oluşturmuştur (80). Uyanık köpeklerde

yapılan bir çalışmada L-NA veya morfin dördüncü ventrüküle verilmiş ve nosiseptif eşiği artırdıkları gözlenmiştir. Bu iki maddenin kombinasyon halinde verilmesi morfinin tek başına verilmesinden daha güçlü bir antinosiseptif etki göstermiştir ve supraspinal bölgelerdeki endojen NO'nun bir nosiseptif mediyatör olarak rol oynadığı kanısına varılmıştır (81). Bhargava ve arkadaşları L-Arjinini kronik olarak intraperitoneal yolla vermişler ve beyin NOS aktivitesini artırarak ve morfin konsantrasyonunu fare beyninin ve spinal kordunun belli bölgelerinde azaltarak morfinin antinosiseptif etkisini azalttığını bulmuşlardır (82). L-Arjinin uygulanmasıyla NO sisteminin akut aktivasyonu morfin antinosisepsiyonunu hafifletmiştir. Bu etki santral bölgelerde (orta beyin ve spinal kord) morfinin uptakeinin azaltılmasına bağlanmıştır (83).

Farelerde subkutanöz morfinin analjezik etkisi 5 günlük uygulamadan sonra ortadan kalkmıştır ve L-NA'nın morfine eklenmesi tolerans gelişimini en az 11 gün engellemiştir (84). NMDA reseptör antagonisti MK-801 in morfine tolerans gelişmesinin engellenmesi NMDA reseptörleri aktivasyonunun neticesinde NO salınımına bağlanmıştır. Kompetitif ve non kompetitif NMDA reseptör antagonistlerinin ve L-NA'nın morfin toleransını engellediğine dair çalışmalarda mevcuttur (85). L-NA veya L-NAME in morfinle birlikte uygulanması morfine tolerans gelişimini engellemiş ve farelerde morfin bağımlılığının bazı bulgularını hafifletmiştir (86). Bunların aksine bovin laktoferrinin (BLF) morfinle birlikte uygulanması farelerde morfin tolerans gelişmesini geciktirmiştir ancak BLF'nin bu etkisi L-NAME veya metilen mavisi ile kısmen 7-NI ile ise tamamen ortadan kalkmıştır. Bu sonuçta BLF'nin morfine tolerans gelişimini nNOS'un selektif aktivasyonu ile yapabileceğine bağlanmıştır (87).

Ağrı ve nitrik oksit arasındaki ilişki konusunda yapılan çalışmalar oldukça çelişkilidir ve henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca morfinin analjezik etkisine NO'nun etkisi ve morfine karşı gelişen tolerans mekanizması ve bu mekanizmada nitrik oksitin rolü için de aynı durum söz konusudur. Bu nedenle bu çalışmada ağrı mekanizmasında, morfinin analjezik etkisinde ve morfine karşı gelişen toleransta NO'nun rolünü tail flick ve hot plate testlerini kullanarak araştırmayı amaçladık.

BÖLÜM III

ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanlarının Seçilmesi

Bu çalışmada Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarından temin edilen her iki cinsten ortalama 200–250 gr ağırlığında 150 adet Albino Wistar cinsi sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar 12:12 saat aydınlık/karanlık siklusuna uyularak, 22 ± 3 °C sıcaklıkta ve % 65–70 nem içeren bir ortamda plastik kafeslerde barındırılmıştır. Standart laboratuvar yemiyle sınırsız beslenmişler ve su alımları serbest bırakılmıştır. Hayvanlar “Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanım İlkeleri”ne uygun koşullarda barındırılmış ve deneyler için Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulundan onay alınmıştır. Tüm deneyler saat 10.00 ve 14.00 saatleri arasında yapılmıştır.

3.2. Deney Düzeni

Çalışmamızda kullanılan hayvanlar randomize olarak 10'arlı 15 gruba ayrıldı (Tablo 3.1):

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan gruplar

Uygulanan madde	Ver. yolu	Sayı (n)
Serum fizyolojik	ip	10
Yalnız morfin (5 mg/kg)	ip	10
Yalnız L-NAME (25 mg/kg)	ip	10
Yalnız NOC-18 (0,4 mg/kg)	ip	10
Yalnız BAY 41-2272 (4 mg/kg)	ip	10
Yalnız SIN-1 (0,4 mg/kg)	ip	10
Morfin (5 mg/kg) + L-NAME (25 mg/kg)	ip	10
Morfin (5 mg/kg) + NOC-18 (0,4 mg/kg)	ip	10
Morfin (5 mg/kg) + BAY 41-2272 (4 mg/kg)	ip	10
Morfin (5 mg/kg) + SIN-1 (0,4 mg/kg)	ip	10
Morfine tolerans geliştirilen grupta morfin (5 mg/kg)	ip	10
Tolerans geliştirilirken beraberinde L-NAME (25 mg/kg) verilen grupta morfin (5 mg/kg)	ip	10
Tolerans geliştirilirken beraberinde NOC-18 (0,4 mg/kg) verilen grupta morfin (5 mg/kg)	ip	10
Tolerans geliştirilirken beraberinde BAY 41-2272 (4 mg/kg) verilen grupta morfin (5 mg/kg)	ip	10
Tolerans geliştirilirken beraberinde SIN-1 (0,4 mg/kg) verilen grupta morfin (5 mg/kg)	ip	10

3.3. Kimyasal Maddeler ve Uygulanışı

Tüm ilaçlar (BAY 41-2272 hariç) distile suda çözüldü ve her deney için günlük hazırlandı. BAY 41-2272 dimetilsülfoksit'de (DMSO) çözüldü (Tablo 3.2). Sadece DMSO verilerek yapılan tail flick ve hot plate ölçümlerinde bu maddenin herhangi bir etkisinin olmadığı gösterildi. Bütün kimyasal maddeler 0,5 ml çözücü içinde çözülerek intraperitoneal olarak verildi. Kullanılan kimyasal maddelerin dozlarına pilot çalışmalar yapılarak karar verildi.

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve özellikleri

Madde	Kimyasal adı	Etki	Çözücü
Morfin HCl	-	Narkotik analjezik	% 0.9'luk izotonik NaCl çözeltisi
L-NAME	<i>N</i> _ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride	NOS inhibitörü	% 0.9'luk izotonik NaCl çözeltisi
NOC-18	3,3-bis(Aminoethyl)-1-hydroxy-2- oxo-1-triazene	NO donörü	% 0.9'luk izotonik NaCl çözeltisi
BAY 41- 2272	3-(4-Amino-5-cyclopropyl- pyrimidin -2 -yl)-1-(2-fluoro- benzyl)-1H-pyrazolol [3,4- b]pyridine	Guanilat siklaz aktivatörü	DMSO
SIN-1	5-Amino-3-morpholinyl-1,2,3- oxadiazolium chloride	NO donörü ve guanilat siklaz aktivatörü	% 0.9'luk izotonik NaCl çözeltisi

3.4. Akut Analjezi Değerlendirmesi

3.4.1. Tail flick testi

İlaç uygulamasından bir gün önce tüm denekler ölçüm yapılmaksızın tail-flick cihazına (May TF 0703 Tail.Flick Unit Commat, Ankara,Türkiye) yerleştirilerek öğrenme alıştırmaları yapıldı. Termal stimülasyon kuyruğun 3 cm distali işaretlenerek yapıldı. Stimülasyonun başlaması ve kuyruk çekilmesi arasındaki zaman kuyruk çekme (tail-flick) süresi olarak ölçüldü (Resim 3.1). Kuyruğun yaralanmasını engellemek için cevap alınmadığındaki zaman (cut-off zamanı) 14,9 saniyeye ayarlandı. Morfin (5 mg/kg), L-NAME (25 mg/kg), NOC-18 (0,4 mg/kg), BAY 41-2272 (4 mg/kg), SIN-1 (0,4 mg/kg) uygulamasından önce 0. dakikada (bazal) üç ölçüm ve uygulamadan sonraki 15, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda iki ölçüm yapıldı. Ölçümlerin ortalaması kaydedildi.



Resim 3.1: Tail flick testinin uygulanışı

3.4.2. Hot-plate testi

İlaç uygulamasından bir gün önce tüm denekler ölçüm yapılmaksızın hot plate cihazına (May AHP 0603 Analgesic Hot Plate Commat, Ankara, Türkiye) yerleştirilerek öğrenme alıştırmaları yapıldı. Eğer hayvan 60 saniyede cevap vermiyorsa, cut-off kabul edilerek plakadan alındı. Tail flick ölçümleri yapıldıktan 1 dakika sonra tüm hayvanlarda aynı aralıklarla hemen hot plate ölçümleri yapıldı. Hayvanların arka ayağını yalama/sıçrama süresi kronometre yardımıyla ölçülerek kaydedilerek ölçümlerin ortalaması alınmıştır (Resim 3.2).



Resim 3.2: Hot plate testinin uygulanışı

3.5. Morfine Tolerans Geliştirilmesi ve Tolerans Gelişimine Maddelerin Etkilerinin Değerlendirilmesi

Morfine karşı tolerans geliştirmek için günde 20 mg/kg morfin ikiye bölünerek 5 gün boyunca intraperitoneal olarak verilmiştir (44). Altıncı gün sabah 5 mg/kg morfin verilerek tail flick ve hot plate ölçümleri yapılarak tolerans gelişimi değerlendirilmiştir. Morfine gelişen toleransa etkilerini araştırmak için günlük verilen morfin dozlarından 20 dakika önce L-NAME (25 mg/kg), NOC-18 (0,4 mg/kg), BAY 41-2272 (4 mg/kg), SIN-1 (0,4 mg/kg) intraperitoneal olarak verilmiş ve yine altıncı gün tail flick ve hot plate ölçümleri yapılmıştır.

3.6. Deney Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirmesi

Elde edilen değerler SPSS 15.0 istatistik programına aktarılarak ilaçların etkinliğini kontrol grubu ile ve kendi aralarında karşılaştırabilmek için iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ve takiben Tukey HSD testi kullanıldı. Bütün değerler ortalama \pm SD olarak belirlendi. Tüm grafikler GraphPad Prism 5.0 programı yardımıyla çizildi. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BÖLÜM IV

BULGULAR

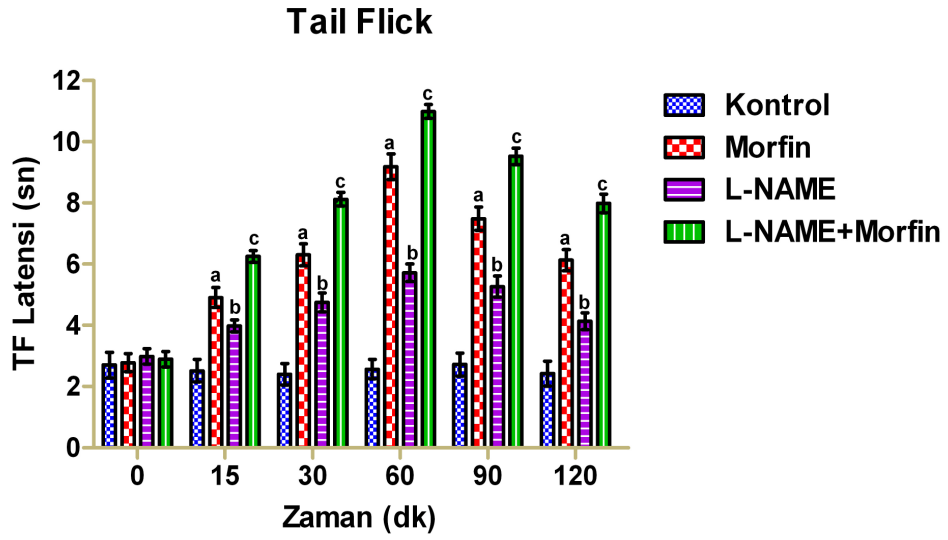
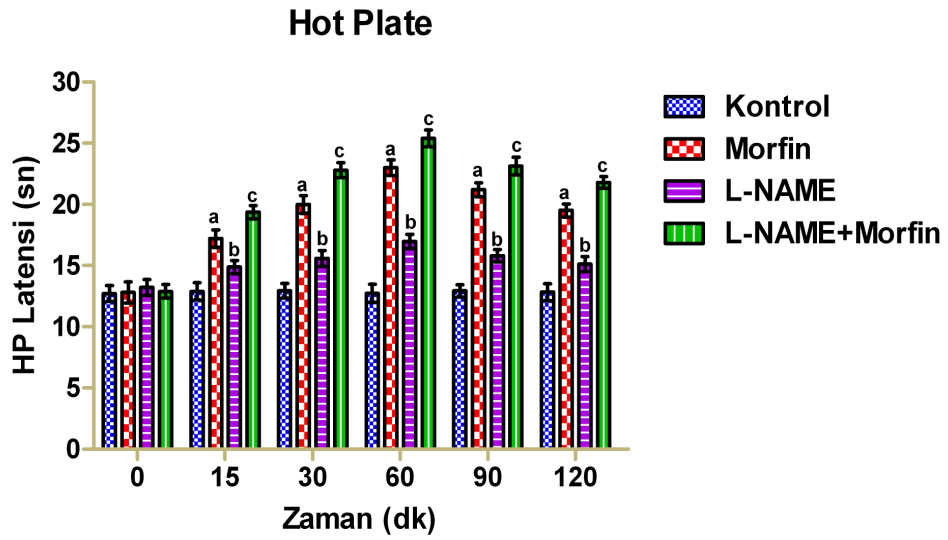
4.1. Kontrol ve Morfin Grubunun Karşılaştırılması

Morfin (5 mg/kg) hem tail flick hem de hot plate testlerinde kontrol grubuna göre anlamlı olarak analjezi oluşturdu ($p<0.05$). Morfinin oluşturduğu bu analjezi 15. dakikadan itibaren görülmeye başlandı ve maksimum seviyeye 60. dakikada ulaştı. Bu analjezik etki 60. dakikadan sonra 90. ve 120. dakikalarda azaldı (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4).

4.2. L-NAME'in Tek Başına ve Morfinle Kombinasyonunun Etkileri

Bir non spesifik NOS inhibitörü olan L-NAME, tek başına 25 mg/kg uygulandığında tail flick ve hot plate testlerinde 15. dakikadan itibaren kontrol grubuna göre anlamlı analjezi oluşturdu ($p<0.05$). Bu etki 60. dakikada maksimuma ulaşırken bu dakikadan sonra 90. ve 120. dakikalarda azaldı. L-NAME'in tek başına uygulandığı gruptaki analjezik etki kontrol grubuna göre tüm dakikalarda anlamlı olarak fazla iken morfinin tek başına uygulandığı gruba göre ise anlamlı olarak azdı ($p<0.05$) (Şekil 4.1A).

L-NAME (25 mg/kg), morfinle (5 mg/kg) kombine olarak verildiğinde her iki testte de morfinin yaptığı etkiyi artırdı. L-NAME + morfinin yaptığı analjezik etki hem L-NAME hem de morfinin tek başına uygulandığı gruplara göre anlamlı olarak fazlaydı ($p<0.05$). L-NAME + morfin grubunda analjezik etkide görülen artış, 15. dakikadan itibaren istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Maksimum etkiyi ise 60. dakikada yaptı ve tıpkı morfin ve L-NAME'in tek başına uygulandıkları gruplardaki gibi analjezik etki 90. ve 120. dakikalarda 60. dakikaya göre azaldı (Şekil 4.1B).

A**B**

Şekil 4.1: L-NAME'in (25 mg/kg) tek başına ve morfinle (5 mg/kg) birlikte verildiğinde tail flick ve hot plate testlerinde gösterdiği etki.

^a Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$).

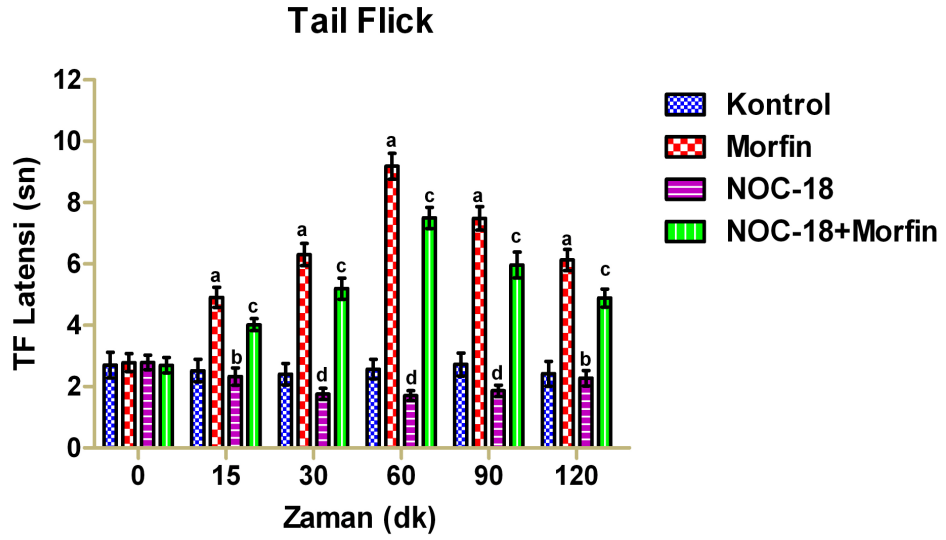
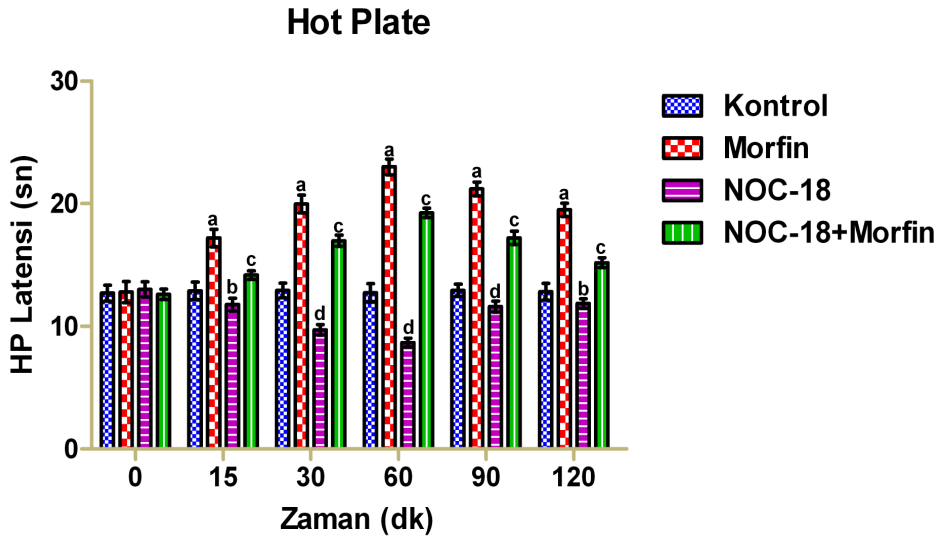
^b Kontrol ve morfin gruplarına göre istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$).

^c Tüm gruplara göre istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$).

4.3. NOC-18'in Tek Başına ve Morfinle Kombinasyonunun Etkileri

Bir nitrik oksit donörü olan NOC-18, tek başına 0,4 mg/kg uygulandığında 15. dakikadan itibaren tail flick ve hot plate latenslerini kısalttı ancak 15. dakikadaki kısalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildi. NOC-18, 30. dakikadan itibaren hem tail flick hem de hot plate testlerinde anlamlı bir hiperaljezi yaptı ($p<0.05$). Bu hiperaljezi 60. dakikada maksimum seviyeye ulaştı ve 90. dakikada azalmaya başladı. NOC-18'in yaptığı tail flick ve hot plate latensleri 120. dakikada yine kontrol grubuna göre kısa olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi. L-NAME'in tek başına uygulandığı gruptaki analjezik etki kontrol grubuna göre tüm dakikalarda anlamlı olarak fazla iken morfinin tek başına uygulandığı gruba göre ise anlamlı olarak azdı (Şekil 4.2A).

NOC-18 (0,4 mg/kg), morfinle (5 mg/kg) kombine edildiğinde morfinin analjezik etkisini anlamlı olarak azalttı ($p<0.05$). NOC-18 + morfinin analjezik etkisi hem morfinin tek başına uygulandığı grup hem de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklıydı ($p<0.05$). NOC-18 + morfinin analjezik etkisi 15. dakikadan itibaren artmaya başladı ve etkinin en fazla olduğu zaman 60. dakikaydı ancak bu etki morfinin tek başına uygulandığında gösterdiği analjezik etkiden anlamlı derecede azdı ($p<0.05$). NOC-18 + morfinin analjezik etkisi tıpkı morfinin tek başına uygulandığı grupta olduğu gibi 90. ve 120. dakikalarda azaldı (Şekil 4.2B).

A**B**

Şekil 4.2: NOC-18'in (0,4 mg/kg) tek başına ve morfinle (5 mg/kg) birlikte verildiğinde tail flick ve hot plate testlerinde gösterdiği etki.

^a Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı (p<0.05)

^b Morfin grubuna göre istatistiksel olarak farklı (p<0.05)

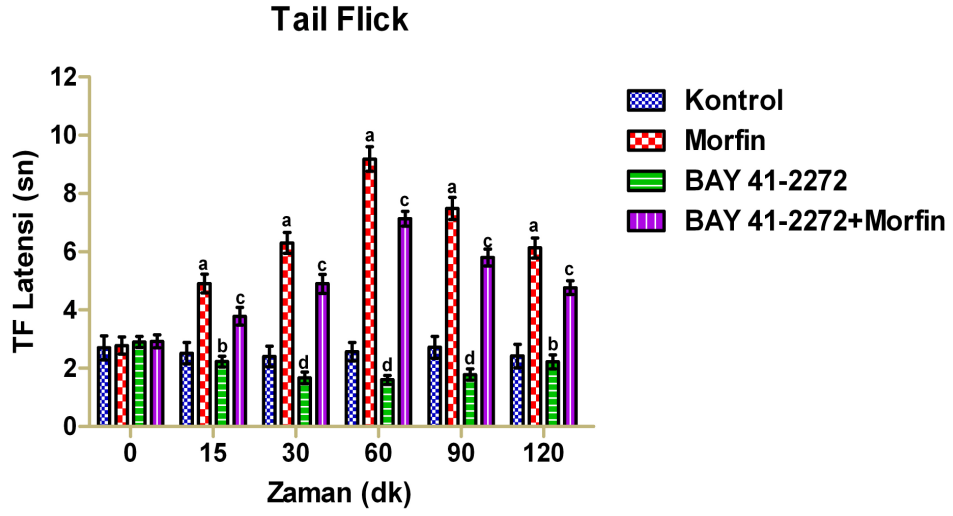
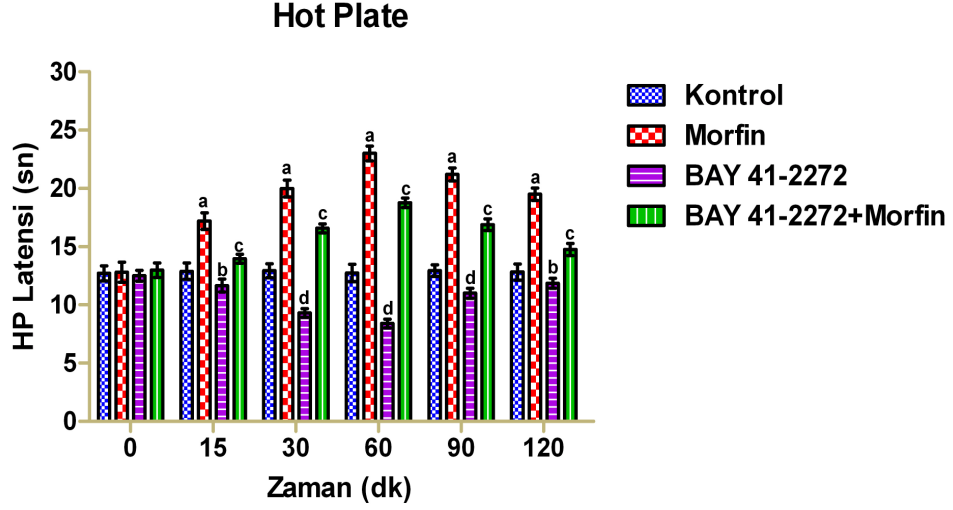
^c Tüm gruplara göre istatistiksel olarak farklı (p<0.05)

^d Kontrol ve morfin gruplarına göre istatistiksel olarak farklı (p<0.05)

4.4. BAY 41-2272'nin Tek Başına ve Morfinle Kombinasyonunun Etkileri

Bir guanilat siklaz aktivatörü olan BAY 41-2272, tek başına 4 mg/kg dozunda uygulandığında 15. dakikadan itibaren tail flick ve hot plate latenslerini kısalttı ancak 15. dakikadaki azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildi. BAY 41-2272, 30. dakikadan itibaren hem tail flick hem de hot plate testlerinde anlamlı bir hiperaljezi yaptı ($p<0.05$). Bu hiperaljezi 60. dakikada maksimum seviyeye ulaştı ve 90. dakika azalmaya başladı. BAY 41-2272'in yaptığı tail flick ve hot plate latensleri 120. dakikada yine kontrol grubuna göre kısa olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4.3A).

BAY 41-2272 (4 mg/kg), morfinle (5 mg/kg) kombine edildiğinde morfinin analjezik etkisini anlamlı olarak azalttı ($p<0.05$). BAY 41-2272 + morfinin analjezik etkisi hem morfinin tek başına uygulandığı grup hem de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklıydı ($p<0.05$). BAY 41-2272 + morfinin analjezik etkisi 15. dakikadan itibaren artmaya başladı ve etkinin en fazla olduğu zaman 60. dakikaydı ancak bu etki morfinin tek başına uygulandığında gösterdiği analjezik etkiden anlamlı derecede azdı ($p<0.05$). BAY 41-2272 + morfinin analjezik etkisi tıpkı morfinin tek başına uygulandığı grupta olduğu gibi 90. ve 120. dakikalarda azaldı (Şekil 4.3B).

A**B**

Şekil 4.3: Bay 41-2272'nin (4 mg/kg) tek başına ve morfinle (5 mg/kg) birlikte verildiğinde tail flick ve hot plate testlerinde gösterdiği etki.

^a Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$)

^b Morfin grubuna göre istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$)

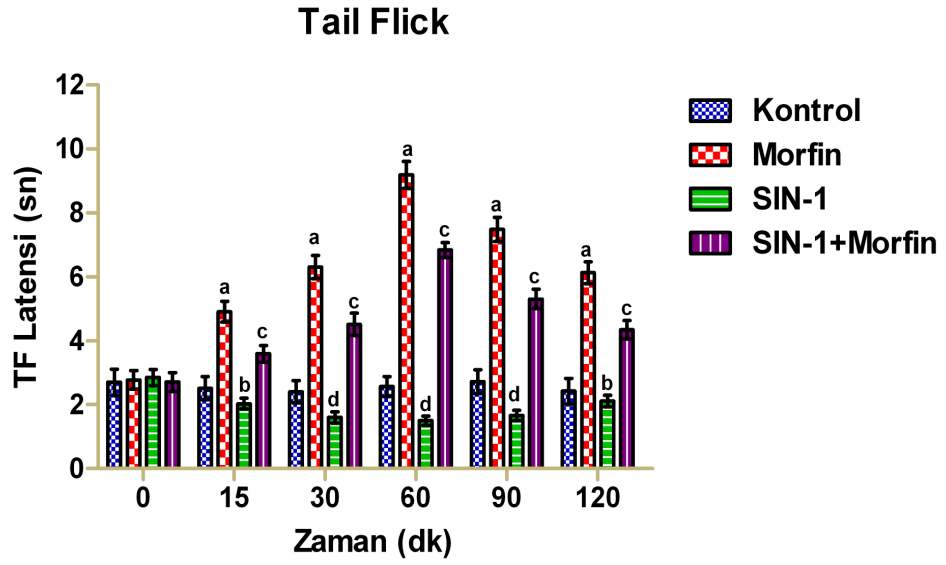
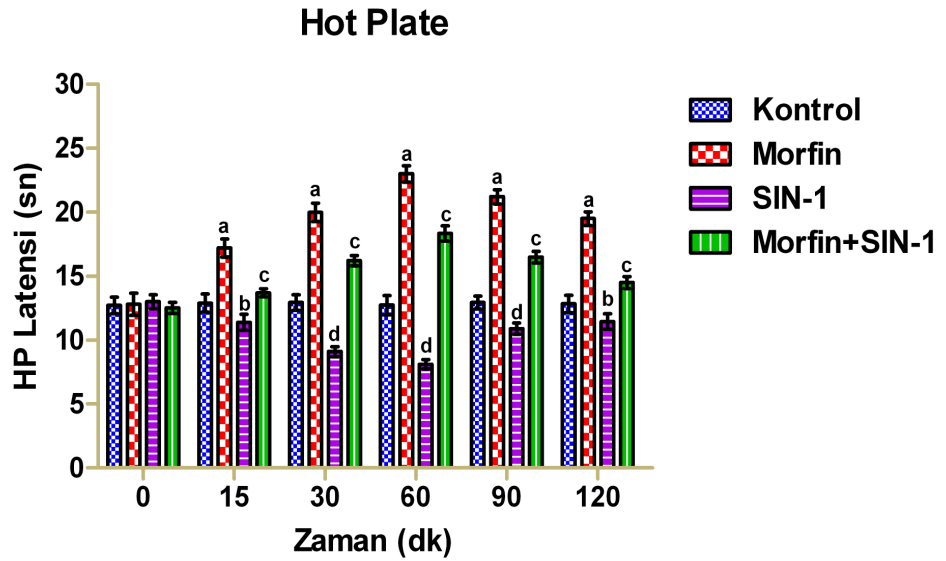
^c Tüm gruplara göre istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$)

^d Kontrol ve morfin gruplarına göre istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$)

4.5. SIN-1'in Tek Başına ve Morfinle Kombinasyonunun Etkileri

Bir guanilat siklaz aktivatörü ve aynı zamanda NO donörü olan SIN-1, tek başına 0,4 mg/kg uygulandığında 15. dakikadan itibaren tail flick ve hot plate latenslerini kısalttı ancak 15. dakikadaki kısalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildi. SIN-1, 30. dakikadan itibaren hem tail flick hem de hot plate testlerinde anlamlı bir hiperaljezi yaptı ($p<0.05$). Bu hiperaljezi 60. dakikada maksimum seviyeye ulaştı ve 90. dakikada azalmaya başladı. SIN-1'in yaptığı tail flick ve hot plate latensleri 120. dakikada yine kontrol grubuna göre kısa olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4.4A).

SIN-1 (0,4 mg/kg), morfinle (5 mg/kg) kombine edildiğinde morfinin analjezik etkisini anlamlı azalttı ($p<0.05$). SIN-1 + morfinin analjezik etkisi hem morfinin tek başına uygulandığı grup hem de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklıydı ($p<0.05$). SIN-1 + morfinin analjezik etkisi 15. dakikadan itibaren artmaya başladı ve etkinin en fazla olduğu zaman 60. dakikaydı ancak bu etki morfinin tek başına uygulandığında gösterdiği analjezik etkiden anlamlı derecede azdı ($p<0.05$). SIN-1 + morfinin analjezik etkisi tıpkı morfinin tek başına uygulandığı grupta olduğu gibi 90. ve 120. dakikalarda azaldı (Şekil 4.4B).

A**B**

Şekil 4.4: SIN-1'in (0,4 mg/kg) tek başına ve morfinle (5 mg/kg) birlikte verildiğinde tail flick ve hot plate testlerinde gösterdiği etki.

^a Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı (p<0.05)

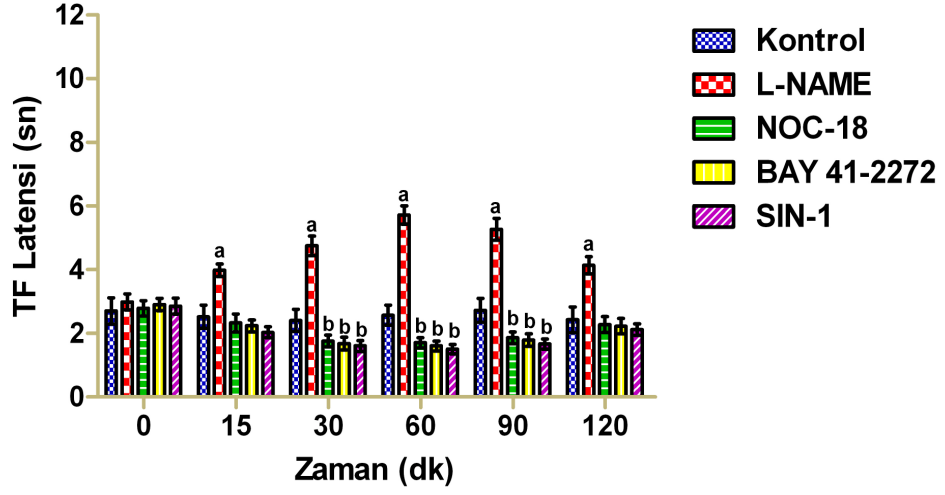
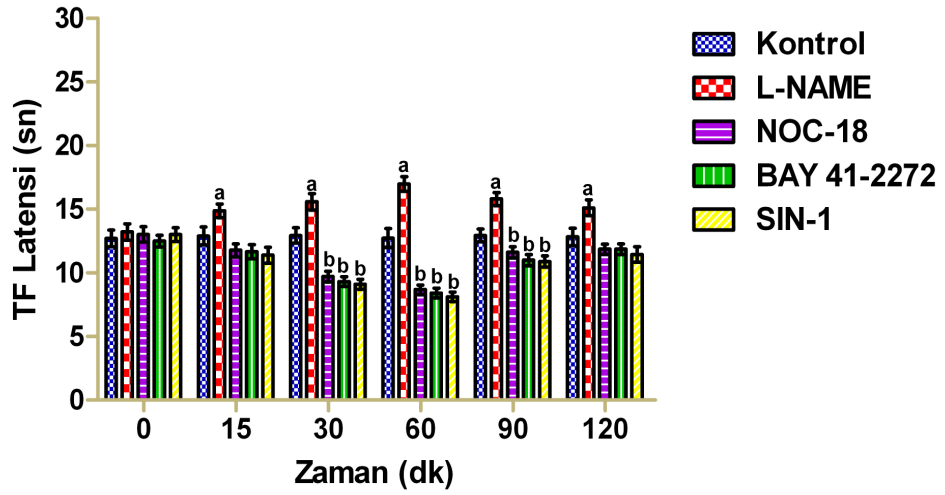
^b Morfin grubuna göre istatistiksel olarak farklı (p<0.05)

^c Tüm gruplara göre istatistiksel olarak farklı (p<0.05)

^d Kontrol ve morfin gruplarına göre istatistiksel olarak farklı (p<0.05)

4.6. L-NAME, NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1'in Etkilerinin Kontrol Grubu ve Birbirleriyle Karşılaştırılması

L-NAME (25 mg/kg), kontrol grubu, NOC-18 (0,4 mg/kg), BAY 41-2272 (4 mg/kg) ve SIN-1 (0,4 mg/kg) gruplarıyla karşılaştırıldığı zaman, hem tail flick hem de hot plate testlerinde anlamlı olarak analjezi oluşturdu ($p<0.05$). L-NAME'in oluşturduğu bu analjezi tüm ölçüm dakikalarında anlamlıydı ($p<0.05$). L-NAME'in maksimal analjezik etkisi 60. ölçüm dakikasında görülürken, bu etki 90. ve 120. dakikalarda göreceli olarak azaldı. NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1, 15. ve 120. dakikalar hariç kontrol grubuna göre anlamlı olarak tail flick ve hot plate latenslerini kısalttılar ve hiperaljezi oluşturdular ($p<0.05$) Üç maddeninde maksimal hiperaljezik etkileri 60. ölçüm dakikasında görüldü. Tail flick ve hot plate latenslerindeki kısalma SIN-1'de en fazla iken NOC-18'de en azdı. Ancak bu üç madde arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.5A ve B).

A**Tail Flick****B****Hot Plate**

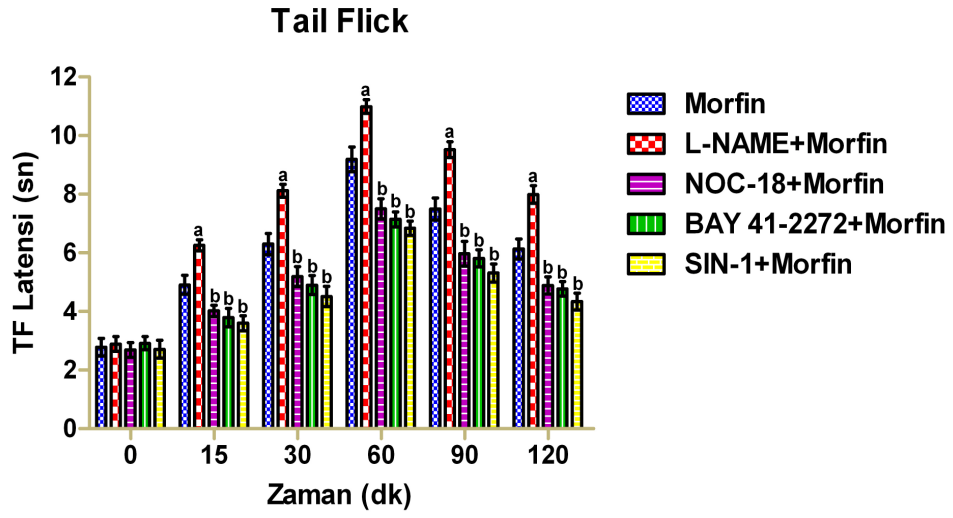
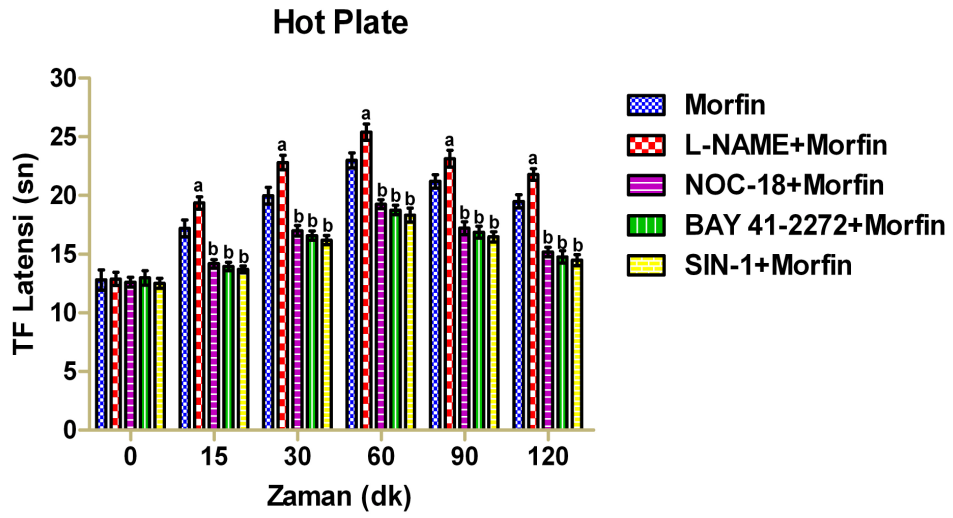
Şekil 4.5: L-NAME, NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1'in etkilerinin kontrol grubu ve birbirleriyle karşılaştırılması

^a Tüm gruplara göre istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$)

^b Kontrol grubuna istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$)

4.7. L-NAME, NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1'in Morfinle Kombinasyonlarının Etkilerinin Yalnız Morfin Grubu ve Birbirleriyle Karşılaştırılması

L-NAME (25 mg/kg)'ın 5 mg/kg morfinle kombinasyonu yalnız morfin uygulanan grup ve NOC-18 (0,4 mg/kg), BAY 41-2272 (4 mg/kg) ve SIN-1 (0,4 mg/kg) 'ın morfin kombinasyonlarıyla karşılaştırıldığında hem tail flick hem de hot plate testlerinde tüm ölçüm dakikalarında anlamlı olarak analjezi oluşturdu ($p < 0.05$). L-NAME + morfinin maksimal analjezik etkisi 60. ölçüm dakikasında görülürken, bu etki 90. ve 120. dakikalarda göreceli olarak azaldı. NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1 morfinle kombine edildiğinde morfinin yalnız başına uygulandığı gruba göre tail flick ve hot plate latenslerini anlamlı olarak tüm ölçüm dakikalarında kısalttı. Bu kısalma SIN-1 + morfin kombinasyonunda en fazla iken NOC-18 + morfin kombinasyonunda en azdı. Ancak bu üç maddenin morfin kombinasyonları arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.6A ve B).

A**D**

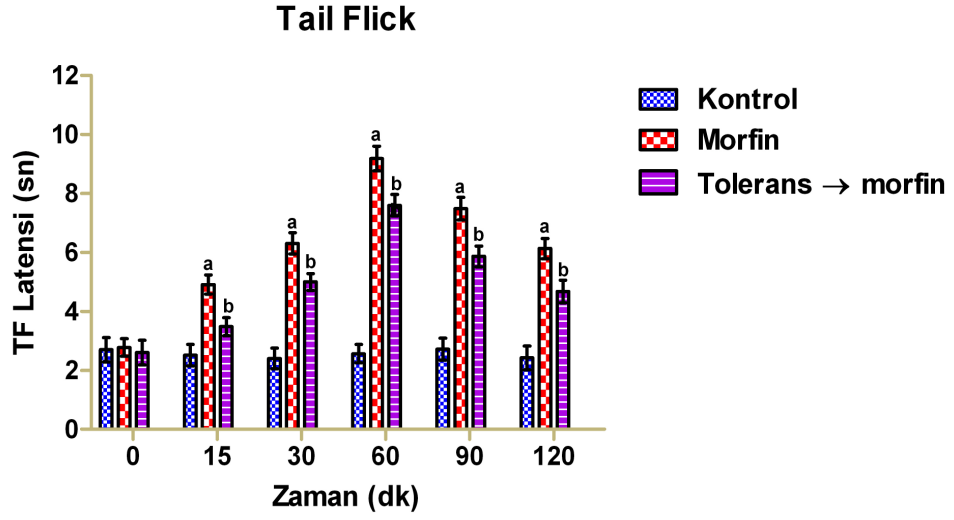
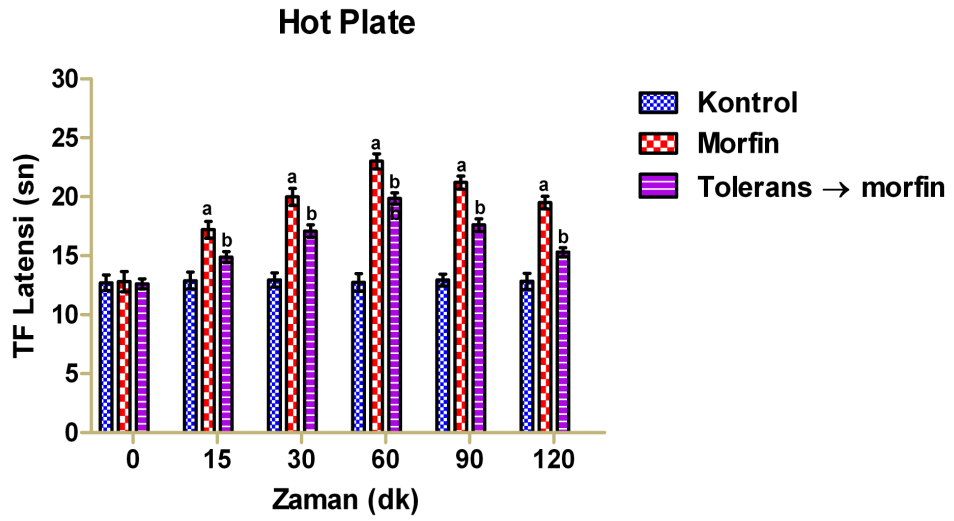
Şekil 4.6: L-NAME, NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1'in morfinle kombinasyonlarının etkilerinin yalnız morfin grubu ve birbirleriyle karşılaştırılması.

^a Tüm gruplara göre istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$)

^b Kontrol grubuna istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$)

4.8. Morfine Karşı Tolerans Geliştirilen Grupta Morfinin Etkisi

Morfin tek başına 5 mg/kg uygulandığında tüm ölçüm dakikalarında kontrol grubuna göre tail flick ve hot plate latenslerini anlamlı olarak uzattı ($p<0.05$). Bu artış en fazla 60. dakikadaydı ve 90. ve 120. dakikalarda 60. dakikaya göre azaldı. Morfine karşı tolerans geliştirilen grupta ise mg/kg morfin yine analjezik etki oluşturdu ancak bu etki tolerans gelişmemiş gruba göre anlamlı olarak azdı ($p<0.05$). Yine de oluşan bu analjezik etki tüm ölçüm dakikalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak fazlaydı ($p<0.05$). Tolerans geliştirilen grupta da maksimum analjezik etki yine 60. dakikada görüldü ve tail flick ve hot plate latensleri 90. ve 120. dakikalarda 60. dakikaya göre kısaldı (Şekil 4.7A ve B).

A**B**

Şekil 4.7: Morfine karşı tolerans geliştirilen gruptaki morfinin (5 mg/kg) etkisinin kontrol ve tolerans gelişmemiş grupta yalnız morfin uygulanan grupla karşılaştırılması.

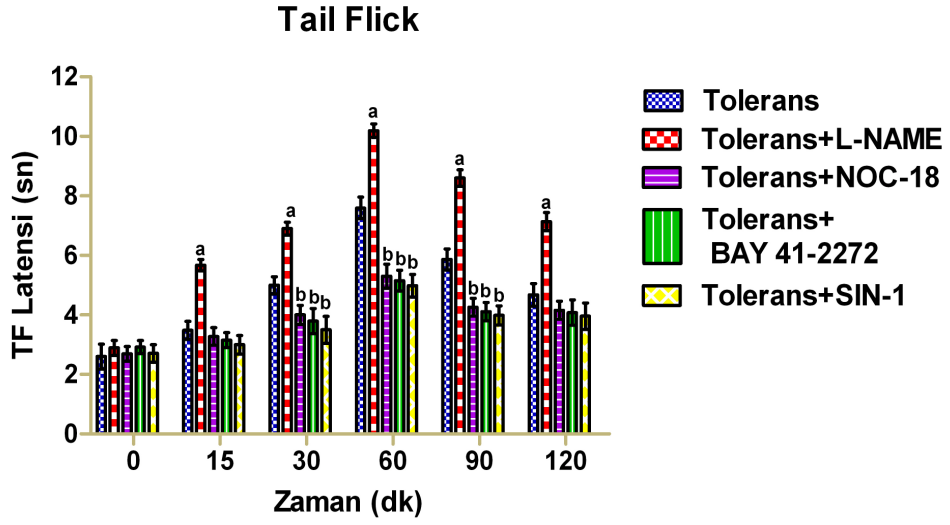
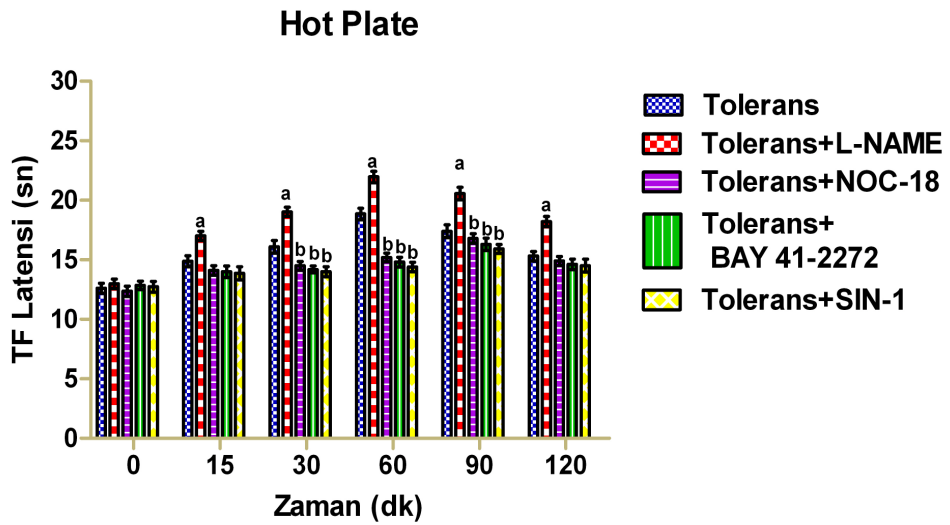
^a Tüm gruplara göre istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$)

^b Kontrol grubuna istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$)

4.9. Morfine Karşı Tolerans Gelişimine L-NAME, NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1'in Etkileri

Morfine karşı tolerans geliştirilen gruptaki ve tolerans geliştirilirken beraberinde L-NAME verilen gruptaki 5mg/kg morfinin tail flick ve hot plate latensleri üzerine olan etkileri karşılaştırıldığında, L-NAME verilen grupta tail flick ve hot plate latensleri tüm ölçüm dakikalarında anlamlı olarak uzadı ($p<0.05$). Bu artış en fazla 60. dakikada gerçekleşti ve 90. ve 120. dakikalarda 60. dakikaya göre azaldı (Şekil 4.8A ve B).

Morfine karşı tolerans geliştirilen gruptaki ve tolerans geliştirilirken beraberinde NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1 verilen gruptaki 5 mg/kg morfinin tail flick ve hot plate latensleri üzerine olan etkileri karşılaştırıldığında, NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1 verilen grupta tail flick ve hot plate latensleri tüm ölçüm dakikalarında anlamlı olarak kısaldı ($p<0.05$). Bu kısalma 15. ve 120. dakikalar hariç diğer ölçüm dakikalarında anlamlıydı ve en fazla 60. dakikada görüldü. Bu üç madde arasında en fazla azalmayı SIN-1 yaparken en azda NOC-18 yaptı ancak bu üç madde arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.8A ve B).

A**B**

Şekil 4.8: Morfine karşı tolerans gelişimine L-NAME, NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1'in etkilerinin tail flick ve hot plate testleriyle karşılaştırılması

^a Tüm gruplara göre istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$)

^b Kontrol grubuna istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$)

BÖLÜM V

TARTIŞMA VE SONUÇ

Nitrik oksit, L- Arjinin, oksijen ve kofaktörler varlığında nitrik oksit sentaz enzimiyle sitrülline dönüştürülürken açığa çıkar. Biyolojik membranlardan çok kolay difüze olan NO, lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda erir (45-47). Düşük konsantrasyonlarda iken toksik değildir ve birçok önemli fizyolojik işlevin gerçekleşmesinde rol alır.

Kalsiyum, nöronal NOS ve endotelial NOS aktivasyonu için gerekliyken indüklenebilir NOS için gerekli değildir. Solubl bir enzim olan nNOS beyin, periferel sinirler ve böbreklerde eksprese edilir (88). Endotelial NOS ise özellikle endotel hücrelerinde sentez edilir (89). İndüklenebilir NOS ise devamlı salınmaz ancak bakteriyel lipopolsakkarid ve sitokinlere cevap olarak özellikle makrofajlarda eksprese edilir. Bu NOS izoformları tarafından üretilen NO sentezi L-NNA, L-NA, L-NAME ve asimetrik dimetil arjinin gibi L-Arjinin analogları tarafından inhibe edilir (90, 91). Nitrogliserin, sodyum nitropurissiad, S-nitroso-N-asetilpenisilamin gibi bileşikler ve yeni üretilen bazı kimyasal maddeler NO salarlar ve NO donörleri olarak adlandırılırlar.

Endotelial NO vazodilatasyon, azalmış vasküler rezistans, azalmış kan basıncı, platelet agregasyonu ve adezyonunda inhibisyon, lökosit adezyonu ve transmigrasyonunda inhibisyon ve azalmış vasküler düz kas proliferasyonuna neden olur. Nitrovazodilatörler, düz kasta solubl guanilat siklazı aktive ederler ve guanozin trifosattan siklik GMP oluştururlar. Metilen mavisi, oksihemoglobin ve 1H[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one guanilat siklaz aktivitesini inhibe ederler (92). Siklik GMP artışı, spinal ve periferel antinosisepsiyona neden olan adenozin trifosfat (ATP) bağımlı K⁺ kanallarını açmada rol alan siklik GMP bağımlı protein kinazı aktive eder.

Otonomik sinir uyarılmalarına bağılı oluşan nonadrenerjik nonkolinerjik cevaplar önemli oranda nNOS tarafından üretilen NO tarafından oluşturulur. NO, serebral kan damarlarındaki periferel efferent sinirlerde nörotransmitter olarak çok önemli rol oynar (93). Afferent nitrenerjik sinirler duyuusal bilgi değerlendirmesini bazı yönlerden kontrol eder. NO'nun mezenterik vazodilatasyona neden olan ve primer

duyusal sinirlerden salınan bir nörotransmitter olduğuna dair kanıtlar vardır (94). NO'nun MS'in dorsal boynuzu boyunca ağrının afferent iletiminde önemli rol oynamaktadır (95).

Ağrı vücudun doku hasarlanmasına karşı oluşturduğu koruyucu bir cevaptır ve mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ağrı çalışmalarında ağrının özelliklerini, temelini açıklamak ya da herhangi bir maddenin ağrının algılanması üzerine olası etkisini araştırmak hedeflenirken en uygun hayvan modelleri seçilmelidir (41). Bu amaçla termal hiperaljezi metotlarından tail flick ve hot plate en sık kullanılan metotlardandır. Tail flick testi ilk olarak 1941 yılında D'Amour ve Smith tarafından tanımlanan ve fare veya sıçanın bir lambadan gelen ve şiddeti ayarlanabilir odaklanmış ışığa kuyruğunu çekmek sureti ile verdiği yanıtın değerlendirilmesi esasına dayanır (43). Analjezik etkisi olan ilaçlar kuyruk çekme süresini uzatırken, hiperaljezik etkisi olan ilaçlar bu süreyi kısaltırlar. Hot plate testi ise ilk olarak Woolfe ve MacDonald tarafından 1944'te tanımlanmış olmasına rağmen en çok 1953'te Eddy ve Leimbach tarafından tanımlanan modifiye formu kullanılmaktadır ve 50-56°C'ye ısıtılmış bir yüzeye bırakılan hayvanın arka ayağını çekmesi, yalaması, tekmelemesi, sallaması, dans etmesi veya sıçramasına kadar geçen sürenin tespit edilmesi esasına dayanır. Tıpkı tail flick testinde olduğu gibi analjezik etkisi olan ilaçlar bu süreyi uzatırken, hiperaljezik etkisi olan ilaçlar kısaltırlar (41).

Ağrı mekanizmasını aydınlatmak ve ağrıyı gidermek için yapılan çalışmalar her geçen gün artmaktadır. NO'nun ağrı mekanizmasındaki rolü araştırılırken ağrının algılanması sırasında nöronal yolların birçok seviyesinde rol oynadığı ve ağrının duyusunun düzenlenmesinde önemli bir işlevi olduğu pek çok çalışmada kabul edilmekle birlikte, bunun hangi mekanizmalar aracılığıyla olduğu tam olarak açığa kavuşmamıştır (42, 43). Yapılan araştırmalarda NOS inhibitörlerinin antinosiseptif etkilerinin olduğu bulunmuş ve omurilik arka boynuzunda ağrılı impulsların NO tarafından potansiyelize edildiği gösterilmiştir. Ayrıca çeşitli bileşiklerin analjezik etkilerine NO'nun aracılık ettiğini ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır (43). Bu konudaki çalışmaların çelişkilerinden dolayı bu çalışmada NO'nun ağrıdaki rolüne yönelik araştırma yaptık. Bu amaçla bir NOS inhibitörü olan L-NAME, bir nitrik oksit donörü NOC-18, bir guanilat siklaz aktivatörü BAY 41-2272 ve bir NO donörü

olmasının yanında aynı zamanda bir guanilat siklaz aktivatörü olan SIN-1'in etkilerin tail flick ve hot plate testlerinde araştırdık.

L-NAME, hem tail flick hem de hot plate testlerinde kontrol grubuna göre anlamlı olarak analjezi oluştururken, NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1 kontrol grubuyla karşılaştırılınca hem tail flick hem de hot plate testinde hiperaljzik etki gösterdi. Bu etki en fazla SIN-1'de en az NOC-18'de olmasına rağmen aralarında anlamlı fark yoktu.

Bu sonuçlar, temel olarak nitrik oksitin ağrı mekanizmasında veya modulasyonunda rolünün hiperaljezi yönünde olduğunu göstermektedir. NO'nun, mekanik, termal ve kimyasal hiperaljzinin mekanizmasında rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır ve bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar bizim sonuçlarımızla uyumludur (44, 64). Ancak bunun yanında L-arjinin/NO/cGMP yolak aktivatörleri ve inhibitörleri kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda da NO'nun hem nosiseptif hem de antinosiseptif etki oluşturduğu gösterilmiştir (71). Verdi ve arkadaşları L-arjinin analoglarının sistemik uygulamasının nöropatik ve kimyasal ağrıya karşı antinosiseptif aktivite gösterdiğini iddia etmişlerdir (44). NOS inhibitörleri L-NAME ve L-NMMA, cGMP inhibitörü metilen mavisinin i.c.v. uygulaması opioidden bağımsız antinosiseptif etki oluşturmuş ve bu etki di-butiril-cGMP tarafından bloke edilmiştir. Bu cGMP sisteminin nosiseptif informasyonun supraspinal transmisyonunda pozitif role sahip olduğu kanısı ortaya çıkarmıştır (71). Bazı NOS inhibitörlerinin sistemik ve intratekal injeksiyonunun formalin ve karregeninle oluşturulan hiperaljeziye bağlı cevapları azalttığının (67) bulunmasına rağmen başka çalışmalarda da NOS inhibitörleri asetilkolin ve morfinin antinosiseptif etkisini önlemiştir (44, 68). Bununla paralel olarak L-Arjinin'in hiperaljzik ağrı modellerinde, antinosiseptif etkisini gösteren çalışmalar (70, 71) yanında, nosiseptif etkisi olduğunu gösteren çalışmalarda vardır. NMDA resptörlerinin ve periferik uygulanan L-Arjininin hiperaljezi üzerine, doz bağımlı olarak hem nosisepsiyon hem de antinosisepsiyon etkileri olduğunu gösteren çalışmalar vardır (68, 74).

Morfin, ağrı tedavisinde en sık kullanılan doğal bir opioid olup opioidlerin karşılaştırılmasında prototip olarak kullanılır (33). Lipid eriyebilirliğinin olmaması veya az olması nedeniyle MSS'ne penetrasyonu geç olur ve etkisi geç başlar, uzun sürer (34). Etkisini MSS ve gastrointestinal sistemdeki opioid reseptörlerini uyarak

gösterir. Nöronlarda ve diğer sinir hücrelerinde hiperpolarizasyon yaparak aksiyon potansiyelinin oluşmasını ve presinaptik transmitter salıverilmesini engeller. Medulla spinaliste substantia jelatinoza'nın I. ve II. laminalarında μ reseptörleri üzerinde etki gösterir ve medulla spinaliste ağrının algılanmasını sağlayan substance P salıvermesini azaltır. Morfin aynı zamanda ağrılı uyarıyı taşıyan sinir terminallerinden pek çok eksitator nörotransmitterlerin salıverilmesini önler.

Morfin genel anesteziyelere göre analjezik etki oluşturmada üstündür çünkü hem spinal hem de supraspinal düzeyde analjezi oluşturur (35, 36). Kronik künt ağrılara keskin akut ağrılara göre daha etkilidir. Ağrısı olan ya da bağımlı olan hastalara morfin verildiğinde öfori oluşurken normal bireylerde disfori yapar. İnsanda sedasyon oluşturur ve bu etkinin ortaya çıkmasında lokus seruleusun önemli etkisi olduğu düşünülmektedir.

Morfinin solunumu deprese edici özelliği vardır ve bu etkinin nedeni beyin sapındaki solunum merkezinin normal uyarıcısı olan, kandaki karbondioksite karşı olan duyarlılığın azalmasıdır (59). Morfin arteriyel ve venöz dilatasyon yapar ve bu etki baroreseptörler üzerine inhibitör etkiyle ortostatik hipotansiyona neden olmaktadır (37). Morfinin vazodilatör etkisinden akut pulmoner ödem tedavisinde yararlanır.

Opioidlerin çok çeşitli etkileri bulunmasına karşın primer kullanım alanı, cerrahi uygulama veya kanser gibi bir hastalık sonucu gelişen, anksiyetenin de eşlik ettiği ağrının tedavisidir. Morfinin analjezik etkisine çeşitli maddelerin etkilerinin araştırılması oldukça popüler bir konudur ve bir opioid prototipi olan morfin bir çok madde ile kombine edilerek aralarındaki etkileşim araştırılmıştır. Bu maddelerden bir tanesi de son zamanlarda üzerinde oldukça fazla araştırma yapılan bir madde olan NO'dur. Bu konuda yapılan çalışmalarda değişik sonuçlar elde edilmiş ve NO'nun morfinin ağrı kesici mekanizmasında önemli bir role sahip olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmada bir NOS inhibitörü olan L-NAME, bir nitrik oksit donörü NOC-18, bir guanilat siklaz aktivatörü ve bir NO donörü olmasının yanında aynı zamanda bir guanilat siklaz aktivatörü olan SIN-1'in morfinle kombinasyonlarının morfinin analjezik etkisine olan etkilerini tail flick ve hot plate testlerinde araştırdık. L-NAME, morfinle kombine edildiğinde sadece morfin uygulanan grupla karşılaştırıldığında morfinin oluşturduğu analjeziyi anlamlı olarak artırdı. NOC-18,

BAY 41-2272 ve SIN-1 morfinle birlikte verildiğinde morfinin analjezik etkisini tek başına morfin verilen grupla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalttılar. En fazla azalma SIN-1 de iken en az NOC-18 de görüldü ancak bu maddeler arasında anlamlı bir fark yoktu.

Pelligrino ve arkadaşları köpeklerde yaptıkları bir çalışmada bir L-Arjinin analogu olan L-NA veya morfini dördüncü ventriküle vermişler ve nosiseptif eşiği artırdıklarını gözlemlemişlerdir. Morfin ve L-NA'nın birlikte verilmesi morfinin tek başına verilmesinden daha güçlü bir antinosiseptif etki göstermiştir ve supraspinal bölgelerdeki endojen NO'nun bir nosiseptif mediyatör olarak rol oynadığı kanısına varmışlardır (81). Bir başka çalışmada L-Arjinin kronik olarak intraperitoneal yolla verilmiş ve bu maddenin beyin NOS aktivitesini artırarak ve morfin konsantrasyonunu fare beyninin ve spinal kordunun belli bölgelerinde azaltarak morfinin antinosiseptif etkisini azalttığını bulmuşlardır (82). Bhargava ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada L-Arjininin uygulanmasıyla NO sisteminin akut aktivasyonu morfin antinosisepsiyonunu hafifletmiştir ve bu etki santral bölgelerde morfinin up-take'inin azaltılmasına bağlanmıştır (83). Farelerde yapılan bir çalışmada kronik olarak L-Arjinin uygulanması morfinin güçlü bir metaboliti olan morphine-6-beta-D-glukuronidin antinosiseptif etkisini azaltmıştır. Ancak intraserebroventriküler olarak uygulanan morfin-6-beta-D-glukuronidin etkisi L-Arjininden etkilenmemiştir. Morfinin bu metabolitinin subkutanöz formunun antinosiseptif etkisinin azalması L-NA uygulanması ile normale dönmüştür ve araştırmacılar L-Arjinin tarafından periferal olarak uygulanan morfin-6-beta-D-glukuronidin etkisinin azalmasını antinosiseptif etkiden sorumlu beyin bölgelerine morfin metabolitinin girmesinin engellenmesi olasılığına bağlanmıştır (96). Farelerde streptozosinle oluşturulan diyabette intraserebroventriküler olarak uygulanan morfinin antinosiseptif etkisi belirgin olarak azalmıştır. Bu hayvanlara selektif bir iNOS inhibitörü olan aminoguanidin verilmesi morfinin etkisini iyileştirmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar, iNOS tarafından NO oluşumunun artmasının, diyabetik sıçanlardaki azalmış morfin antinosiseptif etkisinden sorumlu olabileceği sonucuna varmışlardır (97). Moore ve arkadaşları bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak farelerde opioidden bağımsız olarak antinosisepsiyon oluşturduğunu bulmuşlardır ve bu sonuçları L-NAME'in beyindeki direkt etkisine bağlamışlardır (80).

Buna karşın Javanmardi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, mezensefalik morfin antinosisepsiyonu MK-801 ve L-NAME'in ratların rostral ventromedial medullasına mikroenjeksiyonuyla azalmıştır. Bu azalma bu maddelerin tek başına uygulanmasından farklı bulunmamıştır ve araştırmacılar bunu rostral ventromedial medulladaki NMDA reseptörleri ve NO oluşumunun periakvaduktal gri cevherden çıkan opioid ağrı inhibitör sinyallerinin düzenlenmesine bağlamışlardır (79). Morfinin santral analjezik etkisi tail flick ve pençe çekme testlerinde metilen mavisinin intraserebroventriküler uygulanması ile inhibe edilmiş ve bir cGMP fosfodiesteraz inhibitörü tarafından artırılmıştır. Fakat bu etki NOS inhibitörleri L-NMMA ve N-İminoetil-L-Ornitin tarafından bloke edilmemiştir (76, 77). Bu nedenle NO salınımından bağımsız olarak cGMP sisteminin aktive edilmesinin morfinin santral analjezik etkisinde rolünün olabileceği belirtilmiştir. İntraserebroventriküler olarak uygulanan L-NA morfin analjezisini ortadan kaldırmıştır ve aynı yolla uygulanan L-Arjinin morfinin analjezik etkisini artırmıştır. Bu sonuçlar NO sentezinin morfin analjezisini artırabileceği sonucuna bağlanmıştır (78).

Opioid bir ilaç olan morfinin tekrarlayan sık kullanımları sonunda etkilerinde azalma görülür ve buna tolerans denir. Aynı etkiyi elde etmek için daha yüksek dozlar kullanılmalıdır. Morfinin solunum depresyonu, analjezik, öforik ve sedatif etkilerine tolerans gelişir ancak miyozis ve konstipasyon yapıcı etkilerine karşı tolerans gelişmez. Tolerans yanında fiziksel bağımlılıkta oluşur. Fiziksel bağımlılık, ilacın kesilmesi durumunda veya antagonist uygulanması durumunda çekilme sendromu veya yoksunluk sendromu görülmesiyle karakterizedir (31).

Morfin bağımlılarında ilacın aniden kesilmesi son dozdan 8-12 saat sonra başlayan yoksunluk sendromu belirtilerine neden olur ve yoksunluk belirtilerinin şiddeti kişisel olarak farklılık gösterir. Önce lakrimasyon, rinore, terleme, esneme gibi bulgular gözlenirken daha sonra uyku bozuklukları, irritabilite, tremor, midriyazis, taşikardi, kan basıncında artma, ciltte kızamık derisi görünümü, bulantı, kusma, şiddetli hışırtı, diyare, esneme, kas ağrıları, bacaklarda klonik kasılma gibi belirtiler ortaya çıkar (35). İlacın kullanılmasının bırakılmasından sonraki birkaç gün içinde opioidlerin sedatif ve solunum etkilerine karşı gelişen tolerans kaybolurken emetik etkilerine karşı gelişen tolerans ilacın çekilmesinden sonra birkaç ay sürebilir.

Toleransın oluşması, kaybolması veya toleransın derecesi, kullanılan opioidlere ve onu kullanan şahıslara bağlı olarak değişebilir.

Analjezik ilaçlara karşı gelişen tolerans agonistlere göre farklı reseptörleri etkileyerek daha düşük derecede oluşur. Halüsinasyonlar, sedasyon, hipotermi ve solunum depresyonu gibi etkiler karışık reseptörleri etkileyen bileşiklerin tekrarlayan uygulamalarında azalır. Ancak bu ajanlara gelişen tolerans agonist ilaçlara olan çapraz toleransı içermez. Opioidlere karşı çapraz tolerans gelişimi bu ilaçların önemli bir karakteristik özelliğidir (35) ve bu durum öncelikle reseptör agonist aktivitesi olan ajanlar için geçerlidir. Kanser tedavisinde bir opioidin etkisinde azalma görülünce başka bir opioid ilaç verilmiştir ve böylece eşit doz kullanımda daha iyi ağrı kesici etki elde edilmiştir ve bu uygulamaya opioid rotasyonu denilmektedir. Tolerans gelişimi azaltmak ya da engellemek için kullanılan başka bir yaklaşımda opioid ilacı opioid olmayan bir ajanla kombine etmektir. NMDA reseptör antagonistlerinin opioidlere tolerans gelişimi engellediği veya geriye döndürdüğü insan ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Ketamin başta olmak üzere bu ajanların kullanımı postoperatif ağrıyı azaltmak ve opioid toleran hastalarda opioid gereksinimini azaltmak gibi etkileri kontrollü klinik çalışmalarda gösterilmiştir (31). Reseptör antagonistlerinin agonistlerle beraber kullanılmasının da tolerans gelişimini engellediği ileri sürülmüştür. Sonuç olarak morfine karşı gelişen toleransı azaltmak ya da engellemek önemli bir araştırma konusu olmuştur ve bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. NO'nun morfine karşı gelişen toleransta etkisi ve rolü henüz tam olarak aydınlatılamadığından bizim bu çalışmamızdaki amaçlarımızdan birisi de bu konuya ışık tutmaktır.

Bu amaçla bu çalışmada deneysel olarak morfin toleransı geliştirirken hayvanlara aynı zamanda bir NOS inhibitörü olan L-NAME, bir nitrik oksit donörü NOC-18, bir guanilat siklaz aktivatörü ve bir NO donörü olmasının yanında aynı zamanda bir guanilat siklaz aktivatörü olan SIN-1 verdik ve morfine karşı gelişen toleransa karşı bu maddelerin etkilerini araştırdık. L-NAME morfine karşı gelişen toleransı azalttı ancak tamamen ortadan kaldırmadı. NOC-18, BAY 41-2272 ve SIN-1 ise morfine gelişen toleransı daha da artırdı. En fazla artış SIN-1 de görülürken az NOC-18 de görüldü ancak bu maddeler arasında anlamlı bir fark yoktu.

Kielstein ve arkadaşları artmış NO oluşumunun farelerde morfin tolerans gelişimini artırdığını ileri sürmüşlerdir. NO konstitüf mü reseptör aktivitesini artırmış ve 7-NI morfin yoksunluk belirtilerini hafifletmiştir. Bu sonuçlara dayanarak nNOS inhibisyonu ve NO düzeylerini azaltarak asimetric dimetil arjininin konstitüf mü reseptör aktivitesini azaltarak morfinin analjezik doz yanıt eğrisini değiştireceği sonucuna varmışlardır (98). Devamlı morfin verilen nNOS aktivitesinden yoksun farelerde kontrol grubuna göre tolerans gelişimi daha az olmuştur ancak hala ölçülebilir derecede görülmüştür. Ancak eNOS'dan yoksun farelerde kontrol grubundan bir fark görülmemiştir (99). MK-801 in morfine tolerans gelişmesinin engellenmesi NMDA reseptörleri aktivasyonunun neticesinde NO salınımına bağlanmıştır. Kompetitif ve non kompetitif NMDA reseptör antagonistlerinin ve L-NA'nın morfin toleransını engellediğini gösteren çalışmalarda vardır (85). Morfinin analjezik etkisi subkutanöz olarak beş günlük uygulanmasından sonra ortadan kalkmıştır ve L-NA'nın morfinle kombine edilmesi tolerans gelişimini en az on bir gün engellemiştir (84). L-NA veya L-NAME in morfinle birlikte uygulanması morfine tolerans gelişimini engellemiş ve farelerde morfin bağımlılığının bazı bulgularını hafifletmiştir (86). Highfield ve arkadaşları NO'nun morfine karşı gelişen toleransı lokus sereleus nöronlarını etkileyerek hafiflettiğini öne sürmüşlerdir. Sinir dokularında NO oluşumunu azaltan siklosporin A, L-NAME ve bu ikisinin etkisiz dozlarda kombinasyonu morfinin ağrı kesici etkisine karşı gelişen tolerans oluşumunu ve ilerlemesini engellemişlerdir (100). Ancak aminoguanidin morfin toleransını etkilememiştir ve bu sonuçlardan araştırmacılar iNOS aracılığıyla değil ama konstitüf NOS aracılığıyla artan NO morfin tolerans modülasyonunda rolü olduğu sonucuna varmışlardır (101). Bir başka çalışmada da L-Arjinin tek başına uygulanınca morfinin etkisini azaltırken morfinle birlikte verildiğinde tolerans gelişimini hızlandırmıştır (102). Ayrıca Romero ve arkadaşları iNOS gen delesyonu yaptıkları farelerde morfin toleransı geliştirmişler ve bu delesyonun parsiyel olarak morfin toleransını engellediğini bulmuşlardır (103)

Yukarıdaki çalışmaların sonuçları bu çalışmada elde edilen sonuçlarla uyumlu olmasına rağmen bunların aksine Tsuchiya ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bovin laktoferrinin (BLF) morfinle birlikte uygulanması farelerde morfin tolerans gelişmesini geciktirmiştir ancak BLF'nin bu etkisi L-NAME veya metilen

mavisi ile kısmen 7-NI ile ise tamamen ortadan kalkmıştır. Bu sonuçta BLF'nin morfine tolerans gelişimini nNOS'un selektif aktivasyonu ile yapabileceğine bağlanmıştır (87).

Sonuç olarak nitrik oksit'in ağrı mekanizmasında hiperaljzik yönde rol oynadığı söylenebilir. NOS inhibitörlerinin morfinle birlikte uygulanması morfinin analjzik etkisini arttırabilir. Ayrıca NO/cGMP yolağı morfine karşı gelişen toleransta rol oynamaktadır ancak NOS inhibitörlerinin verilmesinden sonra tamamen toleransın ortadan kalkmaması morfine tolerans gelişiminde başka mekanizmaların da rolünün olduğunu düşündürmektedir. NOS inhibitörlerinin morfinin ağrı kesici etkisini arttırmak ve morfine karşı gelişen toleransı engellemek için morfinle birlikte kullanılmaları ileri klinik çalışmalardan sonra önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. Yücel A. Hasta Kontrollü Analjezi (Patient-Controlled Analgesia), HKA. Ufuk Matbaacılık 1997; 31-53.
2. Raj P, Prithvi. Ağrı taksonomisi, Editor Erdine S. Ağrı 2000; 12-19.
3. Golianu B, Krane EJ, Galloway KS, Yaster M. Pediatric acute pain management (Acute Pain in Children). Pediatric Clinics of North America 2000; 47: 559–587.
4. Erdine S. Sinir blokları 1993; 25-48, 124-142.
5. Yücel A, Özyalçın S. Çocukluk çağında ağrı 2002; 17-19.
6. Erdine S. Ağrı Mekanizmaları; Erdine S (editör). Ağrı. 2. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri 2002; 20-29.
7. Hudspith MJ, Sindall PJ, Munglani R. Physiology of pain. Hemmings HC, Hopkins PM (editors). Foundations of Anesthesia. Second Edition, Mosby Elsevier Philadelphia 2005: 267-285.
8. Johnson WJ. Pain Mechanisms: Anatomy, Physiology, and Neurochemistry. Raj PP (editor). Practical Management of Pain. Third Edition, Mosby Missouri 2005; 117-143.
9. Talu GK. Nöropatik Ağrı; Erdine S (editör). Ağrı. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2002: 368-374.
10. Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ, Larson CP. Klinik Anesteziyoloji. Tulunay M, Cuhruk H (editörler). 3. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi 2004: 310-358.
11. İnalkaç S. Ratlarda intratekal melatonin uygulanmasının antinöroinflamatuvar etkisinin değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, 2003.
12. Erdine S. Akut Ağrı Fizyopatolojisi. Ağrı; Nobel Kitabevi, İstanbul 2002; 111-119.
13. Beaulieu P, Rice ASC. Applied physiology of nociception. In: Rowbotham DJ, Macintyre PE (editors). Acute pain. Second Edition, London: Arnold Press 2003: 3-16.
14. Ertekin C. Ağrının nöroanatomi ve nörofizyolojisi. Ağrı ve Tedavisi.(Editör: Yegül İ) İzmir, Yapım matbaacılık, 1996; 1-18.

15. Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: A new theory. *Science* 1965;150: 971-979.
16. Yaksh TL, Hammond DL. Peripheral and central substrates in the rostral transmission of nociceptive information. *Pain* 1982; 13: 1-85.
17. Dubner R, Bennet GJ. Spinal and trigeminal mechanism of nociception. *Annu Rev Neurosci* 1983; 6: 381-418.
18. Willis WD. The pain system: The neural basis of nociceptive transmission in the mammalian nervous system. Basel:Karger, 1985.
19. Sinatra RS, Hord AH, Ginsberg LM. Acute Pain, Mechanism and Management, 1992; 29-39.
20. De Camili P, Mirsky R. Neuronal and glial cell biology. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 595-597.
21. Kerr F, Lippman HH. The spinothalamic tract as demonstrated by anterolateral cordotomy and commissural myelotomy in: Bonica JJ, ed. *Advances in neurology*. Vol 4. New York: Raven Pres, 1974: 144-156.
22. Willis WD. The origine and destination of pathways involved in transmission. In Wall PD, Melzack R, eds. *Textbook of pain*. New York: Churchill Livingstone, 1984: 88-89.
23. Erdine S. Ağrı. 1. Baskı: Nobel Tıp Kitabevleri, 2000.
24. Hylden JL, Hayashi H, Bennett GJ. Lamina I mesencephalic neurons in the cat ascent via the dorsolateral funiculi. *Somatosens Res* 1986; 4 (1): 31-41.
25. Fürst S. Transmitter involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bulletin* 1999; 48: 129-14.
26. Karanikolas M, Swarm RA. Current trends in perioperative pain management. *Anesthesiology Clinics of North America* 2000;18:575-599.
27. Edward R. Perl. Ideas about pain, a historical view. *Nature Reviews Neuroscience* 2007; 8: 71-80.
28. Erdine S. Ağrı ve akılcı analjezik kullanımı. Basım TEB ve Sanovel İlaç 2. Basım 1-8.
29. James MK, Vuong A, Grizzle MK. Schuster SV, Shaffer JE. Hemodynamic effects of GI87084B, an ultra-short acting mu-opioid analgesic, in anesthetized dogs. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992; 263: 84-91.

30. James MK, Feldman PL, Schuster SV, Bilotta JM, Brackeen MF, Leighton HJ. Opioid reseptor activity of GI87084B, a novel ultra-short acting analgesic, in isolated tissues. *J Pharmacol Exp Ther*, 1991; 259: 712-718.
31. Schumacher MA, Walter WL. Opioid analgesics and antagonists. In: Katzung BG (Ed). *Basic and clinical pharmacology*. 9th ed. San Francisco: Appleton and Lange; 2004; 497-508.
32. Amin HM, Sopchak AM, Esposito BF, Henson LG, Batenhorst RL, Fox AW, Camporesi EM. Naloxone- induced and spontaneous reversal of depressed ventilatory responses to hypoxia during and after continuous infusion of remifentanil and alfentanil. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995; 274: 34-39.
33. Stephens J, Laskin B, Pashos C, Pena B, Wong J. The burden of acute postoperative pain and the potential role of the COX-2-specific inhibitors. *Rheumatology*, 2003; 42: 40-52.
34. Cingi İ, Erol K, Özdemir M. *Farmakoloji ders notları II*. Eskişehir. 1996:245-6.
35. Özyalçın N. Süleyman. *Akut Ağrı*, 2005; 67-68.
36. Donnelly S, Davis MP, Walsh D, Naughton M. Morphine in cancer pain management: a practical guide. *Support Care Cancer*, 2002; 10: 13-35.
37. Dökmeci İ. *Opiyoid analjezikler, Farmakoloji, ilaçlar ve etkileri*. İstanbul: Alfa Yayınları, 2007.s.559-71.
38. Gilman AG. *Goodman&Gilman's The pharmacological basis of therapeutics* 1996. Konu 23-24, 9. Baskı, Mc Graw-Hill.
39. Fischer BD, Carrigan KA, Dykstra LA: Effects of *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonists on acute morphine-induced and L-methadone-induced antinociception in mice. *J Pain* 2005; 6: 425.
40. King T. Role of NK-1 neurotransmission in opioid-induced hyperalgesia. *Pain* 2005; 116: 276.
41. Kartal F, Özyalçın NS. *Hayvanlarda Akut ve Kronik Ağrı Modellerinin Değerlendirilmesi*. Önal SA (editör). *Algoloji*. 1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2004: 299-324.
42. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. *Animal Models of Nociception*. *Pharmacol Rev* 2001;53:597-652.

- 43.** Uzbay T. Psikofarmakolojinin temelleri ve deneysel araştırma teknikleri. Ankara: Çizgi Tıp Yayınevi; 2004: 139-45.
- 44.** Javad V, Abolhassan A. Finasteride, a 5 α -reductase inhibitor, potentiates antinociceptive effects of morphine, prevents the development of morphine tolerance and attenuates abstinence behavior in the rat. *Hormones and Behavior* 2007; 51: 605–610.
- 45.** Bayındır O. Nitrik oksid'in reaktivitesi, sentezi ve analiz metodları. Koşay S (ed). Nitrik Oksid'in Patolojik Olaylardaki Rolü. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1996; 7-25.
- 46.** Moncada S, Higgs EA. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 30: 2002-2012.
- 47.** Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994; 343: 1199-1206.
- 48.** Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 1989; 38: 1709-1715.
- 49.** Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 158: 348-352.
- 50.** Furchott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond).* 1980; 288: 373-376.
- 51.** Ignarro JJ, Bryns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radicals in vasodilatation. *Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium* (Ed: Vanhoutte PM). New York, Raven Press, 1998; 342: 427-436.
- 52.** Lüscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 1997;20 (suppl II): II-3-II-10.
- 53.** Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factors. *Nature.* 1988; 327: 524-526.

54. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-258.
55. Kılıçturgay K. İmmünoloji. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi 2000; 310-313.
56. www.sfn.org/index.cfm?pagename=brainBriefings_nitricOxid .
57. Wang XL and Wang J. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Sequence Variations and Vascular Disease, *Molecular Genetics and Metabolism* 2000; 70: 241–251.
58. Lucas L, Soriano FG and Szabó C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Car Med.* 2000; 28(4 Suppl): 37-52.
59. Kayaalp S.O. Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe-TAŞ. Ankara. 2002.
60. Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci.* 1989; 86: 5159-5162.
61. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Palme yayıncılık 2003.
62. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 2002; 90(suppl): 40-48.
63. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4(2): 161-74.
64. Hayashi G, Takemori AE. The type of analgesic-receptor interaction involved in certain analgesic assays. *Eur J Pharmacol.* 1971; 16(1): 63-6.
65. Leza JC, Lizasoain I, San-Martin-Clark O, Lorenzo P: Morphine-induced changes in cerebral and cerebellar nitric oxide synthase activity. *Eur J Pharmacol* 1995; 285: 95–8.
66. Duarte IDG, Lorenzetti IBB, Ferreira SH. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol.* 1990; 186: 289-293.
67. Tedesco LS, Fuseler J, Grisham M, Wolf R, Roerig SC. Therapeutic administration of nitric oxide synthase inhibitors reverses hyperalgesia but not inflammation in a rat model of polyarthritis. *Pain* 2002; 95: 215-23.

68. Kawabata A, Manabe S, Manabe Y, Takagi H. Effect of topical administration of L-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. *Brit J Pharmacol*. 1994; 112: 547-550.
69. Barbato JE, Tzeng E. Nitric oxide and arterial disease. *J Vasc Surg*. 2004 40(1): 187-193.
70. Kawabata A, Fukuzumi Y, Fuku shima Y, Takagi H. Antinociceptive effect of L-arginine on carrageenin-induced hyperalgesia in rats: possible involvement of central opiodergic systems. *Eur. J. Pharrnacol*. 1992; 218: 153-158.
71. Kawabata A, Nishimura Y, Takagi H. L-Leucyl-L-arginin, naltrindole and D-arginine block antinociception elicited by L-arginine in mice with carrageenin-induced hyperalgesia. *Brit J. Pharmacol*. 1992; 107: 1096-1101.
72. Morgan GE, Mikhail MG. Pain Management. In: *Clinical Anesthesiology* 1996, 2 ed. New Jersey: Prentice-Hall Interntional, Inc: 274-316.
73. Alcaraz MJ, Guillen MI. The nitric oxide related therapeutic phenomenon: a challenging task. *Curr Pharm Des*. 2002; 8: 215-31.
74. Kolhekar R, Meller ST, Gebhart GF. Characterization of the role of spinal N-methyl-Daspartate receptors in thermal nociception in the rat. *Neuroscience* 1993; 57 (2): 385-395.
75. Kumar S, Bhargava HN. Time course of the changes in central nitric oxide synthase activity following chronic treatment with morphine in the mouse: reversal by naltrexone. *Gen Pharmacol* 1997; 223-7.
76. Ferreira SH, Duarte ID, Lorenzetti BB. Molecular base of acetylcholine and morphine analgesia. *Agents Actions Supple*. 1991; 32: 101-6.
77. Duarte ID, Ferreira SH. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1992; 221: 171-4.
78. Pataki I, Telegdy G. Further evidence that nitric oxide modifies acute and chronic morphine actions in mice. *Eur J Pharmacol* 1998; 357: 157-62.
79. Javanmardi K, Parviz M, Sadr SS, Keshavarz M, Minaii B, Dehpour AR. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide in the rostral ventromedial medulla in modulating morphine pain-inhibitory signals from the periaqueductal grey matter in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005; 32: 585-9.

- 80.** Moore PK, Oluyomi AO, Babbedge RC, Wallace P, Hart SL. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 198–202.
- 81.** Pelligrino DA, Laurito CE, VadeBoncouer TR. Nitric oxide synthase inhibition modulates the ventilatory depression and antinociceptive actions of fourth ventricular infusions of morphine in the awake dog. *Anesthesiology* 1996; 85: 1367–77.
- 82.** 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.
- 83.** Bhargava HN, Bian JT. Effects of acute administration of L-arginine on morphine antinociception and morphine distribution in central and peripheral tissues of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1998; 61: 29–33.
- 84.** Kolesnikov YA, Pick CG, Pasternak GW. NG-nitro-L-arginine prevents morphine tolerance. *Eur J Pharmacol* 1992; 221:399–400.
- 85.** Elliott K, Minami N, Kolesnikov YA, Pasternak GW, Inturrisi CE. The NMDA receptor antagonists, LY274614 and MK-804, and the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the μ -opioid morphine but not to κ -opioids. *Pain* 1994; 56: 69–75.
- 86.** Majeed NH, Przewlocka B, Machelska H, Przewlocki R. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. *Neuropharmacology* 1994; 33: 189–92.
- 87.** Tsuchiya T, Takeuchi T, Hayashida K, Shimizu H, Ando K, Harada E. Milk-derived lactoferrin may block tolerance to morphine analgesia. *Brain Res.* 2006; 1068: 102–8.
- 88.** Bredt DS, Snyder GH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682–5.
- 89.** Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Nat Acad SciUSA* 1991; 88: 1788–92.

- 90.** Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 153: 1251–6.
- 91.** Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 746–52.
- 92.** Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potential and selective inhibition of nitric oxide sensitive guanylate cyclase by 1H[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 184–8.
- 93.** Toda N, Okamura T. Possible role of nitric oxide in transmitting information from vasodilator nerve to cerebral arterial muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 170: 308–13.
- 94.** Zheng Z, Shimamura K, Anthony TL, Travagli RA, Kreulen DL. Nitric oxide is a sensory nerve neurotransmitter in the mesenteric artery of guinea pig. *J Auton Nerv Syst* 1997; 29: 137–44.
- 95.** Zochodne DW, Levy D. Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. *Cell Mol Biol* 2005; 51: 255–67.
- 96.** Bhargava HN, Bian JT. Effects of acute and chronic administration of L-arginine on the antinociceptive action of morphine-6- β -D-glucuronide. *Pharmacology* 1997; 55: 165–72.
- 97.** Grover VS, Sharma A, Singh M. Role of nitric oxide in diabetes-induced attenuation of antinociceptive effect of morphine in mice. *Eur J Pharmacol* 2000;399: 161–4.
- 98.** Kielstein A, Tsikas D, Galloway GP, Mendelson JE. Asymmetric dimethyl arginine (ADMA)—a modulator of nociception in opiate tolerance and addiction? *Nitric Oxide* 2007; 17: 55–9.
- 99.** Heinzen EL, Pollack GM. The development of morphine antinociceptive tolerance in nitric oxide synthase-deficient mice. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 735–41.
- 100.** Homayoun H, Khavandgar S, Namiranian K, Dehpour AR. The effect of cyclosporine A on morphine tolerance and dependence: involvement of L-arginine/nitric oxide pathway. *Eur J Pharmacol* 2002; 452: 67–75.

- 101.** Highfield DA, Grant S. NG-nitro-L-arginine, an NOS inhibitor, reduces tolerance to morphine in the rat locus coeruleus. *Synapse* 1998; 29: 233–9.
- 102.** Babey AM, Kolesnikov Y, Cheng J, Inturrisi CE, Trifilletti RR, Pasternak GW. Nitric oxide and opioid tolerance. *Neuropharmacology* 1994; 33: 1463–70.
- 103.** Romero A, Hernández L, García-Nogales P, Puig MM. Deletion of the inducible nitric oxide synthase gene reduces peripheral morphine tolerance in a mouse model of chronic inflammation. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009.