

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ
ANABİLİM DALI

**KOLLAJEN ANTİKORU İLE İNDÜKLENEN ARTRİT
ve AĞRI ÜZERİNE FARKLI
ANALJEZİK İLAÇLARIN ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Uzm. Ecz. Duygu Belkıs BAŞ

**Samsun
Nisan-2011**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ
ANABİLİM DALI

**KOLLAJEN ANTİKORU İLE İNDÜKLENEN ARTRİT
ve AĞRI ÜZERİNE FARKLI
ANALJEZİK İLAÇLARIN ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Uzm. Ecz. Duygu Belkıs BAŞ

Danışman: Prof. Dr. Yüksel KESİM

**Samsun
Nisan-2011**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından **Farmakoloji** Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr.Süleyman ÇELİK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)



Üye : Prof. Dr. Yüksel KESİM, Ondokuz Mayıs Üniversitesi
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)



Üye : Prof. Dr. Ersin YARIŞ, Karadeniz Teknik Üniversitesi
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)



Üye : Doç. Dr. Ayhan BOZKURT, Ondokuz Mayıs Üniversitesi
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)



Üye : Yrd.Doç.Dr. Mehmet KURT, Ondokuz Mayıs Üniversitesi
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)



Tezin Adı: Kollajen Antikorun İndüklediği Artrit ve Ağrı Üzerine Farklı Analjezik İlaçların Etkileri

Tezi Teslim Eden: Duygu Belkıs BAŞ

Tez Savunma Sınav Tarihi: 22.04.2011

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Yüksel KESİM

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof.Dr.Süleyman KAPLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımnda bana her zaman yol gösteren ve destek veren hocam, danıőmanım Prof. Dr. Yüksel KESİM'e, değerli hocalarım Prof. Dr. Süleyman ÇELİK, Yrd. Doç. Dr. Sırrı BİLGE ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet KURT'a, bilgi ve deneyimlerinden sıkça yararlandığım Doç. Dr. Ayhan BOZKURT'a, İsveç'te kaldığım süre boyunca bana rahat bir çalışma ortamı sağlayan, çalışmalarımaya yön veren hocam Yrd. Doç. Dr. Camilla I. SVENSSON'a, asistan arkadaşım Dr. Arzu ERDAL'a, her an desteğini yanımda hissettiğim bölümümüz sekreteri Havva ÖZEN'e ve öğrencilik sürem boyunca yardımlarını esirgemeyen Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrenci işlerinden Atilla YILMAZ'a teşekkür ederim.

Aileme; emekleri, sonsuz sevgi ve sabırları için...

ÖZET

KOLLAJEN ANTİKORU İLE İNDÜKLENEN ARTRİT VE AĞRI ÜZERİNE FARKLI ANALJEZİK İLAÇLARIN ETKİLERİ

Uzm. Ecz. Duygu Belkıs BAŞ, Doktora Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Nisan-2011

Romatoid artrit (RA) kronik otoimmün bir hastalık olup dünya nüfusunun %1'ini etkiler. Önemli olarak, ağrı RA hastaları tarafından rapor edilen en rahatsız edici semptomlardan biridir. RA hastalarında ağrının düzeyi ve spinal kord seviyesinde ağrı sürecinin kolaylaşması sinovyal inflamasyon ile tam olarak açıklanamamaktadır. Bu çalışmada, kollajen antikoru ile indüklenen artrit (KAİA) modelinin, artrit-indüklenen ağrı modeli olarak karakterizasyonu yapıldı, farmakolojik yanıt ve spinal glia aktivasyonu bu modelde değerlendirildi.

KAİA güçlü, persistan taktıl allodini meydana getirdi ve bu hipersensivite inflamasyonun klinik belirtileri kaybolduktan sonra da devam etti. Bununla birlikte, soğuk allodini yanıtları inflamasyonun klinik belirtileri ile korelasyon gösterdi, önce artan değerler sonra bazal aktivite değerlerine geri döndü. Eklem inflamasyonu pik düzeyde iken (8-12. günler), azalmış olan taktıl allodini eşik değerleri i.p. olarak uygulanan diklofenak, buprenorfin ve gabapentin tarafından artırıldı, anakinra ise etkili değildi. İnflamasyon kaybolduktan sonra (26-31. günler) sadece buprenorfin ve gabapentin etkili bulundu.

Çeşitli persistan ağrı modellerinde spinal glianın önemli roller oynadığı gösterilmiştir. İmmünohistokimya sonuçlarımız KAİA indüksiyonunu takiben 29. günde (geç dönem) spinal kortta astrosit aktivasyonunun arttığını gösterdi, bununla birlikte erken (13. gün) veya geç dönemde mikroglia aktivitesinde değişiklik bulunmadı. Bu sonuçlar, spinal korddaki astrosit aktivasyonunun persistan ağrı ile bağlantılı olabileceğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, KAİA modeli artrit-indüklenen ağrı mekanizmalarının araştırılması için yeni bir araç sunarken ve RA benzeri koşullarda ağrıyı azaltmak için yeni tedavi seçeneklerinin araştırılmasına da yardımcı olabilir.

ABSTRACT

EFFECTS OF DIFFERENT ANALGESIC DRUGS ON COLLAGEN ANTIBODY INDUCED ARTHRITIS AND PAIN

Spc. Phm. Duygu Belkıs BAŞ, Ph.D. Thesis

University of Ondokuz Mayıs Samsun, April-2011

Rheumatoid arthritis (RA) is chronic autoimmune disease affecting 1% of the world's population. Of importance, pain is one of the most bothersome symptoms reported by RA patients. The level of pain in RA patients and facilitation of pain processing at the spinal level cannot be entirely explained via synovial inflammation. In this study, the collagen antibody-induced arthritis (CAIA) model was characterized as a model of arthritis-induced pain, pharmacologic responsiveness and spinal glia activation were assessed in this model.

CAIA generates a robust, persistent tactile allodynia, and this hypersensitivity remains after the clinical signs of inflammation have disappeared. However, cold allodynia responses showed correlation with clinical signs of inflammation after showing an increase then returned to baseline levels. At the peak of joint inflammation (days 8-12), reduced tactile allodynia thresholds were increased with i.p. diclofenac, buprenorfine and gabapentin, but not with anakinra. After resolution of inflammation (days 26-31) only buprenorfin and gabapentin were effective.

It has been implicated that spinal glia has been to play important roles in different models of persistent pain. Our immunohistochemistry results showed that astrocytes are activated in the spinal cord 29 days (late timepoint) subsequent to CAIA induction, while no activation of microglia was found at early (day13) or late timepoint. These results, indicates that astrocyte activation in the spinal cord could be correlated with persistent allodynia.

As a result, CAIA model provides a new tool to dissect mechanisms driving arthritis-induced pain and may aid in the search for novel treatment strategies to relieve pain in conditions like RA.

İÇİNDEKİLER

ÖZET

ABSTRACT

I. GİRİŞ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Romatoid Artrit Etiyolojisi ve Patogenezi.....	4
2.1.1. Romatoid Artrit Etiyolojisi	
2.1.2. Histolojik Değişiklikler	
2.1.3. Hücresel İnfiltrasyon	
2.1.4. Sitokinlerin Rolü	
2.1.5. Enzimatik Faktörler ve Adezyon Molekülleri	
2.2. Kollajen Antikoru İle İndüklenen Artrit (KAİA).....	9
2.3. Ağrının Tanımı ve Temel Kavramlar.....	12
2.3.1. Ağrının Sınıflandırması	
2.4. Ağrının Fizyoanatomisi.....	14
2.4.1. Nosisseptör ve Çevresi	
2.4.2. Dorsal Boynuz Nöronal Sistemi	
2.4.3. Çıkan (Asendan) Ağrı Yolakları	
2.4.4. İnen (Desendan) Ağrı Yolakları	
2.4.5. Serebral Kortekste Ağrı Algılanması	
2.5. Deneysel Ağrı Modelleri.....	27
2.6. Artritte Ağrı Mekanizmaları.....	34
2.6.1. Periferel Sensitizasyon	
2.6.2. Santral Sensitizasyon	
2.7. Deneysel Romatoid Artrit Modelleri.....	40
2.8. Glia Hücreleri ve Ağrı.....	41

2.9.	Farmakolojik Tedavi.....	45
2.9.1.	Diklofenak	
2.9.2.	Buprenorfin	
2.9.3.	Gabapentin	
2.9.4.	Anakinra	
III.	MATERYAL ve METOD.....	49
3.1.	Hayvanlar.....	49
3.2.	Antikor Kokteylinin Hazırlanması.....	49
3.3.	Antikor Transferi.....	50
3.4.	Hayvanların Tartılması.....	50
3.5.	Artrit Klinik Skorlanması.....	50
3.6.	Nosiseptif Davranışın Değerlendirilmesi.....	51
3.6.1.	Taktil (Mekanik) Allodini	
3.6.2.	Soğuk Allodini	
3.7.	İmmünohistokimya.....	53
3.7.1.	Görüntü Alma	
3.7.2.	Hesaplama	
3.7.2.1.	Lamina 1-3/4'ün Hesaplanması	
3.7.2.2.	Lamina 1-2'nin Hesaplanması	
3.8.	Western Blot.....	57
3.8.1.	Protein Ekstraksiyonu	
3.8.2.	Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması	
3.8.3.	Örneklerin Hazırlanması	
3.8.4.	Jel Elektrofrezisi ile Protein Seperasyonu	
3.8.5.	Jelden Membrana Transfer	
3.8.6.	Görüntü Alma	
3.8.7.	Hesaplama	
3.9.	Farmakolojik Tedavi.....	61
3.10.	İstatistiksel Analiz.....	62

IV. BULGULAR.....	63
4.1. Vücut Ağırlıklarının Takibi.....	63
4.2. Klinik Skor.....	63
4.3. Nosisseptif Yanıtın Karakterizasyonu.....	63
4.4. İnflamatuvar Dönemde Farmakolojik Tedavi.....	68
4.4.1. Artritli Farelerde Diklofenak'ın Etkisi	
4.4.2. Artritli Farelerde Buprenorfin'in Etkisi	
4.4.3. Artritli Farelerde Anakinra'nın Etkisi	
4.4.4. Artritli Farelerde Gabapentin'in Etkisi	
4.5. Post-inflamatuvar Dönemde Farmakolojik Tedavi.....	71
4.5.1. Artritli Farelerde Diklofenak'ın Etkisi	
4.5.2. Artritli Farelerde Buprenorfin'in Etkisi	
4.5.3. Artritli Farelerde Gabapentin'in Etkisi	
4.5.4. Artritli Farelerde Anakinra'nın Etkisi	
4.6. Spinal Glia Aktivasyonunun Değerlendirilmesi.....	74
4.6.1. Lamina 1-3/4'deki Spinal Astrosit Aktivasyonu	
4.6.2. Lamina 1-2'deki Spinal Astrosit Aktivasyonu	
4.6.3. Lamina 1-3/4'deki Spinal Mikroglia Aktivasyonu	
4.6.4. Lamina 1-3/4'deki Spinal Mikroglia Aktivasyonu	
4.7. Lumbar Spinal Kord alpha-2 delta-1 ($\alpha 2\delta 1$) Aktivitesinin	
Değerlendirilmesi.....	78
V. TARTIŞMA.....	80
VI. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	94
VII. KAYNAKLAR.....	96
VIII. ÖZGEÇMİŞ.....	103

I.GİRİŞ

Romatoid artrit (RA) etiyolojisi bilinmeyen, otoimmün bir hastalıktır. RA'in göstergesi eroziv inflamasyon olup, bunun histolojik olarak göstergesi de lenfositlerin ve granülositlerin etkilenen eklem infiltrasyonu, eklemi saran sinovyal tabakanın neovaskülarizasyonu (yeniden damarlanma), sinovyal fibroblastların ve makrofajların proliferasyonu, artiküler kartilajın yüzeyi üzerinde pannus (inflamatuvar dokunun) gelişimi ve sunkondral kemiğin aşınmasıdır. Bu proliferatif sürecin klinik kanıtı çoklu eklemlerde şişlik, eritem ve ağrıdır. Eklem yıkımında, kemik erozyonu ve iskelet kaybı ile birlikte artış görülür. Makrofajlar, dendritik hücreler, fibroblast-benzeri hücreler, mast hücreleri, eozinofiller, nötrofiller, T ve B lenfositleri gibi çeşitli hücreler bu sürece katılır ve belirli antikorların, sitokinlerin, kemokinlerin, metalloproteinaz ve serin proteinazlar gibi çeşitli enzimlerin de üretimi artar (Rowley ve ark., 2008).

RA'de hareket sırasında ve eklem artıklarına hafif bası uygulandığında artan ağrı ve yanı sıra devam eden ağrı görülür (Leffler ve ark., 2002). Ağrı, RA hastalarında en rahatsız edici semptomlardan olup, RA'li hastalar ağrı şikayetlerinde meydana gelecek azalmayı en yüksek öncelik olarak tanımlamaktadır (Heiberg ve ark., 2005). Bugün RA hastalarında çeşitli tedavi seçenekleri hastalığın klinik belirtilerini azaltmakla birlikte eklem ağrıları için kesin bir çözüm sunamamaktadır. RA hastalarında ağrı ve ağrının azaltılması ve/veya tamamen ortadan kaldırılması önemli bir sorundur (Christianson ve ark., 2010).

İnflamasyon ve inflamatuvar ağrının çalışıldığı pek çok deneysel model bulunmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanlar, inflamasyon mediyatörlerinin diz (intra-artiküler) veya pençe içine (intra-plantar) enjeksiyonu şeklindedir. Bu modeller kontralateral uzvun internal kontrol olarak kullanılmasını sağlayan monoartrit modelleri meydana getirir. Bazı yönlerden başarılı olmakla birlikte bu modellerdeki inflamasyon akut ve yapısı genellikle kendini sınırlayıcı niteliktedir (Inglis ve ark., 2007). Bu nedenle de kronik inflamasyonun değerlendirilmesi için uygun değildir. Ayrıca bu modellerin çoğu hastalığın insandaki klinik profilini, kronikliğini ve patogenezini tam olarak yansıtamamaktadır (Christianson ve ark., 2010). Bu nedenle öncelikle hastalığın

insandaki patogenezi başarılı olarak taklit eden bir inflamatuvar ağrı modelinin oluşturulması önemlidir.

Çalışmamızda, yeni bir kronik inflamatuvar ağrı modeli olarak kollajen antikorlu ile indüklenen artrit (KAİA) modelini bu bağlamda yararlı olabileceği amacıyla kullandık. KAİA modeli romatoloji alanındaki en yaygın model olan kollajen ile indüklenen artrit (KİA) modelinden geliştirilmiş bir modeldir. RA'in heterojenitesinden dolayı çalışılacak faz veya mekanizmaya göre farklı hayvan modellerine ihtiyaç duyulmaktadır. KAİA modeli de immün yanıtın priming (başlangıç) fazı olmaksızın artrit inflamatuvar (efektör) fazının çalışılmasına olanak sağlamaktadır. (Holmdahl, 2007).

KAİA, kollajen tip II (CII) spesifik, artritogenik monoklonal antikorların (mABs) karışımından hazırlanan kokteylin pasif transferi ile gerçekleşir (Nandakumar ve Holmdahl, 2007). CII, RA patogenezi ile ilişkili eklem spesifik bir otoantijendir (Burkhardt ve ark., 2005). Antikor kokteylinin kuyruk veninden intravenöz (i.v.) enjeksiyonunun ardından antikorlar CII üzerindeki konformasyonel üçlü sarmal epitoplara (J1, C1, D3 ve U1) bağlanarak, bu konformasyonel yapının değişmesine neden olur. Daha sonra intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edilen lipopolisakkarit (LPS) de artrit insidansını ve şiddetini artırır. Sonuç olarak da hızlı bir şekilde gelişen artrit-benzeri bir tablo meydana gelir. İnsanlardaki RA ile patolojik ve histolojik açıdan pek çok benzerlikler göstermesi, bir poliartrit modeli olması, enjeksiyonun ardından hızlı bir şekilde artrit tablosu gelişmesi, yüksek uptake (alım) oranı, genetik açıdan modifiye edilmiş hayvanlarda çalışma olanağı sunması (Nandakumar ve Holmdahl, 2007) ve hayvanların genel sağlık durumlarının uzun süreli takibe olanak sağlayacak şekilde iyi olması modelin üstünlükleri arasında yer alır.

KAİA modeli romatoid artrit modeli olarak pek çok çalışmada kullanılan hayvan modeli olmasına karşın (Nandakumar ve ark., 2003; 2004; Rowley ve ark., 2008), deneysel inflamatuvar ağrı modeli olarak önceki çalışmalarda değerlendirilmemiştir. İnsanlarda ve çeşitli hayvan modellerinde eklemlerdeki persistan inflamasyonun devam eden ağrı ve zararsız uyarıya karşı hipersensivite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Artmış ağrı hassasiyetinin innerve edilen eklem, periferik sinir,

dorsal kök ganglionu (DRG) ve yanı sıra spinal kord nöronlarındaki değişikliği yansıttığı ve nosiseptif transdüksiyon sürecinde değişikliğe neden olduğu düşünlmektedir (Christianson ve ark., 2010).

Bundan başka, inflamasyon ve sinir hasarı ile indüklenen ağrı modellerinde spinal glia (mikroglia ve astrosit) aktivasyonunun spinal nosiseptif sürece katıldığı gösterilmiştir. Glia aktivasyonunu azaltan tedavilerin ağrı davranışını azaltan sonuçları da glial hücrelerin ağrı sürecindeki önemli rolünü ortaya koymaktadır (McMahon ve Malcangio, 2009).

Çalışmamızın birinci amacı amacı farelerde KAİA modelinde ağrı (nosiseptif) davranışının değerlendirilmesi, farklı farmakolojik gruplardan ilaçların antinosiseptif etkilerinin artritli farelerde araştırılmasıdır. İkinci amacımız ise çeşitli persistan ağrı modellerinde önemli roller oynadığı gösterilen astrosit ve mikroglia aktivasyonlarının bu modelde değerlendirilmesidir.

II. GENEL BİLGİLER

2.1. ROMATOİD ARTRİT ETİYOLOJİSİ ve PATOGENEZİ

Romatoid artrit (RA) sinovyal eklemleri etkileyen kompleks inflamatuvar bir hastalıktır ve toplumda görülme sıklığı yaklaşık %1'dir. Hastalık her yaşta ortaya çıkmakla birlikte en sık görüldüğü yaş 30 ve 50'li yaşlardır. Kadınlardaki görülme oranı erkeklere göre 2-3 kat fazladır (Hamuryudan, 2007).

Klinik olarak RA, simetrik poliartrit gösterir, proksimalden çok distal tutulum vardır, genellikle el ve ayaklardaki küçük eklemleri, el ve ayak bileklerini tutar. Eklem şişmesi, ağrı ve sertlik, belirgin eklem yıkımı/deformitesi ve kronik hareket kısıtlılığı, güçsüzlük ve yorgunluk belirtileri arasında yer alır.

RA'nin klinik bulguları çok geniş bir yelpazede görülebilirse de, çoğu zaman sinsi seyreder ve net bir tanı konana kadar aylar geçebilir. En belirgin semptomlar periferik eklemlerin ağrı, sertlik ve şişliğidir. Hastalığın klinik görünümü orta, kendi kendini sınırlayan artrit den morbidite ve mortaliteye sebep olan ve ani progresyon gösteren inflamatuvar artrit kadar değişken formlarda görülmektedir. Her ne kadar patolojik immün yanıtın birinci hedefi eklemler ise de RA ayrıca diğer pek çok organı etkiler. Subkutan nodüller, plörit, perikardit ve vaskülit gibi sistemik belirtiler, uzun süreli hastalık durumlarında morbidite ve mortaliteye katkıda bulunur (Sweeney ve Firestein, 2004). Hastalık aynı zamanda tedavi maliyeti, iş gücü ve üretim kayıpları gibi bir dizi toplumsal soruna yol açar (Buch ve Emery, 2002).

2.1.1. Romatoid Artrit Etiyolojisi

RA etiyolojisi henüz tam olarak açıklığa kavuşmuş değildir, ancak genetik, çevresel faktörler ve immün sistemin disregülasyonu arasındaki iç içe geçmiş ilişkinin bir sonucu olması muhtemeldir.

RA'nin oluşumunda birçok genetik faktörün riski belirlediği düşünülmektedir. Bugüne kadar risk faktörü olarak en iyi belirlenmiş olan gen HLA (Human Leukocyte Antigen, İnsan Lökosit Antijeni)'dir.

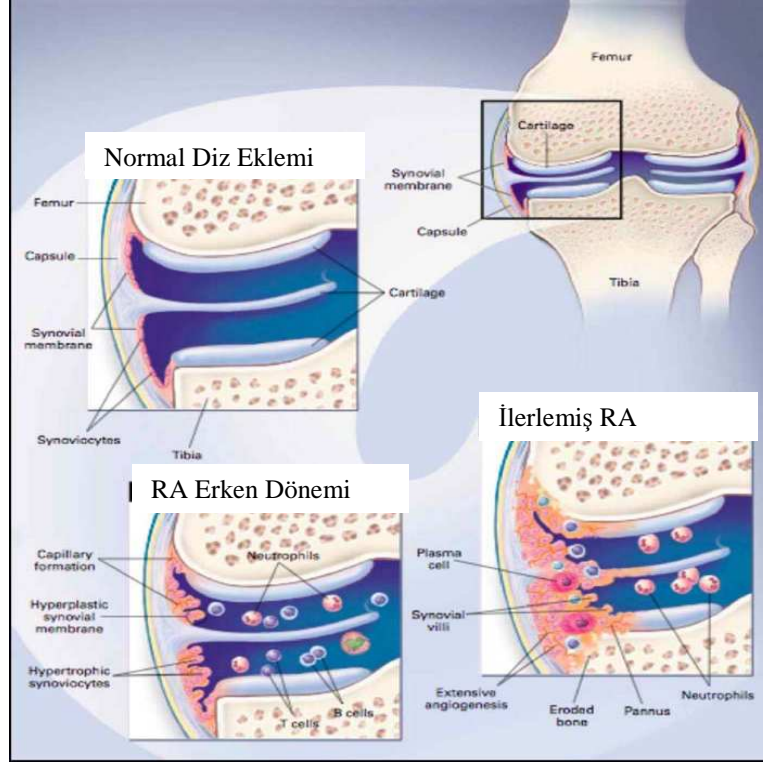
Sigara içimi RA etiyojisinde rol oynayan kanıtlanabilmiş tek çevresel faktör olarak saptanmıştır. Rubella, parvovirüs 19, Epstein barr virüsü gibi çeşitli infeksiyon

ajanları da suçlanmış ancak kesin bir ilişki gösterilememiştir. Sinovyumun lenfositik infiltrasyonu, dolaşımdaki immün kompleksler ve lenfositlerin poliklonal aktivasyonları immün sistemdeki anormal bir aktiviteye işaret ederler (Özsoy ve ark., 2006).

2.1.2. Histolojik Değişiklikler

Sinovyumun (sinovya zarı) en önemli fonksiyonu, eklem kıkırdağının beslenmesini sağlayan ve eklem sürtünmesiz hareketi için kayganlaştırıcı olan sinovyal sıvıyı salgılamaktır. Sinovyumun iki hücre katmanı vardır; iç hücre dizisi ve dış hücre dizisi. İç hücre dizisinde iki temel hücre tipi mevcuttur; **tip A (makrofaj-benzeri sinoviositler)** ve **tip B (fibroblast-benzeri sinoviositler)**. Tip A hücrelerinin fagositoz, antijen sunumu, sitokinler, büyüme faktörleri ve inhibitörlerinin sentez ve sekresyonu, birçok inflamatuvar mediyatörün ve doku yıkımına neden olan enzimlerin üretimi gibi fonksiyonları vardır. Ayrıca yeni kan damarlarının oluşumunda (neoanjiyogenez) önemli rol oynarlar.

Hastalığın erken dönemlerinde en belirgin yapı doku ödemidir. Klinik olarak, bunun göstergesi eklem şişliği ve ağrıdır. Sinovyal membran, sinovyal hücrelerin hiperplazi ve hipertrofi olmasından dolayı kalınlaşmaya başlar. Bu yeni hipertrofik sinovyumunu desteklemek amacıyla neoanjiyogenez meydana gelir. Yeni kan damarları kıkırdak ve kemiğe komşu daha derin alanlara girdikçe yıkıma neden olan maddeler daha fazla hasar oluşturur. Hastalık ilerledikçe, hiperplazi daha belirgin hale gelir ve on sıra hücreden daha kalın diziler oluşturur. Dış hücre sırası da değişikliğe uğrar. T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar ve plazma hücreleri sinovyal membrana aşırı derecede infiltre olur. Neoanjiyogenez devam eder ve hem hücresel derecesi hem de içeriği değişir. Takip eden HLA sınıf II ekspresyonundaki artışla birlikte pek çok hücre tipi aktive edilir. RA'in erken dönemlerinde sinovyal membran kartilajı istila etmeye başlar. İlerlemiş RA'de, sinovyal membran inflamatuvar dokuya, pannusa dönüşür. Bu yapı; romatoid sinovyumun kıkırdağı, kemikleri ve bağları erozyona uğratan invaziv kısımdır. Pannus tip A ve tip B sinoviositlerini, plazma hücrelerini içerir (Şekil 1), (Buch ve Emery, 2002; Sweeney ve Firestein, 2004; Sturrock, 2006; Özsoy ve ark., 2006).



Şekil 1. Romatoid artritin erken ve geç döneminde diz eklemi (Sturrock'dan, 2006)

2.1.3. Hücresel İnfiltrasyon

B hücreleri: B hücreleri RA gelişiminde başlıca etkiye sahiptir. RA hastalarında romatoid faktörün (RF) keşfi RA'ın otoimmün bir hastalık olduğunu ortaya koyan ilk kanıttır. B hücreleri ürettikleri RF olarak adlandırılan otoantikolar ile inflamatuvar sürece katkıda bulunurlar. RF, IgG'lerin Fc parçacığına bağlanan otoantikordur. RA hastalarının %80'inde bulunur, ancak hastalığa spesifik değildir. RF komplement fiksasyonu, nötrofil aktivasyonu ve inflamasyon ile sonuçlanan immün kompleksler meydana getirir. RF'den başka RA teşhisinde kullanılan ve daha spesifik olan bir diğer otoantikor anti-siklik sitrüllemiş peptid (anti-CCP)'tir. Bunlardan başka RA hastalarında pek çok otoantikor bulunmaktadır bunlardan iki tanesi anti-glukoz-6-fosfoizomeraz (anti-GPI) ve anti-kollajen II antikoları (anti-CII) patolojik etkiye sahiptir (Firestein, 2003). B hücreleri, otoantikor üretici hücre rollerine ilave olarak RA hastalarında sinovyal dokularda germinal merkezlerin (GCs) oluşumuna katkıda bulunurlar. GC'ler T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler ve foliküler dendritik

hücrelerin bir arada kümelendiği ve efektif hücre-hücre temasına izin veren bir çevrenin yaratıldığı ektopik lenfoid mikro yapılardır. (Weyand ve Goronzy, 2003). Bu yapılarda antijen sunan hücreler olarak davranabilirler. GC'lerdeki lokal immün yanıt B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasına neden olabilir (Kim ve ark., 1999). Bundan başka, B hücreleri GC'lerdeki CD4+ T hücrelerinin göreve çağrılmasında ve aktivasyonunda rol oynar. (Weyand ve Goronzy, 2003).

T hücreleri: T hücreleri hastalığın başlatılmasında ve devam ettirilmesinde rol oynayan temel mediyatörlerdir. CD8+ sitotoksik T lenfositleri ve CD4+ yardımcı lenfositler olmak üzere iki tipi bulunur. RA'de sinovyal dış hücre dizisinde bulunan temel T hücresi CD4+ tipidir. Yardımcı T hücreleri B hücrelerinin bölünmesine ve antikor üretmesine yardımcı olur, patojenleri yıkmak üzere fagositleri aktive ederler ve immün yanıtın seviyesini ve kalitesini kontrol ederler.

Fagositler: Kan monositlerini, makrofajları ve nötrofilleri içerir. Bu hücreler patojenleri, antijenleri ve hücre kalıntılarını yutarak yok ederler.

Makrofaj-benzeri hücreler: Romatoid sinovyal hücrelerin yaklaşık %20'si makrofaj-benzeri tip A sinoviositleri ve makrofajları içerir. Bu hücreler CD4+ T hücrelerine antijen sunan yüzey HLA-DR'nin yüksek düzeylerini eksprese ederler. Sinovyal makrofajlar ayrıca çeşitli sitokinlerin de kaynağıdır.

Nötrofiller: Sinovyumdaki nötrofillerin kırık hasarında ve sinovyal inflamasyonda rolleri vardır. İmmün komplekslerin sindirilmesinden sonra nötrofiller kırık ve destekleyici eklem yapılarına hasar verebilen lizozomal enzimleri ve yıkıcı oksijen içermeyen radikalleri salabilirler.

Fibroblast-benzeri hücreler: Romatoid sinovyal hücrelerinin temel komponentidir. Bunlar fagositik değildir ve yüzey HLA-DR'yi eksprese etmezler. Adezyon moleküllerini eksprese ederler ve büyüme faktörlerini salarlar. Tip B sinovyositlerinin normal fibroblastlarda meydana gelen büyüme kontrolü kaybı gösterebilecekleri düşünülmektedir. Bu da sinovyal sıranın hiperplazisine ve pannusun lokal olarak invaziv özelliklerine katkıda bulunabilir.

2.1.4. Sitokinlerin Rolü

Sitokinler hücreler arasında mesajcı görevi gören çözünen proteinlerdir. Hücre büyümesi, farklılaşma, inflamasyon gibi hemen hemen tüm biyolojik süreçlere katılırlar. Sitokinler hücrel ve humoral immün yanıtlar arasındaki dengeyi düzenlerler. Hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar etkileri vardır.

Esas olarak T lenfositleri tarafından üretilen sitokinler sinovyal sıvıda veya sinovyal hücre kültürlerinde ya yokturlar ya da azdırlar. Bu nedenle hastalığın geç dönem patogeneğinde lenfositlerin rolünün fibroblast ve monositlerden daha az önemli olduğu düşünülmektedir. Monositlerden kaynaklanan sitokinler hem eklem sıvısında hem de sinovyal doku kültürlerinde baskın oldukları görülmektedir. **TNF α** ve **IL-1 β** 'nin RA inflamatuvar yanıtında ve eklem yıkımında en önemli sitokinler olduğu düşünülmektedir.

TNF α ekspresyonunun RA'deki sinovit ve erozyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir. TNF diğer inflamatuvar sitokinleri (IL-1, IL-6, granüosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)), matriksmetalloproteinazlar (MMPs) gibi çeşitli enzimleri ve prostaglandinleri (PG) indükler adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır, osteoklastogenezis ve kemik rezorpsiyonunu kolaylaştırır.

IL-1 monosit/makrofaj kaynaklı sitokindir ve sinovyal dokuda ve sıvıda bulunur. Potent pro-inflamatuar sitokindir, osteoklast farklılaşmasında baskın mediatördür. IL-1 kondrositlerden ve fibroblastlardan TNF, kemokinler ve PG'leri indükler. Adezyon molekülü ekspresyonunu büyütür, kemik yapımını inhibe eder ve kemik rezorpsiyonunu aktive eder. Kısaca, IL-1 ve TNF α proteolitik/inflamatuar sürecin ilerletilmesinden, eklem harabiyetine neden olan enzimlerin üretimini indüklenmesinden, persistan inflamatuvar yanıtlara öncülük edilmesinden sorumludur. Anti-inflamatuar ve inflamatuvar sitokinler arasındaki dengesizliğin inflamasyonun artmasına ve doku harabiyetine katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (Tablo 1).

Tablo 1. Pro-İnflamatuar ve Anti-İnflamatuar Sitokinler (Jenkins'den, 2002)

Pro-İnflamatuar Sitokinler	Anti-İnflamatuar Sitokinler
IL-1 β ve IL-1 α	IL-10
IL-6	IL-4
IL-17	IL-13
TNF α	IL-1Ra
LT (lenfotoksin)	
LIF (lösemi inhibitör faktör)	

2.1.5. Enzimatik Faktörler ve Adezyon Molekülleri

RA kontrolsüz enzim aktivitesine bağlı eklem yıkımı ve erezyonu ile tanımlanır.

Matriksmetalloproteinazlar; tip B sinoviyositler tarafından üretilirler. Kıkırdak ve kemik degradasyonundan sorumludurlar. Diğer yıkıcı enzimler arasında; katepsinler, agregnaz-1 ve -2 (ADAMTS-11 ve -5) ayrıca iNOS, siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi indüklenbilir enzimler de rol oynar.

Adezyon moleküllerinin RA sinovyal fibroblastları üzerindeki ekspresyonu fibroblastların kıkırdağa yapışması ve yıkımını kolaylaştırması açısından önemlidir. Bunlar arasında, E-selektin, P-selektin, LFA-1, ICAM-1, VLA-4 yer alır (Jenkins ve ark., 2002; Buch ve Emery, 2002).

2.2. KOLLAJEN ANTİKORU İLE İNDÜKLENEN ARTRİT (KAİA)

KAİA, RA'de sıklıkla kullanılan hayvan modellerinden kollajenle indüklenen artritis modelinin (KİA) uzantısıdır. KİA modelinde hayvanlar adjuvan içerisindeki tip II kollajen (CII) ile immünize edilmektedir. CII oynar eklemlerin kartilajlarında ve RA'deki inflamasyon bölgesinde bulunan temel yapısal proteindir (Nandakumar ve Holmdahl, 2006). CII'ye karşı gelişen otoreaktivite hastalığın yapısını tanımlamasa da anti-CII yanıtı hastaların %30-70'inde açık olarak rapor edilmiştir (Nandakumar ve ark., 2003).

KİA modelinde CII spesifik antikorların oluşumu hastalığın oluşumu için gereklidir. RA'in erken dönemlerinde, KİA'ya duyarlılık belirli sınıf II MHC alellerinin ekspresyonuna bağlıdır. Bu nedenle T hücrelerinin rolü büyüktür. Bununla birlikte T hücre reaktivitesi tek başına KİA'daki hastalık patolojisini açıklayamamaktadır. Hem hücre hem de humoral immün mekanizmalar KİA'da hastalığın ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. B hücresi eksik farelerde genetik kökenleri KİA'ya yüksek derecede duyarlı olmasına karşın hastalık gelişmemiştir. KAİA modelinde ise kollajen antikorlarının enjeksiyonunun ardından hızlı bir şekilde artrit gelişmektedir. Her ne kadar sonuçta meydana gelen klinik artrit tablosu pek çok açıdan KİA modeli ile ortak karakteristikleri paylaşıyor olsa da KİA modelinden farklıdır. KAİA MHC alellerinden bağımsız olarak meydana gelmektedir, KAİA modelinin farklı fazlarında T ve B hücrelerine bağımlılık farklıdır. B ve/veya T hücreleri eksik olan farelerin KAİA'ya duyarlı olduğu ve antikorlar ile indüklenen artrit adaptif immün sistem yokluğunda da gerçekleştiği gösterilmiştir. B ve T hücre eksikliği olan ve kökenleri KİA'ya duyarlı farelerde yapılan çalışmada fareler sadece KAİA geliştirmekle kalmayıp daha ciddi artrit tablosu göstermişlerdir, bu sonuçlar B ve T hücrelerinin bu modelde hastalığın başlatılmasında sitokin çevresini düzenleyici ve modifiye edici rolleri olduğunu göstermektedir. Kısaca anti-CII monoklonal antikorları artrit efektor fazı süresince tek başlarına B ve T hücrelerinden bağımsız olarak hastalığın başlatılmasını sağlar (Nandakumar ve ark., 2004). Bu beklenilmeyen bir sonuç değildir, çünkü anti-CII antikorlarının yüksek seviyeleri genetik olarak yatkın sıçan ve farelerde hastalığın başlangıcında bulunmuştur ve serumdaki IgG anti-CII seviyelerinin eşik değeri hayvanda hastalığın gelişebilmesi için gereklidir. Artritli hayvanlardan elde edilen serumun, Ig fraksiyonlarının veya afinite-safılaştırılmış anti-CII antikorunun pasif transferinin patojenik olduğu ve sağlıklı deneklerde eroziv artrit indükleyebileceği gösterilmiştir (Nandakumar ve ark., 2003).

Tekli monoklonal anti-CII antikorunun sinoviti indüklediği fakat makroskobik artrite neden olmadığı bulunmuştur. Bununla birlikte; CII'ye karşı çeşitli antikorların kombinasyonunun, özellikle LPS ilavesiyle tam gelişmiş artrite neden olduğu kanıtlanmıştır. Kendisi artritogenik olmayan LPS'in simültane enjeksiyonunun artrit indüklemek için gerekli olan patojenik antikor seviyelerinin eşik değerlerini düşürdüğü

gösterilmiştir. Tüm anti-CII antikor alt tipleri artritogenik olmakla birlikte IGG1 ve IgG2b isotipleri eroziv artrit meydana getirmede en etkili olanlardır.

Tekli monoklonal antikorun naif farelere enjeksiyonunun artrit meydana getirdiği bilinmektedir. IGG1, IGG2a ve IgG2b tüm alt sınıflar test edilmiş hem i.v. hem de i.p. enjeksiyonlarının artrit indüklenme kapasitesinde olduğu gösterilmiştir (Nandakumar ve ark., 2003). Bizim çalışmamızda da kullanılan dört monoklonal antikor; **CIIC1**, **M2139**, **CIIC2**, **UL1**'dir. Bu monoklonal antikorlar CII'nin üçlü sarmal yapısı üzerinde bulunan, iyi tanımlanmış dört temel epitopuna (C1, J1, D3, U1) spesifik olarak bağlanırlar (Tablo 2), (Nandakumar ve Holmdahl, 2005).

Tablo 2. Anti-CII Spesifik Monoklonal Antikorların Özellikleri (Nandakumar ve Holmdahl 'dan, 2005)

Antikor	Epitop	Üçlü Sarmal Epitopun α-zincir Sekansı^a	İzotoplar
CIIC1	C1 ^b	358–363: ARGLT	IgG2ak
M2139	J1	551–564: GERGAAGIAGPK	IgG2bk
CIIC2	D3	687–698: RGAQGPPGATGF	IgG2bk
UL1	U1	494–504: GLVGPRGERGF	IgG2bk

^a Tüm epitoplar doğal üçlü sarmal formundadır. Amino asit kısaltmaları; G = glisin, P = prolin veya hidroksiprolin, E = glutamik asit, R = arjinin, K = lizin, H = histidin, F = fenilalanin, A = alanin, L = lösin, T = treonin, Y = tirozin.

^b C1 epitopu üç farklı epitop içerir (C1^I; C1^{II}; C1^{III}). CIIC1 tüm C1 spesifik antikorların bağlanması için kritik olan epitopun en kısa parçasına bağlanır.

KAİA modelinde görülen polimorfonükleer ve mononükleer hücrelerin infiltrasyonu, pannus oluşumu, kartilajdaki bozulma ve kemik erozyonları gibi değişiklikler insandaki RA ile belirgin benzerlikler gösterir (Khachigian, 2006).

KAİA modelindeki inflamatuvar yanıt makrofajların ve nötrofillerin Fc reseptörlerinin anti-CII antikorları ile birleşmesi ve bu birleşmenin bu hücreleri aktive etmesi aracılığıyla olur. Fc γ R- ziciri eksik DBA/1 farelerde anti-CII antikorlarının enjeksiyonu artrit meydana getirmemiştir (Nandakumar ve ark., 2003). Aktive olmuş makrofajlar ve nötrofiller patojenik olan TNF- α ve IL-1 β salarlar. Bu faktörlerin önemi,

IL-1R-/- ve TNFR -/- fareler kullanılarak yapılan bir çalışmada artrit gelişmemesi sonucuyla gösterilmiştir (Kagari ve ark., 2002). Bundan başka hem klasik hem de alternatif kompleman yollarının KAİA aracılı inflamasyonda önemli rol oynadığı da gösterilmiştir (Hietala ve ark., 2002).

2.3. AĞRININ TANIMI ve TEMEL KAVRAMLAR

İnsanlığın en kötü düşmanı olarak tanımlanan ağrı ile insanoğlunun savaşı geçmişten günümüze farklı zamanlarda ve farklı kültürlerde zaman içerisinde giderek lehimize olan gelişmeler göstererek devam etmektedir. Ağrı konusundaki ilk teorilerin ortaya çıkmaya başladığı dönem eski Yunan ve Roma uygarlıkları dönemleridir. İlk defa bu dönemde duyumsama teorisinden ve beynin ve sinir sisteminin ağrı algılanmasında bir rolü olduğundan bahsedilmiştir. 17. yüzyılda filozof ve bilim adamı Descartes ağrının tek bir kanal aracılığı ile deriden beyne transfer edildiği teorisinin temelini ortaya atmıştır. Zararlı (noksius) bir uyarana karşı karşıya kalan ayağın istemsiz olarak geri çekilmesinden yola çıkan bu refleks teorisi ne yazık ki, 330 yıldan daha uzun bir süre ağrının hem araştırılmasında hem de tedavi edilmesinde kullanılmıştır. 19. yüzyılda morfin, kodein gibi maddeler keşfedilmiş ve bunlar ağrı tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bunu aspirinin keşfi takip etmiştir. Ancak, 1965 yılında Wall ve Melzack'ın **kapı kontrol teorisi** ile birlikte ağrı çalışmalarında yeni bir sayfa açılmış ve spinal sensitizasyon, santral sinir sistemi (SSS) plastisitesi gibi kavramlar ortaya çıkmıştır (Erdine, 1987; Deleo, 2006).

Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği (International Association for the Study of Pain, **IASP**) ağrıyı; doku hasarı veya potansiyel doku hasarı ile birlikte olan ya da böyle bir hasar süresince tanımlanan, hoş olmayan sensoryal ve emosyonel bir deneyim olarak tanımlamaktadır (IASP, 2007).

Zararlı uyarının varlığında organizmayı haberdar eden ağrı, fizyolojiktir ve alarm görevi vardır. Yaşam için gerekli olan bu uyarı uyarıcı yoğunlaştığında veya uzun sürdüğünde patolojik karakter kazanmakta ve öyle ki uyarıcı sonlandığında bile ağrı devam edebilmektedir (Aydınlı, 2005). Duyusal ve fizyolojik bir deneyim olan ağrının dört komponenti vardır; duyusal diskriminatif boyut, afektif-motivasyonel boyut, kognitif değerlendirme boyutu ve davranışsal boyut (Calvino, 2006).

Ağrı her zaman s¼bjektif bir olgudur. Her birey yaşamı boyunca karşı karşıya kaldığı darbeler sonucu bu deneyimi edinir. Ağrıyı belirtmek için her kişi tarafından kullanılan kriterler ve alınacak tavır önemli derecede farklılık gösterir. (Riedel ve Neeck, 2001).

2.3.1. Ağrının Sınıflandırması

Ağrı; farklı kaynaklarda çok çeşitli şekillerde sınıflandırılmıştır. Raj ağrıyı süresine, nörofizyolojik mekanizmalara, etiyojisine ve kaynaklandığı bölgeye göre şu şekilde sınıflandırmıştır (Aydın, 2002):

a. Nörofizyolojik mekanizma

- i. Nosiseptif
- ii. Somatik
- iii. Viseral
- iv. Nöropatik (non-nosiseptif)

b. Süreye Bağlı

- i. Akut
- ii. Kronik

c. Etiyolojik

- i. Kanser ağrısı
- ii. Postherpatik nevralji
- iii. Orak hücre anemisine bağlı ağrı
- iv. Artrit ağrısı

d. Bölgesel Ağrı

- i. Baş ağrısı
- ii. Yüz ağrısı
- iii. Bel ağrısı
- iv. Pelvik ağrı

Akut Ağrı: Akut ağrı bir sendrom, bir hastalık değil, bir semptomdur. Daima nosiseptif nitelikte olup, vücuda zarar veren bir olayın varlığını gösterir. Neden olan lezyon ile ağrı arasında yer, şiddet ve zaman bakımından yakın ilişki vardır. Nedenleri arasında; travma, enfeksiyon, doku hipoksisi ve inflamasyon sayılabilir. Post-operatif, post-travmatik ve obstetrik ağrı akut ağrıya örnek olarak verilebilir (Morgan ve ark., 2002).

Kronik Ağrı: Kronik ağrının standart tanımlaması IASP tarafından yapılmıştır ve buna göre kronik ağrı herhangi bir hasarın ardından iyileşme sürecinden sonra da devam eden ağrıdır Ancak iyileşme sürecinin ne zaman sona erdiğine karar vermek güçtür, bunun yerine, genel klinik tanımlamaya göre persistan ağrı; ağrının ilk başlangıcından itibaren devam eden sabit bir zamandır. Kronik sırt ağrısı için bu zaman 6 ay iken, post-herpatik nöralji için 3 aydır. Bunlar tamamen fonksiyonel ve nisbeten keyfi zaman süreleri olup altta yatan mekanizmalar ile çok az ilişkileri vardır (Apkarian ve ark., 2009). Kronik ağrıya bağlı olarak ortaya çıkan diğer bozukluklar kronik ağrıyı bir sendrom haline getirir. Çoğu kez nosiseptif nitelikte olup uyarıcı işlevi geçtikten sonra, kişinin hayat kalitesini değiştiren, kişileri anormal davranışlara yönelten, psikolojik etkenlerin rol oynadığı kompleks bir tablodur. Kronik ağrı en çok kas, tendon, iskelet, kronik organ hastalıklarında, periferik sinirlerin ve sinir köklerinin, dorsal ganglionların (kozalji, fantom ağrısı, post-herpatik nöralji) ve santral sinir sisteminin bozukluklarında (apopleksi, medulla spinalis hasarı) gözlenir. Akut ağrıdaki kadar otonomik cevaplar yoktur (Aldemir, 2000).

2.4. AĞRININ FİZYOANATOMİSİ

2.4.1. Nosiseptör ve Çevresi

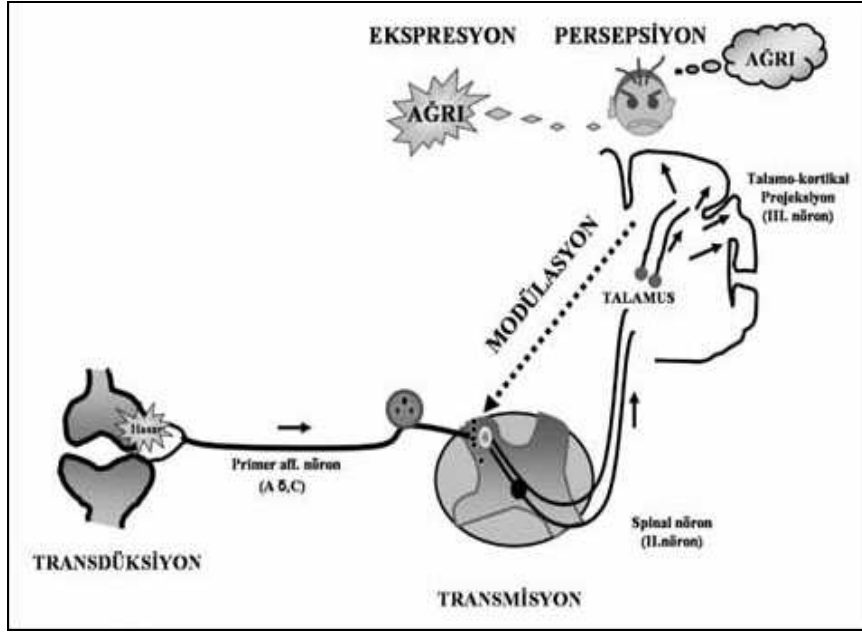
Esas olarak, ‘ağrı sistemi’ ‘nosiseptif sistem’ olarak adlandırılabilir çünkü ağrı nosisepsiyonun subjektif bir sonucudur (Schaible ve Richter, 2004). **Nosisepsiyon** ise, bedenin bir bölgesinde oluşan doku hasarının, **nosiseptör** ile alınıp santral sinir sistemine götürülmesi, belirli bölge ve nöral yapılarla entegrasyonu sonucu bu zararlı durumun algılanması; buna karşı gereken fizyolojik, biyokimyasal ve psikolojik önlemlerin harekete geçirilmesidir (Durmaz, 1998).

Tüm nosiseptif uyarılar ağrı oluşturur, ancak tüm ağrılar nosisepsiyondan kaynaklanmaz (Aydın, 2002). Nosiseptörler; deri, subkutan doku, periost, eklem kapsülü, kas (çizgili ve düz), plevra, adventisya ve peritonda lokalizedir (Aydınlı, 2005). Ayrıca, deride ve derin dokularda normal şartlarda uyarılması çok zor olan sessiz nosiseptörler vardır bunlar inflamasyon gibi durumlarda uyarılabilir hale gelir. (Schaible ve Richter, 2004).

Bir duyu sistemi olarak nosiseptif sistemi diğer duyu sistemlerinden ayıran özellikler vardır. Nosiseptif sistemin nöronlarının uyarılma eşiği diğer duyu sistemlerinden daha yüksektir. Uyarılma eşiği dokunmaya ve basınca karşı olan cevap eşiğinden yüksek, ama doku hasarı için gereken düzeyden düşüktür. Bu da alarm fonksiyonunun gereğidir. Nosiseptif sistemi diğer duyu sistemlerinden ayıran bir diğer özelliği de hassaslaşmasıdır. Yeterli güçteki tekrarlayan uyarılar nosiseptif nöronların hassasiyetini artırır (Aydınlı, 2005).

Ağrının algılanması, kısaca periferden serebral kortekse iletilmesidir. Bu aşağıda açıklanan ve birbirini takip eden dört aşamada gerçekleşir. Nosiseptörlerin ağrı algılanmasındaki fonksiyonları; transdüksiyon ve transmisyonudur.

- a. Transdüksiyon:** Sinirlerin sensoryal uçlarında, uyarının (mekanik, kimyasal, termal) elektriksel aktiviteye dönüştürüldüğü aşamadır.
- b. Transmisyon:** İmpulsun sensoryal sinir sistemi boyunca yayıldığı aşamadır.
 - i. Primer sensoryal aferent nöronların elektriksel aktiviteyi spinal korda iletmesi
 - ii. Uyarının spinal kordda, çıkan (asendan) ileti sistemi ile beyin sapı ve talamusa iletilmesi
 - iii. Talomokortikal projeksiyon
- c. Modülasyon:** Nosiseptif transmisyonun nöral etkenlerle modifiye olmasıdır. Esas olarak spinal kord düzeyinde meydana gelir.
- d. Persepsiyon:** Bireyin psikolojisi ile etkileşimi ve sübjektif emosyonel deneyimleri sonucu gelişen, uyarının algılandığı son aşamadır (Aydın, 2002).



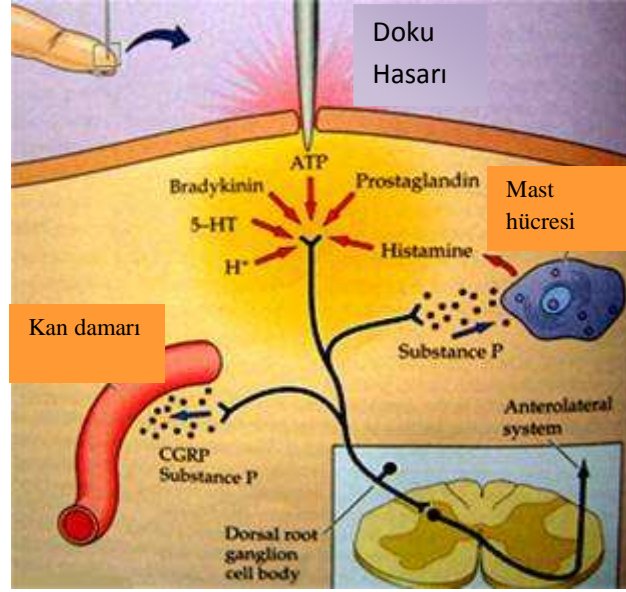
Şekil 2: Ağrı oluşum süreçleri (Aydınlı'dan, 2005)

Nosiseptörler yüksek şiddetteki mekanik, termal, kimyasal stimüluslara karşı hassastırlar. Mekanik uyarılar nosiseptörü fiziksel olarak doğrudan uyarır ve terminal bölgede iyon aktivitesini değiştirerek aferent liflerde kısa süreli deşarjlara neden olur. Termal uyarının aferent terminallerde selektif bir depolarizasyona yol açtığına dair kesin bir bulgu yoktur ancak bu uyarılar bazı kimyasal maddelerin salgılanması yoluyla ağrı mekanizmasına katkıda bulunabilir. Nosiseptörler herhangi bir zararlı uyarın veya inflamasyon sonucu doku hasarı oluşması ile ortaya çıkan ve endojen aljezik madde olarak adlandırılan kimyasal maddeler ile de uyarılabilir, aşağıda bu kimyasal maddeler ve ağrı iletimindeki rolleri açıklanmıştır (Şekil 3),

a. Nosiseptörlerin doğrudan aktive edilmesi:

- i. Doku hasarı sırasında hücre zarı permeabilitesi ve bütünlüğünün bozulması, lokal hücre yıkımı sonucu proteolitik enzimlerin açığa çıkması ve hücre dışına çıkan maddelerin hızlı biyokimyasal reaksiyonları sonucunda, bradikinin meydana gelir. Bradikinin, doğrudan nosiseptörü uyarır, damarlarda vazodilatasyon yapar, hücre zarına etki edip PG oluşmasına yol açar.

- PG'ler tek başlarına ağrı oluşturmaz, nosiseptörleri diğer uyarılara karşı hassaslaştırırlar, lokal hiperemi ve vasküler permeabilite artışına neden olurlar.
- ii. Trombosit kaynaklı serotonin (5-HT), nosiseptörü doğrudan aktive eder. Vasküler orjinli ağrıların patogeneğinde rol alır. Hücre zarına etkisi ile de PG salgılanmasına yol açar.
 - iii. Doku hasarı ile parçalanan hücrelerden intrasellüler potasyum (K^+) iyonları da dışarı çıkar. K^+ , doğrudan nosiseptör aktive edici özelliğe sahiptir.
 - iv. Mast hücresinden salınan histamin nosiseptörü doğrudan aktive eder.
- b. Nosiseptörlerin duyarlılığının artırılması:** Doku travması sırasında doğrudan hücre membranına olan etki ile 5-HT ve bradikininin hücre membranındaki fosfolipidler üzerine etkisi ile PG ve lökotrienler (LT) serbestleşir. Sempatomimetik aminler, PG ve LT; nosiseptörlerin duyarlılığının artmasına neden olurlar.
- c. Vazodilatasyon ve ekstrasvazasyon ile ödemin yayılmasına ve hiperaljeziye yol açılması:** PG'ler, nosiseptör duyarlılığını artırmaları yanında lokal dolaşımında vazodilatasyonu artırarak daha fazla aljezik madde birikmesine yol açarlar. Primer aferent sensoryal liflerden salınan P maddesi ve kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) mast hücrelerinden histamin serbestleşmesine yol açar (Erdine, 1987; Durmaz, 1998; Aydın, 2002).



Şekil 3. Nosisepsiyonun başlatılması (www. pacificu.edu)

Nosiseptif sistem periferden kortekse kadar uzanan, esas olarak birbirlerine zarar bilgisini sinaplarla ileten üç ana sensoryal nöron grubunu kapsamaktadır; Primer afferent sensoryal nöron (I. nöron grubu), spinal nöron (II. nöron grubu) ve talamo-kortikal projeksiyon nöron grubu (III. nöron grubu) (Şekil, 4), (Aydın, 2005).

Nosiseptörler tarafından algılanan ağırlı uyaran ağrı iletimi ile ilgili primer aferent sinir lifleri; **A δ** ve **C lifleri** ile üst merkezlere iletilir. Primer aferent lifler kendi aralarında şu şekilde sınıflandırılır (Şekil 4);

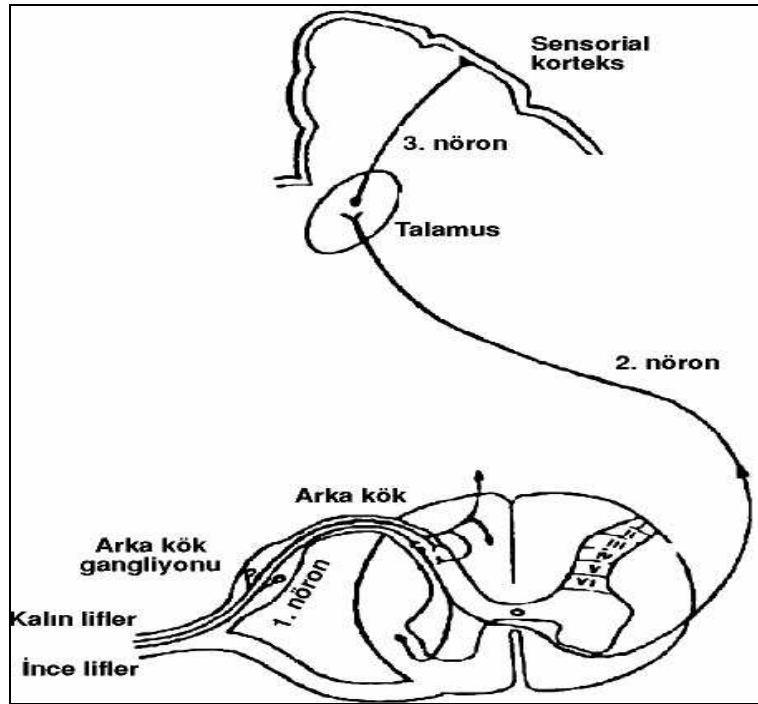
a. Kalın Lifler: Mekanoreseptörlerden orjin alan miyelinli kalın lifler; A α ve A β lifleridir. Esas olarak ağrı oluşturmeyen stimulusları iletirler. Yalnızca düşük eşik değerli mekanoreseptörlerin stimülasyonuna cevap verir. Bu sistemle beyine gelen uyarı diskriminatif (ayrışma) olarak algılanır. Bu sistemle taşınan uyarılar ağrı uyandırmamasına karşın ağırlı uyarıların modülasyonunda görev alırlar.

b. İnce Lifler: Serbest sinir uçlarındaki spesifik ağrı reseptörlerinden orjin alan lifler, ikiye ayrılırlar;

i. Miyelinli A δ Lifleri: Hızlı ileten liflerdir (20 m/sn). İnce uçlu iğne ve forseps gibi aletlerin uyarılarına hassastırlar. Dolayısıyla bu nosiseptörlerin aktivasyonu

keskin, iğneleyici ve iyi lokalize edilebilen bir ağrı oluşturur. Reseptif alanları küme kümedir. Mekanik uyarının yanısıra %20-50 oranında ısıya karşı da hassastırlar. Bu nedenle mekano-termal nosiseptörler adını alırlar. Diğer bir grup A-lifi reseptörü vardır ki, bunlar yalnızca şiddetli mekanik stimülasyona cevap veren, yüksek eşik değerli mekanoreseptörlerdir.

- ii. Miyelinsiz C Lifleri: İleti hızları 0,5-2 m/sn kadardır. Dolayısıyla daha donuk, daha yaygın ağrı ve hiperestezi (stimülasyona karşı duyarlılığın artması) oluştururlar. İnsanda C liflerinin tümüne yakınının nosiseptör özelliği taşıdığı sanılmaktadır. C lifleri polimodal özellik gösterirler. Yani yalnızca mekano-termal uyarılara değil, kimyasal uyarılara karşı da duyarlıdırlar. Reseptif alanları küçük ve dağınıktır. C lifleri, inflamasyonda olduğu gibi gecikmiş, yanıcı ve inatçı karakterdeki ağrıdan sorumludurlar (Millan, 1998; Aydın, 2002; Eilers ve Schumacher, 2005).



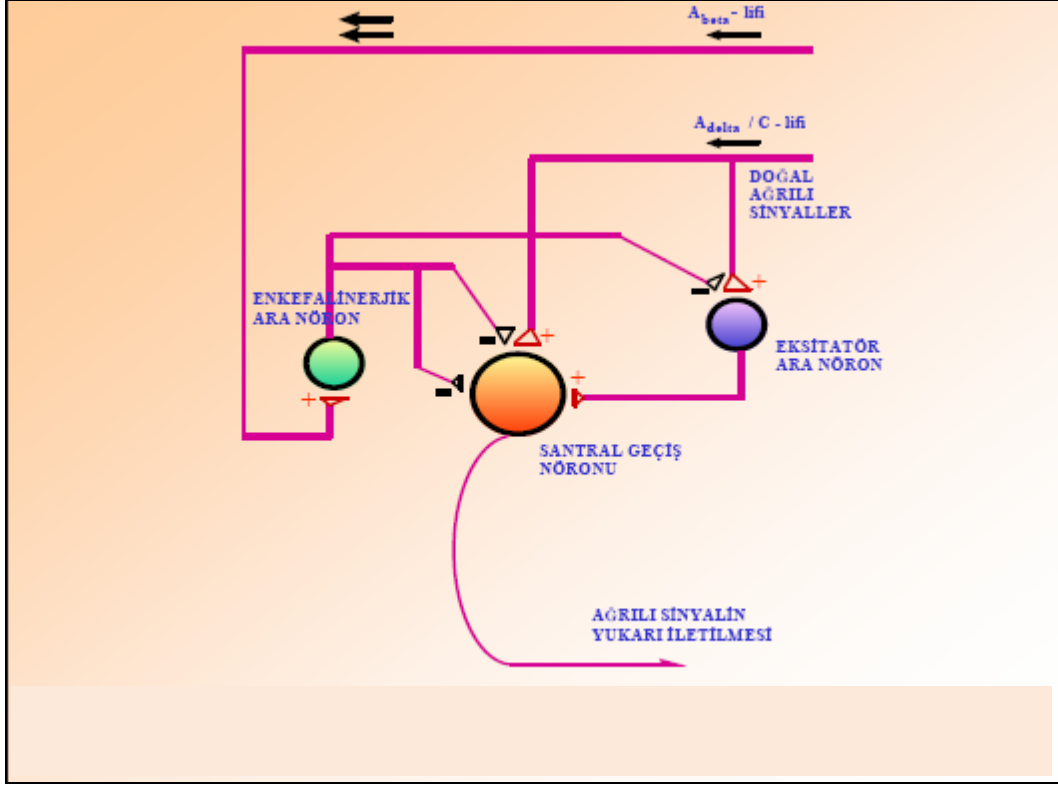
Şekil 4. Ağrının algılanması ve üst merkezlere iletilmesi (Kozanhan'dan, 2008)

2.4.2. Dorsal Boynuz Nöronal Sistemi

A δ ve C liflerinin (I. nöron) hücre gövdesi DRG'de yer alır. Burdan kalkan lifler spinal korda girer ve buradaki **Reksed Laminaları**'ndaki nöronlarla (II. nöron) sinaps yaparlar. Dorsal boynuz hücre tiplerine, aferent bağlantılara ve histokimyasal özelliklerine göre 10 laminaya ayrılır (Şekil 4).

Lamina I, en dış (marjinal) tabakadır, esas fonksiyonu küçük çaplı aferent liflerden gelen ağırlı impulsları almaktır. Dorsal boynuzun bu tabakası çok az sayıda büyük hücre içerir. Bu hücreler, cilt yanığı veya ezilmeyle (mekanik bası) oluşan, A δ ve C lifleri ile iletilen uyarıyı alırlar.

Lamina II ve III, substantia gelatinosa olarak adlandırılırlar. Ciltten gelen birçok aferent lif bu bölgede sonlanır. Bu bölge ile üst ve alttaki tabakalar arasında birçok bağlantı vardır. Lamina V' teki T hücrelerine (transmisyon hücreleri) uyarı geçişini düzenleyen bir ara sistemdir. Substantia gelatinosa sistemi T hücreleri üzerinde frenleyici bir etki gösterir ve inhibitör bir mekanizma gibi hareket eder. Ağrı oluşumunu açıklayan mekanizmalardan **kapı kontrol teorisine** göre; A δ ve C liflerinin uyarılması, substantia gelatinosa hücrelerini inhibe eder, substantia gelatinosanın outputu (frenleyici etkisi) azalır, T hücreleri üzerindeki frenleyici etki azalır (kapı açılır) veya tamamen ortadan kalkar. Bunun sonucu olarak ağırlı uyarın üst merkezlere iletilecek hale gelir. Tersine, kalın liflerin uyarılması, substantia gelatinosa hücrelerini stimüle eder, substantia gelatinosanın outputu artar, T hücreleri üzerindeki frenleyici etki artar (kapı kapanır). Sonuçta uyarının ağrı olarak algılanması azalır veya tamamen yok olur (Erdine, 1987; Aldemir, 2000; Reedel ve Neeck, 2001; Gauriau ve Bernard, 2002).



Şekil 5: Kapı kontrol teorisi (Ertekin'den, 1996)

Lamina IV, bu hücre tabakası küçük lokalize cilt alanlarından gelen, ağrı oluşturmayan duysal impulsları taşıyan, kalın kutaneal afferent lifleri alır.

Lamina V, bu tabakadaki hücreler birçok kaynaktan gelen uyarıları alır. Özellikle ağrılı stimüslara karşı çok hassastırlar. Bu hücreler viserler, kaslar, kan damarları ve derin dokulardan küçük çaplı, yavaş iletim hızlı Aδ ve C lifleri ile gelen uyarıları alırlar. Bu hücreler hem substantia gelatinosa hem de üst merkezlerle ilişki içindedir. Spinotalamik traktusların orjinini büyük oranda bu hücreler oluşturur.

Lamina VI, bu tabakadaki eksitasyon ve cevaplar büyük oranda ağrısız stimüslarla ilgilidir.

Lamina VII – IX, bu laminalar ön boynuzun parçasıdır. Bu hücreler ağrı iletimini sağlayan çıkan yollara katılır.

Lamina X, bu tabakada hücreler santral kanal etrafında yoğunlaşmışlardır ve yüksek şiddetteki stimüluslara cevap verirler. Bu hücreler, omurilikte nosiseptif bilgiyi beyine getiren multisinaptik bir zincir oluşturur.

Nosiseptif afferentler dorsal boynuzda değişik laminalarda başlıca üç nöron grubu ile sinaps yaparlar;

- a. Projeksiyon Nöronları:** Periferden duyuşsal bilgiyi beynin yüksek merkezlerine ulaştırırlar. İki tipi bulunurlar; sadece Aδ ve C lifleri ile uyarılan nosiseptif spesifik nöronlar ve hem nosiseptörlerden hem de düşük eşikli mekanoreseptörlerden lif uyarımı alan wide dynamic range (WDR) nöronları.
- b. Eksitator Ara Nöronlar:** Periferden gelen duyuşsal bilgi veya genellikle Aδ ve C liflerinden gelen ağırlı impulsar ile aktive olurlar. Bu impulsarın, beyindeki merkezlere ulaşmasında aracı olan projeksiyon nöronlarının uyarılmalarını sağırlarlar.
- c. İnhibitör Ara Nöronlar:** Yüksek merkezlere nosiseptif bilgi akışını düzenlerler geniş çaplı liflerle eksite olduklarında, projeksiyon nöronlarında inhibisyon meydana getirirler (Oğuz, 1995; Aydın, 2002).

Dorsal boynuzdaki ağırlı modülasyonunda çeşitli nörotransmitter ve nöromodulatorler rol almaktadır;

- a. Glutamat:** Aδ terminal uçlarından ve motor nöronlara sinaps yapan aferentlerden salgılanan eksitator aminoasittir. Dorsal boynuz projeksiyon hücreleri üzerinde çok kısa süreli depolarizasyon etkisini ligand kapılı Na^+/K^+ iyonlarını açarak, uzun süreli etkisini ise N-Metil, D-aspartat (NMDA) reseptörünü kullanarak gerçekleştirir.
- b. Nöropeptidler:** P maddesi, Nörokinin A, CGRP, kolesistokinin. Özellikle C lifleri eksitasyonu ile meydana gelirler. Bunlar da projeksiyon hücreleri üzerinde çok kısa ve çok uzun süreli projeksiyon yaparlar (Riedel ve Neack, 2001; Aydın, 2002).

2.4.3. Çıkan (Asendan) Ağrı Yolakları

Ağrılı uyarılar periferden A δ ve C lifleri ile arka kök spinal ganglionlardaki birinci nörona gelirler. Buradan önemli bir bölümü substansia jelatinozadaki ikinci sıra nöronlara taşınırlar. Substansia jelatinozada bulunan ikinci nöronun aksonları spinal kord düzeyinde karşı tarafa geçerek beyaz cevherin ön yan funikulusunda seyreden çıkan yolları oluşturur (Şekil 5a).

Spinotalamik Yolak: Nosiseptif uyarı geldiğinde lamina I, V ve VII. nöronlardan köken alır, orta hattı çaprazladıktan sonra karşı tarafta seyrine devam ederek talamusun ventral posterolateral çekirdeğinde (3. nöron) sonlanır. Ağrının; yer, şiddet ve zaman gibi diskriminatif boyutları ile algılanmasını sağlar. Bu tanımlayıcı yolak, ağrının yeri hakkındaki bilgiyi bilinç düzeyine ulaştırır.

Spinoretiküler Yolak: Anterolateral çıkıcı sistem içinde ilerler ve çapraz yapmış dorsal boynuz aksonlarından oluşur. Bulbus ve pontaki retiküler çekirdek gruplarına uzanır veya kollateraller verir. Spinal kordun iki tarafındaki sağ ve sol talamus intralaminar çekirdeklerine çıkar. Daha sonra nöronal bilgi singulat girusun ön parçası (emosyon), amigdala (hafıza ve emosyon), hipotalamus (emosyon ve emosyona vasküler yanıt) gibi birçok beyin bölgesine ulaşır. Acı yolağı olarak isimlendirilir. Korteksi ve subkortikal yapıları (limbik sistem ve diensefalon) genel bir uyanıklık içinde tutmak ve zararlı uyarana karşı genel bir alarm hali yaratmakla görevlidir.

Spinomezencefalik Yolak: Anterolateral sistem içerisinde periakuaduktal gri madde ve orta beynin superior kollikulusuna ulaşır. Burada diğer mezencefalik bağlantılarla da sinaps yapar. Bu yolun periakuaduktal bölgeye bağlantı yapması nosisepsiyon bakımından çok önemli görülmektedir. Çünkü burada analjezik etki sağlayan enkefalinergic nöronlar vardır.

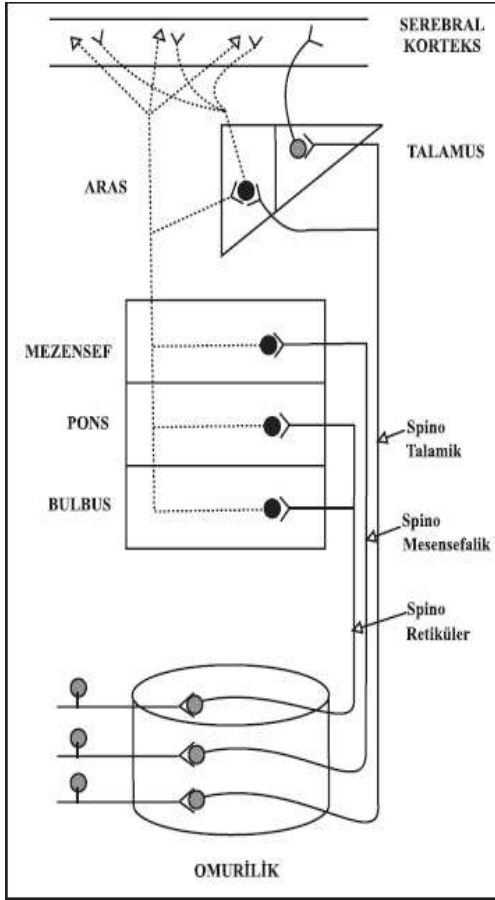
Spinohipotalamik Yolak: Retiküler formasyonda sinaps yapmayan yeni tanımlanmış bir yoldur. Deri, dudak, genital organlar, gastrointestinal traktus, intrakranial kan damarı, dil ve korneadan emosyonel önem taşıyan bilgiyi direkt olarak hipotalamusa ulaştırır (Aydın, 2002; Aydın, 2005).

2.4.4. İnen (Desendan) Ağrı Yolakları

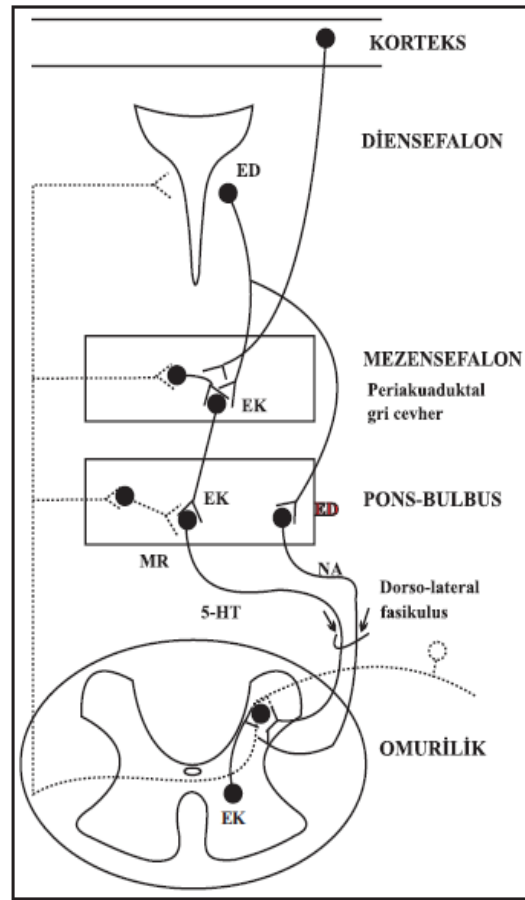
Nosiseptif olmayan liflerin (A β lifleri) aktivasyonunun dorsal boynuz nöronlarını inhibe etmesine dayanan kapı kontrol teorisinin günümüzde artık sadece tarihi değeri vardır. Ancak ağrı oluşumunda inhibisyon kavramını geliştirdiği için kıymetini korumaktadır. Bugünkü bilgilerimize göre, inhibisyonu sağlayan özel bir sistem vardır (endojen analjezi sistemi) ve bu sistemi aktive eden nosiseptif uyarılardır. Nosiseptif sistem aktive olduğunda sürekli olarak inhibe edici sistemin kontrolündedir. Bu inhibisyon hem santralde (spinal ve supraspinal) hem de periferde olmaktadır (Şekil 5b).

- i. Antinosiseptif spinal (segmental) inhibisyonda spinal kord dorsal boynuzunda presinaptik yerleşimli inhibitör internöronlar ile gerçekleştirilir. Spinal inhibisyonda rol oynayan nörotransmitterler; GABA, glisin ve opioid peptidlerdir.
- ii. Supraspinal inhibisyonda ise iki bölge rol alır; periakuaduktal gri cevher (PAG) ve lokus seruleus (LC). Mezensefalik PAG'da yer alan enkefalinergic (EK) nöronlar, serebral korteks ve hipotalamus ile bağlantı içindedirler. Büyük bir olasılıkla hipotalamik kökenli nöronlar, **endorfin** taşımaktadırlar. Enkefalinergic mezensefalik nöronlar; bulbusta nukleus rafe magnus ve nukleus reticularis gigantoseülularis'te bulunan serotonergic nöronlarla sinaps yaparlar. Böylece diensefalik endorfin ve mezensefalik enkefalin nöronları bulbustaki 5-HT nöronlarını eksite ederler. Burdan kalkan uyarılar da spinal dorsal boynuz nosiseptif projeksiyon nöronları üzerine presinaptik ve postsinaptik bağlantılarla inhibisyon meydana getirir. LC kökenli nöronlar noradrenergiktir (NA). Bulbus ve pons'ta nukleus retikularis gigantoseülularis ve nukleus retikularis paragigantoseülularisten başlayıp dorsal boynuzda uzanırlar.
- iii. Periferik inhibisyon immün sistem sensoryal-nöron etkileşimi ile gerçekleşmektedir. İnflamasyonun erken döneminde pro-inflamatuar sitokinleri açığa çıkaran immün hücreler, geç dönemde analjezik mediyatörler üreterek analjeziye katkıda bulunurlar (Aydın, 2002; Aydın, 2005).

Spinal korddan başlayarak supraspinal merkezlere ulaşan ve sonrasında genel olarak inen inhibitör sistemlerin tetiklenerek modüle edildiği ağrı duyusunda sadece inen inhibitör sistemler değil inen fasilitatör sistemler de rol alır. Bu sistemler ağrı algılanmasının artmasına neden olabilirler. İnen kontrol sistem oldukça kompleks bir yapı gösterir. İnhibitör veya fasilitatör etki nörotransmitere ve nörontransmitterin etkilediği reseptör tipine göre değişir (Millan, 2002).



Şekil 5a. Çıkan yolak (Aydın'dan, 2002)



Şekil 5b. İnen yolak (Aydın'dan, 2002)

2.4.5. Serebral Kortekste Ağrı Algılanması

Melzac ve Casey'in supraspinal ağrı mekanizmaları hakkındaki teorileri kabul görmektedir. Buna göre ağrının duysal diskriminatif ve motivasyonel-afektif komponentlerinin uzak nöral sistemlerle paralel olarak dağıldığı kabul edilmektedir. Lateral spinotalamik traktusun, talamusun lateral çekirdeğinin ve somatosensoryal korteksin, ağrının duysal diskriminatif bölgeleri olduğu, medial spinotalamik traktusun, talamusun medial çekirdeğinin ve limbik sistemle ilgili beyin bölgelerinin ise ağrının motivasyonel-afektif bölgeleri olduğu belirtilmektedir.

Değişik beyin sahalarının ağırlı uyaranlarla aktive olduğu düşünülmektedir. Bu bölgeler; talamus, putamen, kaudat nukleus, serebellum, hipotalamus, hipokampus gibi subkortikal bölgeler ve suplemer motor korteks, anterior singulat korteks, anterior insular korteks gibi serebral kortikal bölgelerdir. Beyinde lokalize ağrı merkezi yoktur. Ağrı, birçok beyin bölgesince işleme tabi tutulur.

Talamustan serebral kortekse nosisepsiyon bilgisini ileten multipl paralel yollar bulunmaktadır. Tek taraflı ağırlı uyaran (hem ipsilateral hem de kontralateral talamusu aktive eder) hakkındaki bilgi talamustan her iki serebral hemisfere direkt olarak transfer edilmektedir.

Ağrı olayında serebral korteksin görevi yeterince anlaşılammış olmasına karşın şu şekilde bilgi aktarımı olasıdır: Ağrıyla ilgili olayların kompleksliği ve beyin alanları arasındaki bağlantılara rağmen, nadiren özel beyin alanlarının birebir aktivasyonunun ağrı deneyimiyle ilişkisi vardır. Serebrum'da ağrı ile ilgili bölümler;

- i. Birinci ve ikinci duysal alanlar: Birinci duysal alan (postsentral girus); ağrının duysal diskriminatif boyutu ile ilgilidir.
- ii. Frontal lobun 9 ve 12'nci alanları: Ağrı ile birlikte motivasyon reaksiyon etkilenimini sağlar.
- iii. Posterior pariyetal bölgeler: Ağrının sembolizasyonu ile ilgilidir.
- iv. Beyinin bu bölümlerini birbirine bağlayan assosiyasyon lifleri.
(Aydın, 2002; Aydın, 2005).

2.5. DENEYSEL AĞRI MODELLERİ

Deney hayvanlarında ağrı yanıtının değerlendirilmesi amacıyla, allodini¹ veya hiperaljezi¹ ölçülmesinde kullanılan çeşitli testler ve deneysel ağrı modelleri aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir (Tablo 3 ve 4).

Tablo 3. Allodini veya Hiperaljezi Ölçülmesinde Kullanılan Testler (Sandkühler'den, 2010)

Yöntem	Testin Adı	Test Metodu	Test Alanı	Sonuç Parametreleri
Mekanik	von Frey	Deri üzerine kalibre edilmiş non-noksus statik filamanların uygulanması	Arka pençe, yüz	Pençeyi geriçekmek için gerekli kuvvet eşiği (statik mekanik hiperaljezi)
	Randal Sellito	Deri üzerine lineer olarak artan mekanik kuvvetin noksus aralık içinde uygulanması	Arka pençe	Ağrılı uyarandan pençeyi geriçekmek için gerekli kuvvet eşiği (mekanik hiperaljezi)
	–	Derinin zararsız uyararı ile fırçalanması ve vurulması	Arka pençe	Pençeyi geriçekmek için gerekli latens veya nosiseptif davranışlar (dinamik mekanik allodini)
	–	Visserin noksus mekanik stimülasyonu	Viseral organlar (kolon,mesane)	Kas kasılmalarının eşik değerleri /sayısı/ uzunluğu, otonomik cevaplar (hiperaljezi)

¹ Periferik doku veya sinir sistemi hasarının sürmesi sonucunda; ağrıyı algılamada, nöronların spontan aktivitelerinde artma görülür. Eşik üstü uyarılara yanıtta artış gibi değişiklik ortaya çıkar. Bunun sonucunda **allodini** (normalde ağrı oluşturmayacak uyarıların ağrı oluşturması), **primer hiperaljezi** (hasarın olduğu bölgede ortaya çıkan, ağrılı uyarıya artmış yanıt) ve **sekonder hiperaljezi** (hipersensitivitenin komşu bölgelere yayılması) meydana gelebilir.

Tablo 3 devam. Allodini veya Hiperajzezi Ölçülmesinde Kullanılan Testler (Sandkühler'den, 2010)

Yöntem	Testin Adı	Test Metodu	Test Alanı	Sonuç Parametreleri
Sıcak	Tail Flick- Tail immersiyon (kuyruk çekme-kuyruk daldırma)	Radyant ısının kuyruk üzerine uygulanması ya da kuyruğun sıcak su içine daldırılması	Kuyruk	Kuyruk geriçekme latensi (ısı hiperajzezi)
	Plantar Hargreave's	Radyant ısının deri üzerine uygulanması	Arka pençe	Pençe geriçekme latensi (ısı hiperajzezi)
	Hot plate (sıcak zemin)	Hayvanın ısıtılmış metal zemin üzerine konulması	Arka/ön pençe	Nosiseptif veya kaçma davranışı gösterme latensi (ısı hiperajzezi)
Soğuk	Cold plate (soğuk zemin)	Hayvanın soğuk metal zemin üzerine oturtulması	Arka pençe	Nosiseptif veya kaçma davranışı gösterme latensi (soğuk hiperajzezi)
	Soğuk su	Hayvanın derin olmayan soğuk su banyosu içine oturtulması	Arka pençe	Nosiseptif veya kaçma davranışı gösterme latensi, süresi ve nosiseptif davranışların intensitesi (soğuk hiperajzezi)
	Aseton	Deri üzerine aseton uygulanması	Arka pençe	Nosiseptif davranışların süresi veya yoğunluğu (soğuk hiperajzezi)
Elektrik	-	Elektriksel akım uygulaması	Kuyruk, pençe, visser, dental pulpa	Geriçekme eşikleri, vokalizasyon, kaçma latensi (allodini)

Tablo 4. Deneysel Ağrı Modelleri (Sandkühler'den, 2010)

Hastalık	Mekanizma	Metod İndüksiyonu	Model Adı	Meydana Gelen Nosisepsiyon				
				Mekanik allodini	Mekanik HA	Isı HA	Soğuk HA	Diğer
Periferel inflamasyon ve periferel nörojenik inflamasyon	Primer aferentlerin kimyasal uyarılması	İnflamatuar ajanın arka pençeye enjeksiyonu	Complete Freund's adjuvant (CFA)		*	*		
			Karagenan		*	*		
			Hardal yağı		*	*		
			Arı venomu	*	*	*		Arka pençe yalama, kaldırma, kaçınma
			Formalin					İki fazlı arka pençe kaçınma, yalama

Tablo 4 devam. Deneysel Ağrı Modelleri (Sanskühler'den, 2010)

Hastalık	Mekanizma	Metod İndüksiyonu	Model Adı	Meydana Gelen Nosisepsiyon				
				Mekanik allodini	Mekanik HA	Isı HA	Soğuk HA	Diğer
Artrit	İnflamasyon	Eklem içine veya kuyruğa inflamatuvar mediyatörün enjeksiyonu	Kapsaisin		*	*		Arka peçe kaçınma
			Adjuvanla indüklenen monoartrit		*	*		Değişmiş yürüme ve tutum, spontan ağrı
			Adjuvanla indüklenen poliartrit		*			Diğer sistemik değişiklik
Nöropatik ağrı, kompleks bölgesel ağrı sendromu (CRPS)	Travmatik sinir hasarı	Çeşitli periferel sinirlerde (spinal siatik vb) veya yüz sinirlerinin (trigeminal vb) hasar yapmak için kullanılan metodlar	Kronik konstrüksiyon hasarı	*	*	*	*	Arka peçe koruma, değişmiş ağırlık dayanma
			Spinal sinir ligasyonu	*				Arka peçe yalama ve kaldırma
			Parsiyal siatik sinir ligasyonu					Arka peçe koruma ve yalama
			Distal sinir hasarı					
			Bütün sinir transeksiyonu					
İskemi-reperfüzyon hasarı, CRPS, periferel iskemik hastalık	İskemi	Geçici arka peçe iskemisi ve reperfüzyon veya vasküler oklüzyon	Kronik postiskemi ağrısı		*		*	

Tablo 4 devam. Deneysel Ağrı Modelleri (Sandkühler'den, 2010)

Hastalık	Mekanizma	Metod İndüksiyonu	Model Adı	Meydana Gelen Nosisepsiyon				
				Mekanik allodini	Mekanik HA	Isı HA	Soğuk HA	Diğer
Kanser ağrısı	Dokunun kanser hücreleri ile kompresyon ve inflamasyonu	Kanser hücrelerinin intramedüller intraplantar, intragingival enjeksiyonu	Deneysel osteolitik sarkoma	*	*			
			Deneysel skuamoz hücre karsinoması		*	*		
			Deneysel melanoma		*	*		
Postopratif ağrı	Cerrahi mekanik travma	Cerrahi	İnsizyon modeli	*	*			
			Overhisterotomi	*	*			Abdominal postürler
İnflamatuvar barsak sendromu	Viseral ağrı	Boşluklu organların içine iritanların enjeksiyonu veya visereal mekanik distansiyon	Asetik asit, kapsaisin, hardal yağı, zimosan enjeksiyonu		*			Abdominal kontraksiyon veya diğer viseral nosiseptif davranışlar, uyumlu hiperaljezi
Kas ağrısı	Periferal asidozis	Gastrosinemas kasına asit enjeksiyonu	Kas ağrısı		*			
Ateş, santral sinir sistemi inflamatuvar hastalıkları	Genel immün sistem aktivasyonu	Sistemik, intratekal veya santral LPS/inflamatuvar mediyatör uygulanması	Hastalık sendromu		*	*		İnflamasyon ve enjeksiyonun (ateş, sersemlik) nosiseptif bulguları

Tablo 4 devam. Deneysel Ağrı Modelleri (Sandkühler'den, 2010)

Hastalık	Mekanizma	Metod İndüksiyonu	Model Adı	Meydana Gelen Nosisepsiyon				
				Mekanik allodini	Mekanik HA	Isı HA	Soğuk HA	Diğer
Temporomandibüler eklem inflamasyonu veya orofasyal ağrı	Orofasyal inflamasyon	İnflamatuvar ajanların (CFA vb) temporomandibüler eklem veya yüz içine enjeksiyonu	Sıçan veya fare temporomandibüler eklem ağrısı veya orofasyal ağrı		*			Yüz tımarlama kaşıma
Güneş yanığı, yanık hasarı	Temel hasara veya ışına bağlı hücre hasarı	UV-B (290-320 nm) deri ışınlama veya deri üzerine uzatılmış noksius ısı uygulaması	UV modeli		*	*	*	
			Yanık veya termal hasar modeli		*	*		
Migren	Çeşitli	Çeşitli manipülasyonlar, nörovasküler elektriksel, genetik	Çeşitli	*	*	*		
İlaçla indüklenen nöropatik ağrı		Klinik olarak kullanılan terapötik ajanların sistemik uygulanması	Kemoterapötik ajanlar (vinkristin, paklitaksel) Antiretroviral ajanlar	*	*	*		

Tablo 4 devam. Deneysel Ağrı Modelleri (Sandkühler'den, 2010)

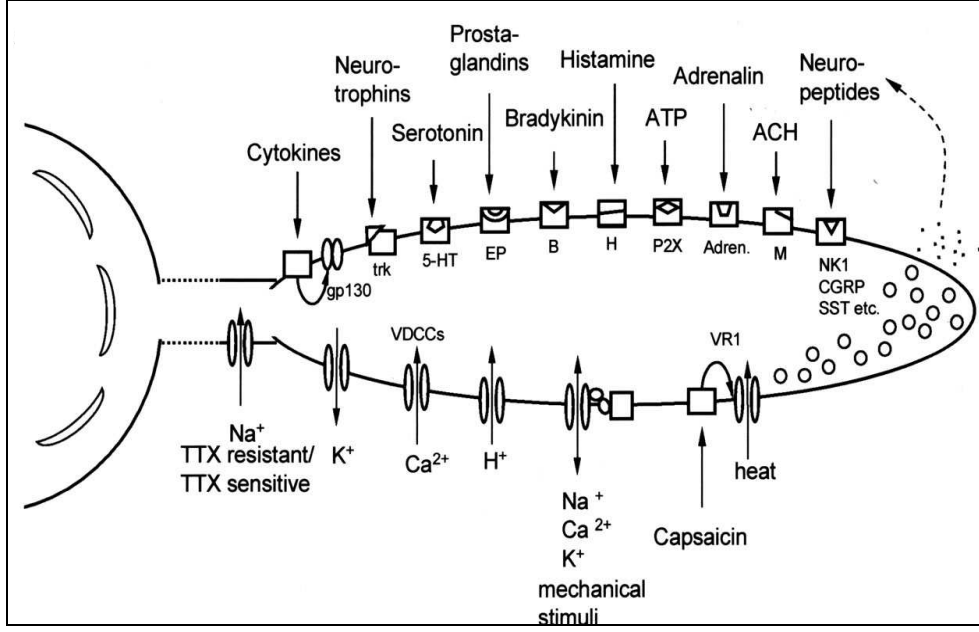
Hastalık	Mekanizma	Metod İndüksiyonu	Model Adı	Meydana Gelen Nosisepsiyon				
				Mekanik allodini	Mekanik HA	Isı HA	Soğuk HA	Diğer
Diyabetik nöropati, postherpatik nöroalji, Akut inflamatuvar demiyelinizasyon poliradikülo-nöropati	İkincil (hastalık) nöropati	Diabeti indüklemek için streptozozin enjeksiyonu, herpes simpleks tip I ile inokulasyon periferel miyelin P2 peptid ile immünizasyon	Streptozozin ile indüklenen diyabet	*	*	*	*	
			Herpes simpleks virüs inokulasyonu	*	*	*		
			Deneysel otoimmün nörit		*	*		
Spinal kord hasarı nöropatik ağrı	Spinal kord lezyonları	İskemi veya travmatik kontüzyon, kompresyon veya spinal kord transeksiyonu	Spinal kord hasarı	*	*	*	*	
Nörit, nöropatik ağrı	Nörit	Sinirler üzerine direkt olarak inflamatuvar ajanların akut veya perinöral uygulanması	Siatik inflamatuvar nörit		*			
Trigeminal nöralji	Travmatik sinir hasarı	İntraorbital sinirde veya trigeminal ganglionda hasar meydana getiren modeller	Trigeminal ganglion kompresyonu	*				

2.6. ARTİTTE AĞRI MEKANİZMALARI

Artritdeki ağrı hiperaljezi ve spontan ağrı (dinleme sırasındaki ağrı) ile tanımlanır. Bu ağrı normalde ağrı meydana getirmek için şiddeti yeterli olmayan uyaran tarafından (allodini) bile meydana getirilebilir. Artrit durumunda eklem çalışma sınırında hareket ettirildiğinde ve eklem üzerine hafif bir bası uygulandığında hiperaljezi görülür. Bu artmış ağrı hassasiyetinin nosiseptif sistemin sensitizasyonundan ileri geldiği düşünülmektedir. Eklemdeki inflamasyon periferal sensitizasyona ve santral sensitizasyona neden olur. Sinir sisteminin inflamatuvar süreci etkilemesi nedeniyle sensitizasyon eferent nöronal süreci de kolaylaştırabilir.

2.6.1. Periferal Sensitizasyon

Eklemlerdeki inflamasyon sırasında eklemdeki çok sayıda aferent nöron sensitize olur. Bazı düşük eşikli kalın ve ince miyelinize aksonlu nosiseptif mekanoreseptörler ($A\beta$ ve $A\delta$) eklem üzerine uygulanan basıya ve eklem hareketlerine artmış yanıt gösterir. Önemli olarak, nosiseptörler olarak tanımlanan çok sayıdaki yüksek eşikli üniteler sensitize hale gelir ve eklemde hafif basıya ve hareketlere yanıt vermeye başlar. Sonuç olarak, başlangıçta mekanoinsensitif olan lifler (sessiz nosiseptörler) eklemde mekanik uyarısına yanıt verir hale gelir ve inflamasyon sırasında spinal kord içine aferent akıma katkıda bulunur. Bu değişiklikler eklem ağrısının aferent duysal temelini oluşturur. Kısaca, inflamatuvar koşullar altında normalde zararsız ve ağırlı olmayan mekanik uyarı nosiseptif sistemi aktive eder. $A\delta$ ve C lifleri kimyasal mediyatörler için çok sayıda iyon kanalı ve reseptörü duysal sonlanmalarında eksprese ederler (Şekil 6).



Şekil 6. Nositseptif primer aferent nöronun iyon kanalları ve reseptörler (Schneider'dan, 2002)

Olasılıkla katyon-selektif iyon kanalları mekanik uyarının elektriksel potansiyele transdüksiyonu için esastırlar. Açılma modu tam olarak açığa kavuşturulmuş değildir. Kapsaisin tarafından aktive edilen klonlanmış vanilloid reseptörü (VR1) üzerinde durulmaktadır. Bu reseptör sadece kapsaisin tarafından değil fakat ayrıca inflamatuvar koşullarda ısı uyarını tarafından da aktive edilmektedir. Eklemleri donatan primer aferent nöronlardaki VR1 reseptörlerinin önemi henüz belirlenmemiştir. Bununla birlikte, mekanik yüksek-eşikli eklem aferentlerinin kapsaisin sensitif olması VR1 reseptörlerinin artiküler ağrı durumlarına da katkıda bulunduğunu gösterir. Tetradoksin (TTX)-dirençli ve TTX-hassas Na^+ kanalları da önemlidir. Akson ve duysal sonlanma boyunca dağılımları tam olarak bilinmemektedir, fakat küçük primer aferent nöronlarda lokalize olan TTX-dirençli Na^+ kanalları nosiseptiftir.

Sitokinler (Glikoprotein 130 (gp130) reseptör elemanlarına etki ederler) nörotrofinler (özellikle sinir büyüme faktörü (NGF) trkA reseptörlerine etki eder), 5-HT, bradikinin ve PG'ler gibi inflamatuvar mediyatörlerin reseptörleri de sensoryal sonlanmalarda yer alır. Bu maddeler inflamasyonun belirli basamaklarında üretilirler.

Bundan başka, primer aferent nöron bölümleri sensoryal sonlanmalardan salınan P maddesi (nörokinin 1 (NK1) reseptörleri) ve CGRP ile sensoryal sonlanmalardan ve diğer kaynaklardan salınan somatostatin (SST reseptörleri) gibi nöropeptidler için reseptör eksprese ederler. Bu mediyatörlerin primer aferent nöronlar üzerinde direkt eksitasyon (örn., bradikinin), diğer uyarı için sensitizasyon (örn., bradikinin ve PG) ve nöropeptidlerin sentezinin düzenlenmesi (örn., NGF) ve aktivitenin inhibisyonu (somatostatin) gibi farklı etkileri vardır. İnflamatuar mediyatörlerin çoğu depolarizasyona öncülük eden iyon akışının gerçekleşmesini sağlayan iyon kanallarının sensitivitesini değiştirebilen ikincil mesajcı sistemini aktive eder.

Son çalışmalarda özellikle primer aferent ünitelerde bulunan nöropeptid reseptör ekspresyonunun eklemde akut veya kronik inflamasyonu sırasında değişip değişmediği üzerinde durulmuştur. Sıçanlarda diz eklemde antijenle indüklenen artrit (AİA) modelinde inflamasyonun indüksiyonunun ardından çeşitli zamanlarda sıçanlar sakrifiye edilmiş ve lumbar dorsal kök ganglionları (DRG)'leri çıkarılmıştır. NK1, bradikinin reseptörü-2 (B2) ve somatostatin (sst) reseptörlerinin DRG nöronlarındaki ekspresyonu değerlendirilmiştir. AİA'nın akut fazında NK1 ve B2 reseptörlerinin ekspresyonu artmıştır. İlginç olarak up-regülasyon bilateraldir. Bu reseptör up-regülasyonu AİA'nın akut fazında inflame dize ait bacağın saklanması ve bası hipersensitivitesi gibi nosiseptif davranışların da reseptör up-regülasyonu ile örtüşmesi reseptörlerin bu davranışa dahil olduğunu göstermektedir. Ayrıca kontralateral tarafta da biraz bası hipersensitivitesi görülmüştür. AİA kronik hale geldiğinde inflame tarafta reseptörlerin ekspresyonu B2 reseptörleri hariç azdır. Ayrıca nosiseptif davranış da akut faza göre daha az belirgindir. Bu sonuç; uzamış inflamasyonun eksitator komponentlerin reseptör sayısında up-regülasyona neden olduğunu göstermektedir. Çalışmanın devamı niteliğindeki bir başka çalışmada servikal DRG'lerdeki reseptör regülasyonu da değerlendirilmiş ancak bir değişiklik bulunamamıştır. Bu da değişimin sadece segmental olduğunu genel olmadığını göstermektedir.

Bradikinin mekanik uyarı için primer aferent lifleri aktive ve sensitize eden potent aljezik mediyatördür. Olasılıkla bradikinin reseptörlerinin up-regülasyonu inflamasyon sırasındaki ağrı sensitivitesine katılmaktadır. P maddesi primer aferent üniteleri sensitize edebilir, fakat normal koşullarda bu etki güçlü değildir. Hatta bazı

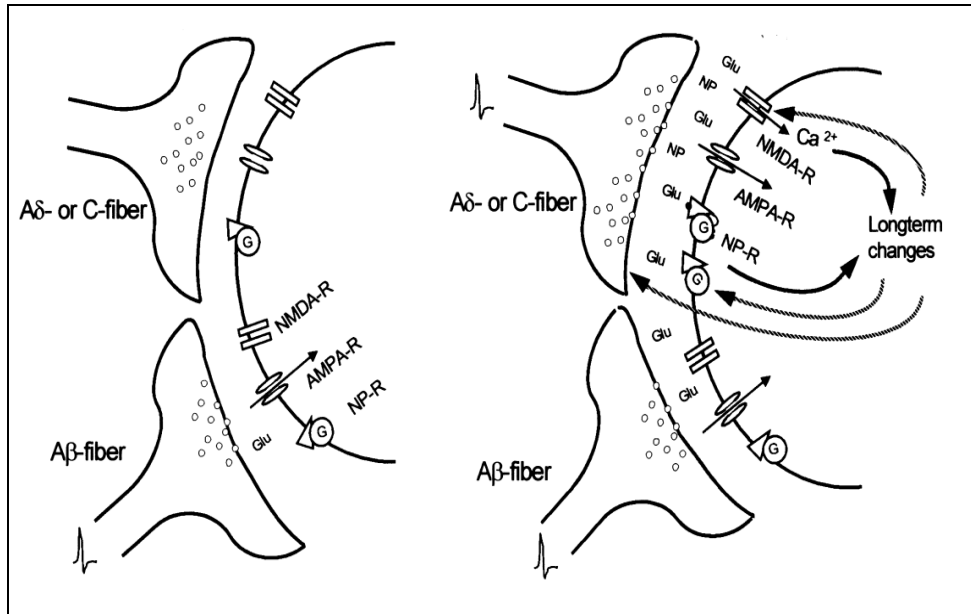
çalışmalarda primer aferent nöronlar üzerinde etkisiz bulunmuştur. Ancak inflamasyon sırasında belirgin bir up-regülasyon vardır. Ayrıca bu up-regülasyonun bilateral olması da önemlidir.

Pek çok nöron sadece eksitatör maddeler değil aynı zamanda inhibitör maddeler için de reseptör eksprese ederler. İnhibitör bir madde olan $sst_{2(b)}$ ve sst_4 de bu çalışmada değerlendirilmiştir. Pek çok DRG nöronu normal sıçanlarda $sst_{2(b)}$ reseptör ekspresyonu göstermektedir ve AİA sıçanlarda da durum farklı değildir. Bununla birlikte AİA'nın akut ve kronik fazında sst_4 reseptör up-regülasyonu vardır. Sonuç olarak, bu sonuçlar inflamasyon sırasında reseptörlerin ekspresyonunun değiştiğini ve nöronal değişikliklerin artrit farklı basamaklarında farklı olabileceğini göstermektedir.

2.6.2. Santral Sensitizasyon

Eklem inflamasyonu sırasında spinal korddaki nöronlar inflame eklem den gelen uyarı ile hipereksitabil duruma gelir. İnflamasyonun başlamasından sonra nöronlar eklem üzerindeki zararsız ve ağrılı uyarıya yanıtlarında dereceli olarak artış gösterir ve biraz gecikme ile komşu ve hatta daha uzak inflame olmayan normal dokular üzerine uygulanan basıya bile artmış yanıt verirler. Nöronlar reseptif alanlarında sıklıkla yayılma gösterirler. İnflame eklemin stimülasyonuna artmış yanıt periferel sensitizasyonun sonucu olarak eklem den gelen artmış uyarı gösteriyor olsa da, inflame olmayan dokunun mekanik stimülasyona artmış yanıtı spinal kordda oluşur. Bu nedenle de inflamasyon sırasında nöronlar belirgin olarak inflame veya inflame olmayan dokunun stimülasyonuna yanıt verir hale gelir. Santral sensitizasyonun oluşması ve devamlılığı spinal korddaki çeşitli transmitter/reseptör sistemlerinin aktivasyonu tarafından meydana getirilir. Primer aferent nöronlar sensitize hale geldiklerinde spinal terminasyonlarından daha fazla transmitter salar (presinaptik komponent). Ayrıca spinal kord nöronları reseptör sensitivitesindeki (postsinaptik komponent) değişiklikler tarafından daha eksitabl hale getirilebilir, daha sonraki reseptör aktivasyonun da çeşitli ikincil mesajcı sistemlerinin aktivasyonu tarafından meydana getirildiği düşünölmektedir.

Eksitatuvar anahtar transmitter L-glutamattır. Presinaptik terminallerden salıverilmesinden sonra (primer aferent nöronların spinal sonlanmalarından) spinal kord nöronlarının postsinaptik membranındaki iyonotropik NMDA ve non-NMDA (AMPA) reseptörlerini ve metabotropik glutamat reseptörlerini aktive edebilirler. Normal bir eklem zararsız, ağrılı olmayan bir basıya maruz kaldığında, düşük eşikli A β lifleri eksite olur ve glutamat salarlar. Glutamat AMPA tipi ligand-kapılı katyon kanallarını açar. NMDA reseptörleri Mg⁺⁺ tarafından bloklandıklarından açılmaz. Ağrılı bası eklem üzerine uygulandığında ise hem A β , hem de nosiseptif A δ ve C liflerini aktive eder. Bu uyarı postsinaptik hücre üzerine yüksek depolarizasyona neden olan glutamat salınımını artırır. Güçlü depolarizasyon sırasında Mg⁺⁺, NMDA reseptör kanalından dışarı atılır. Bu nedenle ağrılı uyarı sırasında hem AMPA hem de NMDA reseptörleri sinaptik transmisyona katılır. Spinal kord nöronlarının ağrılı mekanik uyarıya yanıtları AMPA ve NMDA reseptörlerinin antagonistleri tarafından azaltılabilir. (Şekil 7).



Şekil 7. (Solda) Normal koşullar altında diz eklemine hafif basının sinaptik işlenişi (Sağda) inflame diz eklemi üzerine hafif basının sinaptik işlenişi (Schneider'dan, 2002)

Çok sayıdaki aferent nöron P maddesi, CGRP gibi nöropeptidleri de içerir. İnflamasyon sırasında bu nöropeptidler eklem zararsız bası tarafından stimüle edildiğinde intraspinal olarak salınırlar. Spinal kord nöronları üzerindeki ilişkili G-proteini aracılı nöropeptid reseptörlerini aktive ederler. Bunların reseptör antagonistleri spinal kord nöronlarının eklem ağrılı uyaranlara verdiği yanıtı azaltırlar. Bu nöropeptidler santral sensitizasyonu kolaylaştırırlar. Olasılıkla glutamerjik sinaptik transmisyonun sensitivitesini artırır. Nöropeptid reseptör antagonistlerinin etkileri glutamat reseptör antagonistlerinden oldukça zayıftır. Bununla birlikte, nöropeptid reseptörleri inflamasyon sırasındaki sinaptik transmisyonun uzun süreli değişikliklerine katılabilir ve bu da inflamasyon sırasında devamlı olarak yükselmiş ağrı sensitivitesine neden olur.

Spinal PG'ler DRG nöronlarında ve spinal kord nöronlarında COX-1 ve -2 enzimleri tarafından sentezlenirler. PG reseptörleri primer aferent nöronların ve spinal kord nöronlarının üzerinde bulunurlar ve bu PG'lerin hem presinaptik (sinaptik mediyatörlerin salınımını etkilerler) hem de postsinaptik olarak (eksitabiliteyi etkileyebilir) etki edebildiklerine işaret eder. Eklemdeki inflamasyon sırasında PGE₂'nin dorsal ve ventral horn içinde tonik salınımı vardır. PGE₂'nin spinal kord yüzeyine uygulanması spinal kord nöronlarının mekanik stimülasyona yanıtını kolaylaştırır ve etkilerin paterni periferel inflamasyon sırasında görülenler ile benzer. Spinal PG'ler inflamasyon ile uyarılan hipereksitabilitenin oluşumuna katılırlar ancak yapılan çalışmalar spinal kord eksitabilitesinin devam ettirilmesinde etkili olmadıklarını gösterir (Schaible ve ark., 2002; 2009).

2.7. DENEYSEL ROMATOİD ARTRİT MODELLERİ

Aşağıdaki tabloda sık kullanılan deneysel romatoid artrit modelleri özetlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Deneysel Romatoid Artrit Modelleri (Kannan ve ark.'dan, 2005)

Rodent	Model	Özellikleri
Sıçan	CFA (complete freund's adjuvant) modeli / adjuvant ile indüklenen artrit (AA)	Olasılıkla ısı şok proteinlerinin (HSP) katıldığı bir mekanizma üzerinden poliartrit meydana getirir. Genetik linkaj, sinovyal CD4+ hücreleri, T hücresi bağımlı olması (İnsan RA ile benzerlik) Tetikleyici ajan bilindiğinden, herhangi bir spesifik antijen ihtiyacı olup olmadığı çelişkili (İnsan RA ile fark)
	Streptokokal hücre duvarı (SCW) ile indüklenen artrit	Bakteriyel hücre duvarı componentlerinin yatkın türlere uygulanması ile artrit meydana gelir. Artritin hem erken hem de geç fazının çalışılmasına olanak sağlar, SCW enjeksiyonundan birkaç gün sonra artrit gelişir. İnsandakine benzer şekilde, bu modelde dişi sıçanlar (Lewis) erkeklerden daha yatkın.
	Pristanla indüklenen artrit	
	Kollajenle indüklenen artrit modeli (KİA)	
	Kollajen antikorlu ile indüklenen artrit modeli (KAİA)	
	Zimosanla indüklenen artrit	
İmmün kompleksle indüklenen artrit	K/BxN modeli ile benzer patogeneze sahip. Eklem-spesifik antikor olmaksızın artrit indüksiyonu var.	

Tablo 5 devam. Deneysel Romatoid Artrit Modelleri (Kannan ve ark.'dan, 2005)

Rodent	Model	Özellikleri
	Transgenik ve knockout (geni silinmiş) fare modelleri	
Fare	K/BxN modeli (KRN T hücre reseptörü transgenik fare, C57BL/6 x NOD background)	Eksternal antijen, adjuvan veya antikor transferi olmaksızın spontan olarak kronik ve progresif inflamasyon gelişir. RA gelişiminde antikorların rolünün çalışılması açısından önemli bir model. Eklem-spesifik antikor olmaksızın artrit indüksiyonu var.
	NZB/NZW	
	AUUUA motifinde TNF gen mutasyonu	
	IL-1RA -/-	
	HuTNF Tg	
	Tristetraprolin -/-	

2.8. GLİA HÜCRELERİ ve AĞRI

Ağrının kontrol altına alınması için yeni ilaç geliştirme araştırmaları esas olarak nöronal mekanizmalar ve fonksiyonları üzerine odaklanmıştır. Ancak, persistan ağrı transmisyonunda tek başına nöronal aktivite patolojik ağrı durumunun nasıl meydana geldiğini açıklamakta yetersiz kalmaktadır. İmmün ve glia hücreleri gibi nöronal olmayan sistemlerin de nöronal aktivitenin düzenlenmesine katıldığına anlaşılması ağrı araştırmalarına önemli katkılar yapmıştır. Hızla artan kanıtlar glia hücreleri gibi nöronal olmayan hücrelerin ağrı iletiminin modülasyonunda önemli rollere sahip olduğunu göstermektedir (Milligan ve Watkins, 2009).

Sinir sistemi boyunca glia hücreleri nöronlar ve birbirleriyle, nöronal sinapslar, hücre gövdeleri ve aksonlar ile etkileşirler. Farklı görevleri olan üç tip glia hücresi vardır; astrositler, mikroglia ve oligodendrositler (Allen ve Barres, 2009).

Oligodendrositler hücre gövdelerine yakın mesafede olduklarında satellit hücreleri olarak adlandırılırlar, periferik sinir sisteminde ise schwann hücresi adını alırlar. Oligodendrositlerin bilinen görevleri SSS'de akson miyelinizasyonudur. Bunun dışında nöronal fonksiyonda modülatör rollerinin olduğu da gösterilmiştir (McMahon ve ark., 2005; Milligan ve Watkins, 2009).

Mikroglial hücreler mezodermden kaynaklanır ve glia hücrelerinin %10-20'sini oluşturur. Mikroglialın SSS'nin parankimasında bulunan yerleşik tipi bir de perivasküler tipi vardır. Bu iki hücre tipinin farklı özellikleri olmakla birlikte her ikisi de monosit ve makrofajları da içeren myelomonositik soya aittirler (McMahon ve Malcangio, 2009). Klasik olarak santral sinir sisteminin makrofajları olarak adlandırılan parankimal mikroglia, embriyonik gelişim sırasında SSS'ni istila eder ve bir daha yenilenmez. Tersine perivasküler mikroglia devamlı olarak hematopoetik prekürsörlerden yeniden üretilir ve bu yenilenme SSS'indeki inflamasyon sırasında artar. Mikroglia alt popülasyonlarının sağlıklı ve hasarlı SSS'deki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte perivasküler mikroglialın kan-beyin bariyerini değiştirdiği ve inflamatuvar durumlara yanıt olarak anti-inflamatuvar etkiler gösterdiği bilinmektedir. Yerleşik mikroglia SSS'ni denetler, aktivasyon üzerine hızlı bir şekilde çoğalır ve hem inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar etkilere sahiptir. Genel olarak mikroglial hücreler patojen saldırısına karşı ilk savunmayı antijenleri ayırt ederek, sekestre ederek ve işleyerek yaparlar. Bununla birlikte her iki mikroglia da astrositlerde ve nöronlarda bulunan nörotransmitter reseptörlerden pek çoğunu eksprese eder. Mikroglia aktif hale geldiğinde yakınlarındaki astrositleri, mikroglia ve nöronları aktive eden çeşitli maddeler üretir ve bunları salar (Milligan ve Watkins, 2009). Mikrogliaların morfolojik yapıları, SSS'nin direkt hasarı ve ayrıca periferik sinirlerin veya periferik dokuların hasarından sonra değişir. Bu koşullar altında mikroglial morfoloji hücre gövdelerinin boyut olarak artması, proksimal yapıların kalınlaşması, distal dalların daha az dallanmış görünmesi gibi değişiklikler gösterir (McMahon ve Malcangio, 2009).

Astrositler en çok bulunan glia hücreleridir ve nöroektodermden kaynaklanırlar. Nöronal sinapslar ile yakın ilişki kurarlar çünkü tek bir astrosit birden fazla nöron ile kontakt halindedir. Glutamerjik aktiviteye katılırlar. Glukozdan glutamat sentezi için gereklidirler. Ekstraselüler iyon (Ca^{++} ve K^+ homeostazında rol oynarlar) ve

nörotransmitter konsantrasyonlarını düzenlerler ve nöronlara kandan oksijen ve glukoz sağlarlar. Astrositler fazla nörotransmitterin uzaklaştırılması, aktif nörotransmitterlerin sonlandırılması ve onların tekrar nöronlara geri dönmesini düzenleyerek temel sinaptik sinyallerin kodlanmasına izin verirler. Astrositler çok sayıda nörotransmitter reseptörü eksprese ederler ve kendileri de glutamat, D-serin veya ATP gibi nörotransmitterleri intraselüler Ca^{++} konsantrasyonunun artması üzerine salarlar. Astrositlerin farklı alt tipleri gap junction'lar ile bağlantı kurar ve bilginin Ca^{++} iyonları yolu ile uzak mesafelere taşındığı bir ağ meydana getirir (McMahon ve Malcangio, 2009). Astrositlerin iki ana grubu vardır; protoplazmik ve fibröz astrositler. Protoplazmik astrositler gri maddede yerleşim gösterirler ve nöronal hücre gövdeleri ve sinapslar ile yakın temas halindedirler. Fibröz astrositler beyaz maddede bulunurlar ve nöronal aksonlar ile ilişkilidirler (Allen ve Barres, 2009). Protoplazmik astrositler kısa oldukça dallanmış bir yapı gösterirken, fibröz astrositler uzun ve dallanmamış yapı gösterirler (Miller ve Raff, 1984). Mikroglia'daki gibi periferik sinir ve periferik doku hasarı, çoğunlukla da hasarlı duysal nöronların (ve motor nöronların etrafındakiler) santral terminallerinin yakınındakiler, astrositlerin yerleşik durumunu değiştirir. Bu değişmiş durum aktivasyon olarak adlandırılır (McMahon ve Malcangio, 2009).

Astrositler ve mikroglia virüslere ve bakterilere yanıt olarak ve primer afferent terminallerden salınan (P maddesi, CGRP, ATP ve eksitator amino asitler) maddelere ve ağrı transmisyon nöronlarına (nitrik oksit (NO), PG'ler) yanıt olarak aktive olurlar. Devam eden eksitasyon mikroglia ve astrositlerdeki ERK, p38 ve JNK aktivasyonunu indükler. Astrositler devam eden sinaptik aktiviteye internal Ca^{++} mobilizasyonu ve glutamat, P2X₄'e bağlanan ATP, TNF- α , IL-1 β , IL-6, NO ve PGE2 salınımına öncülük ederek yanıt verir. Ayrıca aktive olmuş mikroglia da bu pro-inflamatuvar sitokinlerin kaynağıdır. MMP9, pro-IL-1 β klevajını ve mikroglial aktivasyonu indükler, MMP2 ise pro-IL-1 β deposunu indükler ve astrosit aktivasyonunu devam ettirir. p38 mitojenle aktive olan protein kinaz (p38 MAPK) hem mikroglia hem de astrositlerde IL-1 β sinyalinin üzerine indüklenir. Astrositler ve mikroglia kemokin reseptörlerini eksprese eder (CX3CR1, CCR2). Sinir hasarının ardından, ısı şok proteinleri (HSP) salınır ve hem astrositler hem de mikroglia üzerinde bulunan toll-benzeri reseptörlere bağlanır (TLRs) ve bu hücre tiplerinin daha sonraki aktivasyonuna öncülük ederler.

Ağrı transmisyonunun potansiyalizasyonunun yanı sıra, aktive olmuş glia hücreleri, nöronal hipereksitabilite, nörotoksisite ve kronik inflamasyona katkıda bulunabilirler. Bununla birlikte, IL-10 ve IL-4 gibi anti-inflamatuar sitokinleri salarak ve anti-inflamatuar fonksiyonları olan ve mikroglial toksisiteyi, kemotaktik yanıtları ve MAPK sinyal transdüksiyonunu baskılayarak ve sonuçta pro-inflamatuar sitokinleri inhibe ederek etki gösteren kannabinoid reseptörlerini (CB1 ve CB2) eksprese ederek nöroprotektif de olabilirler (Milligan ve Watkins, 2009).

Yukarıda da belirtildiği gibi, normal koşullar altında santral glia hücreleri sessizdir. Hem mikroglia hem de astrositlerde, SSS hasarı, mikrobiyal invazyon gibi çeşitli olaylar ve bazı ağrı durumları beraberinde çeşitli inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve diğer potansiyel aljezik maddelerin eşlik ettiği hipertrofiye neden olur. Aktive olmuş glia hücrelerini ayırt etmek için en çok bunların değişmiş sayıları, hipertrofi ve OX-42, Iba-1 ve GFAP gibi çeşitli ekspresyon markırları kullanılır (McMahon, 2005).

Glial hücrelerin ağrı prosesine katıldığını gösteren ilk kanıt Garrison'un bir nöropatik ağrı modelinde L4 spinal kordunda astrosit markırı GFAP'nin artışını göstermesidir. Aynı çalışmada sinir hasarı ile aynı anda başlayan MK 801 (NMDA reseptör antagonisti) tedavisinin bu etkileri geri çevirebildiği gösterilmiştir. Sonuç olarak devam eden çalışmalar daha spesifik ve direkt olarak glia inhibitörleri veya modülatörleri üzerine yoğunlaşmıştır. En sık kullanılan fluorositrat (astrosit ve mikroglia metabolizmasını bloklar) ve bir antibiyotik olan minosiklidir (mikroglial aktivasyonu astrositler ve nöronlar üzerine belirgin bir etki yapmaksızın inhibe eder). Her ikisinin de bazı ağrı modellerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalar fluorositratın nöropatik ağrıyı hem blokladığını hem de geri döndürdüğünü göstermiştir, bununla birlikte bir başka çalışmada minosiklin nöropatik sıçanlarda mikroglial aktivasyonu anlamlı olarak inhibe etmesine rağmen oluşmuş ağrı durumunu sadece bloklamış ama geri döndürmemiştir. Bu çalışma mikroglialın nöropatik ağrının başlangıç aşamasında daha önemli olduğunu astrositlerin ise ilerki dönem ile ilişkili olduğunu ileri sürmektedir. Ayrıca glia üzerine etkili çeşitli ilaçlar; propentofilin, metotreksat, talidomid ve p38 MAP kinaz inhibitörleri ağrı sendromlarının azaltılmasında etkili bulunmuştur (McMahon, 2005).

Spinal kord dorsal boynuzunda mikrogliya ve astrosit aktivasyonunun çeşitli patolojik ağrı durumlarında esas mekanizma olduğu görünmektedir. Spinal gliya aktivasyonunun hiperaljezi ve allodini ile ilişkisi ağrının inflamasyon veya hasara bağlı olduğu periferik ve santral sinir sistemi ile ilişkili çok sayıdaki deneysel ağrı çalışmalarında gösterilmiştir.

2.9. FARMAKOLOJİK TEDAVİ

2.9.1. Diklofenak

Diklofenak fenilasetik asit türevi non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlardan (NSAİİ) olup; analjezik, anti-inflamatuar, anti-piretik özellikleri vardır. Akut ve kronik ağrının çeşitli şekillerininin (minör cerrahi, travma, dismenore ve inflamatuvar hastalıklara bağlı) ve romatoid artrit, dejeneratif eklem hastalıkları, ankilozan spondilit ve eşlik eden durumların tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Diklofenak COX-1 ve COX-2 enzimlerini eşit derecede inhibe etmek suretiyle prostaglandin sentezini inhibe eder. Ancak artan sayıdaki çalışmalar diklofenak'ın farmakolojik etkisinin COX inhibisyonunun ötesinde, multimodal ve bazı örneklerde yeni etki mekanizmaları gösterdiğine işaret etmektedir. Bunlar arasında; tromboksan-prostanoid reseptör inhibisyonu, araşidonik asit salınım ve uptake'inin etkilenmesi, lipoksijenaz enzimlerinin inhibisyonu, nitrik oksit-cGMP antinosiseptif yolağının aktivasyonu yer almaktadır. Diğer olası yeni etki mekanizmaları P maddesinin inhibisyonu, peroksizom proliferatör aktive edilmiş reseptör gama (PPAR_{gama}) inhibisyonu, asit-duyarlı iyon kanallarının blokajı, IL-6 üretiminin değişimi, NMDA reseptör hiperaljezisinin inhibisyonudur. Ancak bu yeni etki mekanizmalarını gösteren çeşitli çalışmalar olmakla birlikte, etkilerin doğruluğunu kanıtlayan klinik çalışmalar bulunmamaktadır ve bu olası yollardan klinik anlamda yarar sağlanıp sağlanmayacağını kesinleştirmek için yeni çalışmalar gerekmektedir (Gan, 2010).

Gastrointestinal sistemden emildikten sonra pik plazma konsantrasyonuna 1,5-2 saat sonra ulaşır. Her ne kadar plazmadaki eliminasyon yarı ömrü (1,5 saat) kısa olsa da, sinovyal sıvıda kalmaya devam eder. Karaciğerde metabolize edilir ve üriner ve safra ekstraksiyonu ile elimine edilir.

Klinik çalışmalar romatoid artritteki tedavi edici ve ağrı dindirici etkilerinin aspirin, indometazin, ibuprofen ve ketoprofen gibi diğer NSAİİ'lar ile eşdeğer olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte gastrointestinal yan etkileri aspirin veya indometazin ile kıyaslandığında daha azdır (Small, 1989).

2.9.2. Buprenorfin

Buprenorfin semisentetik oldukça lipofilik bir opioid olup morfin alkaloid tebain türevidir. Mü reseptörlerinin parsiyel agonisti ve kappa reseptörlerinin antagonisti olarak etki eder. Mü reseptörlerine bağlanarak supraspinal analjezi, respiratuar depresyon ve miyozis yapar. Kappa reseptörleri üzerindeki antagonist etkisine bağlı olarak sınırlı spinal analjezi, disfori ve psikomimetik etkiler meydana getirir. Parsiyel agonist olması nedeniyle diğer tam mü agonistleriyle kıyaslandığında, özellikle respiratuar depresyon açısından, daha güvenilir bir profile sahiptir. Mü reseptörlerine yüksek afinite gösterir ve onlardan yavaş ayrılması nedeniyle uzun süreli etki meydana getirir. Ayrıca, mü ve kappa reseptörlerinden yavaş ayrıldığından buprenorfin tedavisinin sonlandırılmasının ardından görülen opioid yoksunluk belirti ve semptomları morfin, eroin ve metadon gibi tam agonistlerde görülenlere göre daha azdır. Son dönemde buprenorfin'in opioid benzeri reseptör-1'in (ORL1) agonisti olarak işlev gördüğü de gösterilmiştir (Yamamoto ve ark., 2006).

Efektif analjezi göreceli olarak düşük reseptör işgalinde gerçekleşir (%5-10). Analjezinin derecesi ilacın plazma konsantrasyonu ile ilişkili görünmemektedir, çünkü reseptörden ayrılma plazma konsantrasyonunun gerisinde kalmaktadır. Düşük dozlarda morfinden en az 30-40 kat daha güçlüdür. Parsiyel agonist olması nedeniyle yüksek dozlarda platoya ulaşır ve antagonist gibi davranmaya başlar. Yüksel dozlardaki bu antagonist özelliği doz bağımlı analjezik etkiyi ve respiratuar depresyonu sınırlar (Heit ve Gourlay, 2008). Karaciğerdeki yüksek ilk geçiş etkisi nedeniyle oral biyoyarlanımı düşüktür. Bununla birlikte, sublingual biyoyarlanımı %60-70'dir. Dağılım hacmi geniştir, pik plazma konsantrasyonuna yaklaşık olarak 90 dakikada ulaşır ve yarılanma ömrü 4-5 saattir. Lipofilik bir ilaç olması nedeniyle beyin dokularındaki düzeyi serumdan hayli fazladır. Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanır ve N-dealkilasyon

ve konjugasyon reaksiyonları ile enzimatik transformasyon sonucu inaktive edilir. Akut, kronik ağrı ve kanser ağrısının tedavisinde kullanılır. Bundan başka, kappa reseptörleri üzerindeki antagonistik etkisine bağlı olarak caydırma, detoksifikasyon ve idame tedavilerinde kullanılmaktadır (Melli ve Kayaalp, 2002).

2.9.3. Gabapentin

Klinikte, hem antiepileptik hem de antinosiseptif bir ajan olarak kullanılan gabapentin'in (GBP) farmakolojik etkisini gösterdiği mekanizma tam olarak belirlenmemiştir. İnhibitör nörotransmitter gamaaminobutirik asid (GABA)'in yapısal analogudur ve orjinal olarak kan-beyin bariyerini serbestçe geçen GABA mimetik olarak dizayn edilmiştir. GABA agonisti gibi davranması beklense de GABA reseptörleri üzerine direk etkisi yoktur. Çeşitli çalışmalar GABA'nın sentezi ve veziküler olmayan salınımı ile olası pozitif etkileşimi ve voltaj-kapılı Na^+ kanalları, L-amino asit transportör sistemi ve dallanış-zincir amino asit transferazı içeren çoklu hücrel hedeflerde zayıf inhibitör etkiyi ileri sürmektedir. GBP'nin memeli beyinde voltaj-bağımlı kalsiyum kanallarının $\alpha_2\delta$ subünitesine spesifik olarak bağlandığının tanımlanması ile klinik olarak anlamlı bir mekanizma ortaya konmuştur. Bazı fonksiyonel çalışmalar da terapötik olarak belirli konsantrasyonlarda ilacın kalsiyum kanalı bloke edici özelliklerinden bahsetmektedir. Kalsiyum akımının inhibisyonu GBP'nin en olası mekanizması olarak belirtiliyor olsa da bazı çalışmalarda GBP ve $GABA_B$ reseptörü arasındaki beklenmeyen ilişkiden de bahsedilmektedir (Sills, 2005).

Gabapentin ve pregabalin nöropatik ağrı tedavisinde diabetik nöropatiye ve post-herpatik nöraljiye etkisinden dolayı onay almıştır (Fernihough, 2004).

Oral uygulandıktan sonra yavaş olarak emilir 2-3 saat içinde pik serum konsantrasyonlarına ulaşır. Doz artıkça absorpsiyonu azalır bu nedenle plazma konsantrasyonu alınan doza paralel artmaz. Emilimi yemeklerden etkilenmez. Plazma proteinlerine bağlanmaz. Karaciğerde metabolizmaya uğramaz, böbreklerden atılır. Eliminasyon yarı ömrü yaklaşık olarak 6 saattir (Bockbrader ve ark., 2010).

2.9.4. Anakinra

IL-1 inflamasyon alanında üretilen inflamatuvar sitokinlerden biridir. IL-1 reseptör tip 1'e (IL-1RI) bağlanarak, inflamatuvar yanıtı başlatır. IL-1 ailesi 3 önemli sitokin içerir; IL-1 α , IL-1 β ve IL-1R antagonisti (IL-1Ra). IL-1 β tip I (IL-1RI) ve tip II (IL-1RII) IL-1 reseptörlerine iyi afinite göstermesine rağmen sadece IL-1RI biyolojik etkilerine aracılık eder. IL-1 α ve β aynı reseptöre bağlanır ve benzer özelliklere sahiptir. IL-1'in agonistik etkileri kısmen IL-1Ra ile regüle edilir. Anakinra IL-1R antagonistinin (IL-1Ra) rekombinant bir formudur ve doğal proteinden glikolize olmaması ve ek bir N-terminal metionine sahip olması ile ayrılır. Anakinra, RA tedavisi için onay almıştır ancak etkisi TNF inhibitörlerine göre daha zayıftır. IL-1R'ne bağlanarak pro-inflamatuvar etkileri sinyal transdüksiyonunu bloke ederek inhibe eder (Şentürk, 2009).

İlımlıdan şiddetli düzeydeki RA'e kadar yapısal hasarın belirtilerini, semptomlarını ve ilerlemesini azaltır. Bir ya da daha fazla hastalık modifiye edici antiromatik ilaç denemesi başarısız olmuş 18 yaş ve üzeri tüm RA hastalarında endikedir. Tek başına veya TNF bloklayıcı ajanlar dışındaki diğer hastalık modifiye edici antiromatik ilaçlar ile kombine kullanılabilir.

Anakinra'nın maksimum plazma konsantrasyonları klinik olarak etkili dozun subkutan (s.c.) uygulanmasından 3-7 saat sonra oluşur. Yapılan çalışmalar doz artışının etkide artışa neden olmadığını göstermektedir. Yarılanma ömrü 4-6 saattir. Böbreklerden elimine edilir (www.kineretrx.com).

III. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma İsveç Karolinska Enstitüsü Fizyoloji ve Farmakoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Hayvan deneyleri için İsveç lokal etik komitesinden (Stockholms Norra Djurförsöksetiska Nämnd) onay alındıktan sonra çalışmalara başlandı. Tüm çalışmalar Helsinki Deklerasyonu'na ve Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği (IASP)'nin öngördüğü etik kurallara uygun olarak gerçekleştirildi.

3.1. HAYVANLAR

Çalışmada Tübingen Üniversitesi'nde (Almanya) yetiştirilen ve daha sonra Karolinska Enstitüsü Fizyoloji ve Farmakoloji deney hayvanları araştırma laboratuvarlarına transfer edilen 8-12 haftalık, ağırlıkları 30-40 gram arasında değişen, erkek, [BALB/c X B10.Q] F1 kısa adıyla QB fareler kullanıldı. Hayvanlar deney süresince klima kontrollü, sıcaklığı sabit ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) ve 12 saat aydınlık/karanlık bir ortamda barındırıldı ve standart yem ve çeşme suyu ile *ad libitum* olarak beslendi.

3.2. ANTİKOR KOKTEYLİNİN HAZIRLANMASI

Anti-CII antikorunu üreten hibridomaların (M2139, C1, C2 ve UL-1) ultra düşük sığır IgG'yi içeren 100 mg/l kanamisin monosülfatlı (Sigma, USA) DMEM Glutamaks-I kültür medyumunu (Gibco BRL, Invitrogen AB, Sweden) içerisinde kültürleri yapıldı. Monoklonal antikorlar kültür süpernatantları şeklinde hücre kültür flaskları (Integra Biosciences, Switzerland) kullanılarak büyük miktarlarda üretildi. Antikorlar γ -bind plus afinite jel matriksi (Pharmacia, Sweden) ve Äkta purifikasyon sistemi ile saflaştırıldı. Kısaca, kültür süpernatantları jel matrikse uygulanmadan önce 12500 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi, filtrasyona tabi tutuldu ve tüm gazlarından arındırıldı. Antikorlar asetik asit tamponu içinde pH 3'de ayrıştırıldı ve pH 9'da 1M Tris-HCl ile nötralize edildi. Pik fraksiyonlar toplandı, azidli veya azidsiz olarak PBS'e (fosfat tamponu) karşı yoğun bir şekilde pH 7'de diyaliz edildi. IgG içeriği dondurarak kurutma yöntemiyle belirlendi. Antikor solüsyonları 0,2 μm şırınga filtreleri (Dynagard,

Spectrum Laboratories, CA, USA) ile sterilize edildi. Alikuotlar kullanılmıncaya kadar -70°C'de muhafaza edildi. Monoklonal antikorlar hibridoma süpernatantlarından saflaştırıldıktan sonra PBS içerisinde eşit hacimlerde karıştırılarak, antikor kokteyli hazırlandı (Nandakumar ve Holmdahl, 2005).

3.3. ANTİKOR TRANSFERİ

KAİA Grubu: Farelere 4 mg anti-CII monoklonal antikor kokteyli standardize edilmiş hacimlerde (0,25-0,4 ml) deneyin 0. gününde kuyruk veninden intravenöz (i.v.) olarak enjekte edildi. 5 gün sonra 25 µg LPS (Lipopolisakkarid, *Escherichia coli* serotip 055:B5, Sigma) 100 µl fizyolojik tuzlu su (salin) içerisinde intraperitoneal (i.p.) olarak verildi.

Kontrol Grubu: 0. günde 0,25-0,4 ml i.v. salin ve 5. günde 100 µl i.p. salin uygulandı.

LPS Grubu: Ağrı yanıtı üzerinde LPS'in olası etkisinin değerlendirilmesi amacı ile kontrol grubuna ilave olarak LPS grubu oluşturuldu. Bu gruptaki farelere 0. günde 0,25-0,4 ml i.v. salin ve 5.günde 25 µg LPS 100 µl salin içerisinde i.p. olarak uygulandı.

3.4. HAYVANLARIN TARTILMASI

Deney protokolünde kullanılan fareler enjeksiyonun öncesinde (0. gün) ve sonrasında deney protokolü süresince (30 gün) haftada bir kez tartılarak, vücut ağırlıklarında meydana gelen değişiklikler takip edildi.

3.5. ARTRİTİN KLİNİK SKORLANMASI

Hayvanlarda artrit gelişiminin değerlendirilmesi antikor enjeksiyonundan önce (0. gün) ve enjeksiyondan sonra (2. günden başlayarak) gün aşırı olacak şekilde inflamasyon kayboluncaya dek yapıldı. Fareler daha önce belirtilen skorlama sistemi esas alınarak (Nandakumar ve Holmdahl, 2007), kör araştırmacı tarafından skorlandı.

Kısaca; hayvanlarda inflamasyonun klinik belirtileri olan kızarıklık ve şişlik değerlendirildi. Her bir hayvanda inflame parmak veya boğuma 1 puan, inflame el veya ayak bileğine 5 puan, metakarpal veya metatarsal bölgelerdeki inflamasyona 5 puan verildi. Tüm hayvanlarda tek bir pençe için puanlama 0 ile 15 arasında, toplamda ise 0 ile 60 arasında değişti.

3.6. NOSİSEPTİF DAVRANIŞIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hayvanlar deneyin 1 hafta öncesinden başlanarak deney koşullarına ve ortamına alıştırmak amacıyla alt kısmı tel kafesten yapılmış von Frey kafeslerinde (15 cm x 12.5 cm x 13 cm) günde en az 2 saat oturtuldu (Şekil 8). Deney günlerinde ise hayvanlar deney protokolüne başlanmadan en az 1 saat önce oturtularak, deneye hazır hale gelmeleri beklendi. Deneyden 1 gün önce hayvanların ilk bazal aktivite yanıtları (taktil allodini ve soğuk allodini) alınarak, kaydedildi. Daha sonra deney günü enjeksiyonların yapılmasından önce hayvanların bazal aktivite yanıtları bir kez daha alındı ve bir önceki günle anlamlı derecede farklılık gösteren hayvanlar deneyden çıkartıldı, sadece kararlı bir bazal aktivite yanıtına sahip olan hayvanlar deneye dahil edildi. Tüm deneyler günün belirli bir zaman aralığında yapıldı. Nosisseptif davranışın değerlendirilmesinde; KAİA grubu için 19, kontrol grubu için; 13, LPS grubu için; 11 hayvan kullanıldı.

3.6.1 Taktil (Mekanik) Allodini

Taktil allodininin değerlendirilmesinde logaritmik olarak artan kalınlıktaki ve farklı ağırlıktaki von Frey OptiHair Spare filamentler (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 mN) kullanıldı (Şekil 9). Hayvanlardaki %50 geriçekme eşiği Dixon'ın up-down metodu yardımıyla değerlendirildi (Chaplan, 1994). Bu metoda göre orta kalınlıktaki filamentle (4 mN) başlandı, hayvanın arka pençesinin plantar yüzeyine (orta kısmına denk gelecek şekilde) 5 saniye süre ile filamentin uygulanmasını takiben pozitif pençe geriçekme hareketi 'x' işaretiyle sembollendirildi ve bir alt kalınlıktaki filamentle geçildi. Geriçekme olmadığında ise durum 'o' işaretiyle sembollendirildi ve bir üst kalınlıktaki filamentle geçildi. İlk pozitif yanıtın alınmasını takiben 4 yanıt daha alındı

ve her bir pençede toplamda 6 yanıtın oluşan bir sembollendirme yapıldı. Farklı sembol kombinasyonlarından oluşan yanıtların (oxoxxo, xoxoxx, oooo, oxoxox, xxxv) otomatik skala yardımıyla %50 geriçekme eşiğine denk gelen ağırlıkları hesaplandı (Tablo 6).



Şekil 8. Von Frey kafesleri



Şekil 9. Von Frey OptiHair Spare Filament

Tablo 6: Taktıl allodini yanıtları değerlendirme tablosu

Fare No:						Saat:					
Tedavi:											
Sol						Sağ					
0,5						0,5	X				
1						1	X				
2						2	X				
4	o	o				4	X				
8	x	o	x			8					
16		x				16					
32						32					
Ort						ort					

Taktıl allodini yanıtlarının değerlendirilmesinden sonra hayvanlar normal kafeslerine geri konularak yem ve su ihtiyaçlarının karşılanması sağlandı ve daha sonra hayvanlar tekrar von Frey kafeslerinde 1 saat oturtuldu, ardından soğuk allodini yanıtları değerlendirildi.

3.6.2 Soğuk allodini

Soğuk uyarıya karşı pençe geriçekme eşiği aseton damla testi ile daha önce gösterildiği şekilde değerlendirildi (Smith ve ark., 2004). Hayvanın arka pençesinin plantar yüzeyine (orta kısmına denk gelecek şekilde) enjektör yardımı ile bir damla aseton uygulamasını takiben hayvanın asetona verdiği yanıt (yalama ve/veya sallama) süresi 1 dakika süresince değerlendirildi. Bu işlem 5'er dakikalık intervaller ile 3 kez tekrar edilerek ortalama yanıt belirlendi. Yanıtlar arasında belirgin varyasyon olduğunda 4. bir yanıt daha alındı.

Her bir hayvan için sağ ve sol pençelerin taktil ve soğuk allodini yanıtları değerlendirildikten sonra yanıtların ortalaması alındı. Hayvanların ağrı yanıtları 30 gün süresince takip edildi. Hayvanlarda taktil allodini yanıtları gün aşırı (son iki deney günü 3 günlük interval verildi), soğuk allodini yanıtları ise 3 günlük intervaller verilmek suretiyle değerlendirildi.

3.7. İMMÜNHİSTOKİMYA

Deney protokolünün 13. ve 29. günlerinde kontrol hayvanlarının ve artritli hayvanların spinal kordları çıkarıldı. Her bir gün için (IHK analizleri için ayrı bir deney grubu kullanıldı) KAİA grubundan; 3, kontrol grubundan; 3 hayvan kullanıldı.

Fareler isofluran ile derin anestezi altında iken, intrakardiyak olarak önce %0.9 salin, takiben %4 PFA (paraformaldehit) ile perfüzyon yapıldı. Giyotin ile hayvanlar dekapite edildi. Makas yardımı ile deri kaldırıldı ve spinal kolon iliak krest hizasından kesildi. Hızlı bir şekilde spinal korda hidroekstrüzyon uygulandı. Kısaca, 10 ml'lik şırınga soğuk PBS ile dolduruldu ve köreltilmiş enjektör ucu vertebral kanalın kaudal ucuna yaklaşık 1 cm içerde olacak şekilde yerleştirildi. Şırıngaya basınç uygulama suretiyle spinal kordlar kanal dışına çıkartıldı. Spinal kordlar lumbar genişlemenin (kaudal uçtan 0,7 cm olarak ölçüldü) rostral ve kaudal uçlarından kesildi ve 24 saat %4 PFA ile 4°C'de postfiksasyon yapıldı. Ertesi gün dokular soğuğa karşı koruma amacıyla önce %20 sükrözlük PBS çözeltisine transfer edildi, burada 4°C'de 48 saat bekletildi ve daha sonra kullanılıncaya dek %0,5 PFA içeren %30 sükröz'lük PBS içerisinde muhafaza edildi. Doku örnekleri OCT içine gömüldü ve -50°C'deki isopentan içinde

donduruldu. Spinal kord kısımları (30 µm kalınlık) -20°C'deki kriyostatta kesildi ve PBS içeren multiwell plate'lere aktarıldı (plate'in her bir kuyusuna ortalama 20 spinal kord kesiti konuldu). Kesitler daha uzun süreli depolama amacı ile anti-freeze solüsyonu içeren multiwell plate'lere aktarıldı. Deney günü kesitler PBS içeren plate'lere aktarılarak 3 kez 5 dakika yıkandı. Daha sonra %0,2 Triton-X100 içeren PBS (PBS-TX) içerisinde 10 dakika permeabilize edildi ve ardından non-spesifik kısımları bloklamak amacıyla bloklayıcı tampona (%5 normal koyun serumu içeren PBS-TX) konuldu ve 1 saat bloklama işlemi yapıldı. Her bir hayvan için lumbar spinal kordların 3 farklı seviyesi boyandı bunun için; Seviye 1: hücre 2 ve 3'den kesitler, Seviye 2: hücre 6 ve 7'den kesitler, Seviye 3: hücre 9 ve 10'dan kesitler alındı (spinal kordun kaudal ucundan başlayarak 10 hücre tüm lumbar genişlemeyi göstermektedir). Bloklamamın ardından kesitler **free-floating metoduna** göre;

i. anti-mouse GFAP 1:1000 (Invitrogen)

ii. anti-rabbit Iba-1 1:1000 (Wako)

içeren bloklayıcı tampon içerisinde 4°C'de bir gece bırakıldı. Ertesi gün PBS ile 3 kez 5 dakikalık yıkamanın ardından spinal kord kesitleri bloklayıcı tampon içerisinde

i. anti-mouse IgG sekonder antikor, Alexa-488 (1:250)

ii. anti-rabbit IgG sekonder antikor, Alexa-594 (1:250)

ile 1 saat inkübe edildi. Kesitler PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı ve daha sonra cam lamın üzerine konuldu. Kesitlerin üzeri lamel ile kapatılmadan önce lamın üzerine kapatıcı ortam olarak DAPI (fluoresan boya) damlatıldı. Alexa fluoresan boyaları fluoresan mikroskobu kullanılarak görünür hale getirildi. Primer anti-GFAP antikorunu farede üretildiğinden ve çalışmada fare dokularının kullanılması nedeniyle primer antikorun hariç tutulduğu kontrol deneyi yapıldı. Bu deney sonucunda hiçbir boyama görülmedi, bu sonuç sekonder anti-mouse IgG antikorunun spesifik olduğunu ve spinal kordda sonuçlarda karışıklığa neden olabilecek herhangi bir endojen IgG varlığının olmadığını gösterdi.

3.7.1. Görüntü Alma

Her bir hayvan için fluoresan mikroskobu (Zeiss, Axio Scope) kullanılarak lumbar spinal kordun üç seviyesinin her birinden 3'er kesit görüntüsü alındı. Her bir

kesit için her iki dorsal boynuz da hesaplamaya dahil edildi. Görüntüleri almak için birbirleriyle uyumlu kamera ve mikroskop takımları kullanıldı. Objektif 10'luk büyütme ve 1/1,2 saniye kesit pozuna ayarlandı. Deney prosedürü sırasında oluşan, herhangi bir artefaktın olduğu kesitler (kesitteki katlantı, kapatma ortamındaki hava kabarcığı, dokudaki yırtık, dorsal boynuzu kapatan dorsal kök, sekonder antikor presipitasyonu (kristal oluşumu) ışık şiddetini etkileyebileceğinden deneyden çıkarıldı. Tüm görüntüler tek bir tanımlayıcı isimle adlandırıldı ve -20°C'de arşivlenen ve depolanan cam lamalar üzerine kesitlerin pozisyonuna ters olarak işaretleme yapıldı.

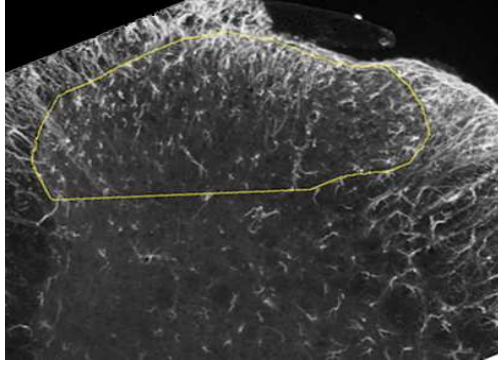
3.7.2. Hesaplama

Işık şiddeti/pikselli dijital resimler üzerinde Image J software'i kullanılarak ölçüldü. Glia aktivasyonu glia sayısındaki artış (proliferasyon veya migrasyon) ve immünoreaktivitedeki artış ile sonuçlanan glia hücrelerinin kompleksitesi (yuvarlaklaşmış hücre gövdeleri ve kalınlaşan uzantılar) ile karakterizedir. Bu nedenle artmış sinyal yoğunluğu/pikselli glia aktivasyonunun işareti olarak kabul edildi (Romero-Sandoval ve ark., 2008). Yeşil kanal içerisine doğru bazı boya akmaları şeklinde bulduğumuz, Alexa-488-boyalı (GFAP) floresan görüntülerden kırmızı kanal çıkartıldı ve daha sonra Image J ile analizinden önce gri skalaya dijital olarak dönüştürüldü. Tüm anti-Iba-1 boyalı floresan görüntüler direkt olarak kırmızı filtreli görüntüler üzerinde analiz edildi. Dorsal boynuzu işaretlemek amacı ile iki farklı yöntem kullanıldı. Lamina 1-3/4'ün hesaplanmasında dorsal boynuz manuel olarak işaretlendi. Lamina 1-2'nin hesaplanmasında ise standardize edilmiş kareler lamina 1-2 üzerine konularak hesaplama yapıldı. Spinal dorsal boynuzun sınırları daha önceden belirtildiği şekilde işaretlendi (Molander ve ark., 1984).

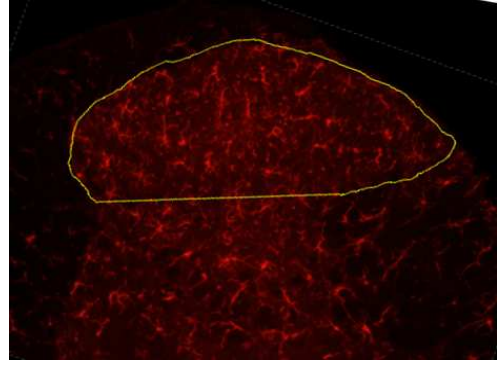
3.7.2.1. Lamina 1-3/4'ün Hesaplanması

Dorsal boynuzun lamina 1-3/4'ü içeren alanı manuel olarak işaretlendi (Şekil 10a,b). Dorsal boynuzun beyaz ve gri tabakası arasındaki sınırı ayırt edebilmek için aşağıda belirtilen kriterler kullanıldı. Iba-1 boyamasında gri maddede görülen açık ve daha yüksek yoğunluk dorsal boynuzun işaretlenmesinde kriter olarak kabul edildi.

GFAP ile boyanmış görüntülerde ise şu kriterler dikkate alındı; **i.** gri maddedeki yüksek yoğunluk **ii.** astrosit şekli; gri madde beyaz maddedeki fibröz astrositler ile karşılaştırıldığında protoplasmik astrositler içerir. Analizler dorsal planı çıkarılan işaretli alanda ışık yoğunluğunun ortalama değerlerini verdi.



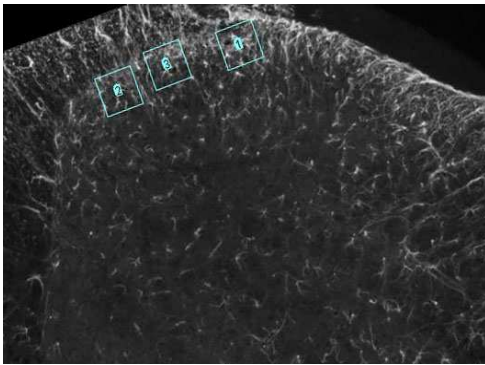
Şekil 10a. GFAP boyalı spinal kord kesiti



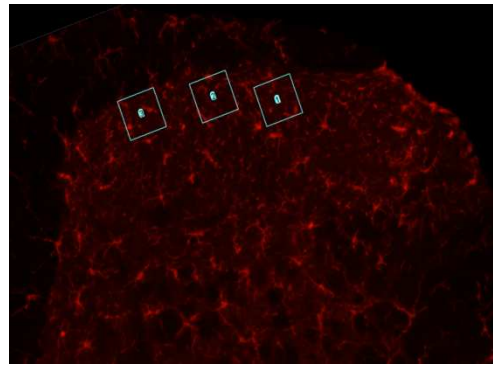
Şekil 10b. Iba-1 boyalı spinal kord kesiti

3.7.2.2. Lamina 1-2'nin Hesaplanması

Her bir dorsal boynuz için belirli ölçülerde, standardize edilmiş üç kare dorsal boynuzun medialinden merkezine doğru lamina 1-2 üzerine yerleştirildi (Şekil 11a,b). Analizler arka planı çıkarılan her bir kare için ışık yoğunluğunun ortalama değerlerini verdi. Üç kareden elde edilen ortalama değer her bir dorsal boynuz için hesaplandı.



Şekil 11a. GFAP boyalı spinal kord kesiti



Şekil 11b. Iba-1 boyalı spinal kord kesiti

3.8. WESTERN BLOT

Deney protokolünün 30. gününde kontrol hayvanlarının ve artritli hayvanların lumbar spinal kordları çıkarıldı. Her bir gün için (WB analizleri için ayrı bir deney grubu kullanıldı) KAİA grubundan; 6, kontrol grubundan 6 hayvan kullanıldı.

Fareler isofluran ile derin anestezi altında iken, giyotin ile dekapitasyon yapıldı. Makas yardımı ile deri kaldırıldı ve spinal kolon iliak krest hizasından kesildi. Lumbar spinal kordlar yukarıda İHK analizleri için anlatıldığı şekilde çıkarılarak, kuru buz üzerine alındı ve hızla donduruldu. Dokular kullanılıncaya dek -70°C 'de muhafaza edildi.

3.8.1. Protein Ekstraksiyonu

Deney günü -70°C 'den alınan dokuların üzerine 50 mM Tris tamponu (pH 7,4), %0,5 Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, %1 SDS ve proteaz inhibitörlerini (I ve II) içeren soğuk standart ekstraksiyon tamponu (1,5 cm spinal kord için 300-400 μl) eklendi ve sonikatör ile homojenizasyon yapıldı. Dokuların ısınmasını önlemek için sonikasyon işlemi kısa aralıklarla yapıldı, soğuk ortamda çalışılmaya dikkat edilerek tamamlandı. Ardından örnekler, 14,000 rpm'de 15 dakika 4°C 'de santrifüj edildi. Örnekler buz üzerine alındı ve süpernatantlardan alikuatlar (21-45 μl) hazırlandı. Alikuatlardan bir miktarı (10-20 μl) protein konsantrasyonunun hesaplanması için ayrıldı. Alikuatlar kullanılıncaya dek -70°C 'de muhafaza edildi.

3.8.2. Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması

Total protein miktarını hesaplamak için, akalorimetrik deteksiyon sistemi BCA Protein Assay Reagent Kit (Invitrogen) kullanıldı. Meydana gelen bakır-protein kompleksi geniş bir çalışma aralığında artan protein konsantrasyonu ile hemen hemen lineer olan 570 nm'de güçlü absorbans meydana getirmektedir. Donmuş örneklerde protein agregasyonunu yıkmak için kısa süreli olarak sonikasyon işlemi yapıldı. BSA (2 mg/ml) standartları hazırlandı. 96 well plate kullanılarak önce standart eğrisi için BSA kuyulara yüklendi. Daha sonra örneklerin yüklenmesine geçildi. Her bir örnek iki (her bir hücreye 1 μl) kez (duplikasyon) yüklendi. Kullanılan hücre sayısına göre ilave

edilecek A ve B reaktiflerinin miktarları hesaplandı ve karışım hazırlandı. Her bir plate hücresi üzerine reaktif karışımından (200 µl) çok-kanallı pipet kullanılarak ilave edildi. Ardından plate'ler oda sıcaklığında 2-3 saat inkübasyon için bırakıldı, ardından 570 nm'de plate okutucuda okutuldu. Standart eğrisinin R değeri 0,9800'den küçük ise plate cihazda tekrar okutuldu. Herhangi bir örnek için C.V. değeri (duplikasyon yapılan örnekler arasındaki değer farkını gösterir) 10'dan büyük ise deney protokolü tekrar edildi.

3.8.3. Örneklerin Hazırlanması

Donmuş örneklerde protein agregasyonunu yıkmak için kısa süreli olarak sonikasyon işlemi yapıldı. Her bir kuyucuktaki total proteini miktarı 10 µg/µl olacak şekilde hesaplama yapıldı. Örneklerin üzerine önce 1X LDS (Örnek Yükleme Tamponu (Invitrogen)), son olarak da 1M DTT (protein redüksiyonu için) ilave edildi. Örnekler öncelikle protein denatürasyonu için 95°C'de 10 dakika ısıtıldı. Ardından hızlı bir şekilde vortekslendi, yüklenilinceye kadar sıcakta tutuldu.

3.8.4. Jel Elektrofrezisi ile Protein Separasyonu

NuPAGE® Novex %3-8 Tris-Asetat Jel 1,0 mm x 15 kuyucuk (Invitrogen) kullanıldı. Jelin tarağı dikkatli bir şekilde çıkarılarak kuyucuklar hazır hale getirildi. XCell SureLock Mini Cell (Invitrogen) elektroforez sistemi içerisine jel yerleştirildi. Cihazın iç ve dış haznesi Tris-Asetat NuPAGE yürütme tamponu (Invitrogen) ile dolduruldu. Kuyucuklar yükleme işleminden önce yürütme tamponu ile 1-2 kez yıkandı ve daha sonra ilk kuyucuğa protein standardı See Blue Plus Two (Invitrogen) ve ardından hazırlanan örnekler (15 µl) diğer kuyucuklara sırayla yüklendi. Boş kalan kuyucuklar var ise, 1X LDS yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra antioksidan 1X NuPAGE (500 µl) (Invitrogen) yürütme tamponu üzerine ilave edildi. Proteinlerin separasyonu için öncelikle 75V'da 15 dakika, daha sonra 100-150V'da yaklaşık 2,5-3 saat jel elektroforezi yapıldı.

3.8.5. Jelden Membrana Transfer

Yürütme işleminin ardından jel, jel plaklarının arasından çıkarıldı. Spinal kord örnekleri için; jelden membrana transfer için ıslak transfer işlemi uygulandı. Sünger (Invitrogen), filtre kağıdı (Invitrogen), jel, 0,45 µm por çaplı nitrosellüloz membran (Invitrogen), filtre kağıdı, sünger olacak şekilde koyularak sandviç hazırlandı ve bu işlem sırasında sandviç katları arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Hazırlanan sandviç tekrar XCell SureLock Mini Cell (Invitrogen) içine yerleştirildi. Cihazın iç haznesi %20 metanol içeren soğuk transfer tamponu ile dolduruldu. Cihazın dış haznesine ise soğuk distile su konuldu. Transfer tamponu üzerine antioksidan 1X NuPAGE (500 µl) transfer işlemine geçilmeden ilave edildi. Transfer işlemi 40V'da 1,5 saat yapıldı. Transfer işleminin sonunda jelde yüklü proteinler nitrosellüloz membrana geçirildi.

3.8.6. Görüntü Alma

Spinal kord örneklerine ait membran, transfer işleminin ardından 1X TBS (Tris Tamponu) ile ıslatıldı. Ardından spesifik olmayan bağlanmaları bloklamak amacıyla %50 Odyssey bloklama tamponu (LI-COR Biosciences) ve %50 2X TBS içeren karışım ile oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Bloklama işleminin ardından membran üzerine %50 Odyssey bloklama tamponu + %50 2X TBS + %0,1 Tween-20 içeren karışım içerisinde 1:1000 oranında hazırlanan alpha-2-delta-1 ($\alpha_2\delta_1$) monoklonal antikor (Sigma-Aldrich) ilave edildi ve 4°C'de bir gece bırakıldı. Ertesi gün membran TBST (2X TBS + %0,1 Tween-20) ile 4 kez 5 dakika yıkandı. Yıkama işleminin ardından TBST içerisinde 1:5000 oranında dilüe edilen IR Dye 800 CW α Mouse IgG (Odyssey sekonder antikor) ile karanlıkta 1 saat muamele edildi. Süre bitiminde membran önce TBST ile 4 kez 5 dakika yıkandı daha sonra Tween-20'yi membrandan uzaklaştırmak için TBS ile 2 kez 5 dakika yıkandı. Hazır hale gelen membran Odyssey cihazında (yakın-infrared flüoresans deteksiyon sistemi) scan edilerek, görüntüler kaydedildi (Şekil 12).



Şekil 12. Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences)

Membran tekrar kullanılmak ve $\alpha_2\delta_1$ 'e ait sinyali ortadan kaldırmak amacıyla ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution, 10X (Chemicon) ile solüsyon distile su ile dilüe edilip 1X yapıldıktan sonra 10 dakika muamale edildi. Membran daha sonra %50 Odyssey bloklama tamponu ve %50 2X TBS içeren karışım ile oda sıcaklığında 30 dakika bloklandı. Kuyucuklara eşit miktarda protein yüklenip yüklenmediğini doğrulamak için %50 Odyssey bloklama tamponu + %50 TBST içeren karışım içerisinde 1:10000 oranında dilüe edilen beta-aktin monoklonal antikor (Cell Signaling) ile membran 4°C'de bir gece muamele edildi. Ertesi gün membran TBST (2X TBS + % 0,1 Tween-20) ile 4 kez 5 dakika yıkandı. Ardından TBST içerisinde 1:10000 oranında dilüe edilen IR Dye 800 CW α Mouse IgG (Odyssey sekonder antikor) ile karanlıkta 1 saat muamele edildi. Süre bitiminde membran önce TBST ile 4 kez 5 dakika yıkandı daha sonra Tween-20'yi uzaklaştırmak için TBS ile 2 kez 5 dakika yıkandı. Odyssey cihazında scan edilerek, bantlara ait görüntüler kaydedildi.

3.8.7. Hesaplama

Dansitometre analizleri, Odyssey software v3.0,16 (Li-Cor Biosciences) kullanılarak yapıldı. Kısaca, her bir bantın üzerine (bant kalınlığına göre) dikkörtgenler yerleştirildi ve arka zemin yoğunluğu otomatik olarak hesaplamadan çıkarıldı. İmmünopozitif bantlar ilişkili olduğu beta-aktin bantına göre normalize edildi ve her bir veri kontrolün yüzdesi olarak hesaplandı.

3.9. FARMAKOLOJİK TEDAVİ

Kollajen antikoru ile artrit oluşturulmasının ardından farklı farmakolojik gruplardan ilaçlar artrit tablosu oluşturulmuş farelere verildi ve bu ilaçların olası akut analjezik etkileri değerlendirildi. Tüm ilaçlar salin içerisinde çözündürüldü, 100-200 µl'lik bir hacim içinde i.p. olarak enjekte edildi. Kontrol hayvanlarına ise eşit hacimde salin i.p. uygulandı.

İlaçlar inflamatuvar (8-12. günler) ve post-inflamatuvar (26-31. günler) iki farklı dönemde uygulandı. Her bir tedavi grubunda en az iki farklı ilaç uygulandı ve ilaç uygulamaları arasında en az 2 günlük intervaller (yıkama süreleri) bırakıldı (Tablo 7).

İlaçlar: İlaç dozları daha önce yapılan benzer çalışmalar dikkate alınarak hesaplandı.

Diklofenak (Novartis): 30 mg/kg, i.p. uygulandı, etkisi ilaç uygulandıktan 2. ve 4. saatlerde değerlendirildi.

Buprenorfin (Schering-Plough): 0,1 mg/kg, i.p. uygulandı, etkisi ilaç uygulandıktan 1,5 ve 3. saatlerde değerlendirildi.

Anakinra (Biovitrum): 300 mg/kg, i.p. uygulandı, etkisi ilaç uygulandıktan 2. ve 4. saatlerde değerlendirildi.

Gabapentin (Sigma-Aldrich): 100 mg/kg, i.p. uygulandı, etkisi ilaç uygulandıktan 2. ve 4. saatlerde değerlendirildi.

Tablo 7: Farmakolojik Tedavi Grupları

İnflamatuvar Dönem Tedavi Grubu		Post-İnflamatuvar Dönem Tedavi Grubu	
I. GRUP (n=10)		I. GRUP (n=10)	
KAİA+Diklofenak (n=6, 8. gün)	KAİA+Salin (n=4, 8. gün)	KAİA+Diklofenak (n=6, 26. gün)	KAİA+Salin (n=4, 26. gün)
KAİA+Buprenorfin (n=6, 12. gün)	KAİA+ Salin (n=4, 12. gün)	KAİA+Buprenorfin (n=6, 30. gün)	KAİA+ Salin (n=4, 30. gün)
II. GRUP (n=10)		II. GRUP (n=10)	
KAİA+ Anakinra (n=6, 9. gün)	KAİA+ Salin (n=4, 9. gün)	KAİA+ Gabapentin (n=6, 29. gün)	KAİA+ Salin (n=4, 29. gün)
KAİA+Anakinra (n=6, 10. gün)	KAİA+Salin (n=4, 10. gün)	KAİA+Anakinra (n=6, 31. gün)	KAİA+Salin (n=4, 31. gün)
KAİA+ Gabapentin (n=6, 12. gün)	KAİA+Salin (n=4, 12. gün)		

3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmadaki tüm değerler ortalama istatistiksel analizler GraphPad InStat (5.0, GraphPad Software, SanDiego, USA) yazılımı kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılımı kontrol edildikten sonra grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizini (One-way ANOVA) takiben Bonferroni post-hoc test kullanıldı. Western blot analizlerinde ise kontrol ve KAİA grupları arasındaki fark student t-testi ile belirlendi. Anlamlılık için $p < 0,05$ düzeyi esas alındı.

IV. BULGULAR

4.1. VÜCUT AĞIRLIKLARININ TAKİBİ

Enjeksiyonun ardından, deney protokolü süresince kontrol, KAİA ve LPS gruplarındaki farelerin vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunmadı ($p>0,05$), (Şekil 13).

4.2. KLİNİK SKOR

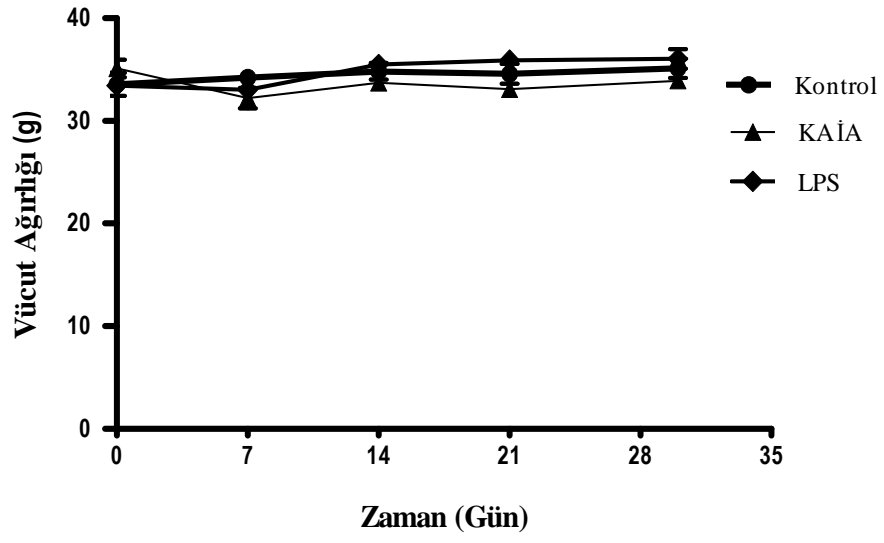
KAİA grubunda monoklonal antikor kokteylinin enjeksiyonunu takiben pençede inflamasyonun klinik belirtileri olan kızarıklık ve şişlik görülmeye başlandı. LPS enjeksiyonunun (5.gün) ardından istatistiksel olarak belirgin hale geldi ($p<0,01$). İnflamasyonun klinik belirtileri 8. günde maksimum düzeye ulaştı ($p<0,001$) ve 18. günden sonra kayboldu ($p>0,05$). Kontrol ve LPS grubunda klinik olarak artrit tablosu gelişmedi (Şekil 14).

4.3. NOSİSEPTİF YANITIN KARAKTERİZASYONU

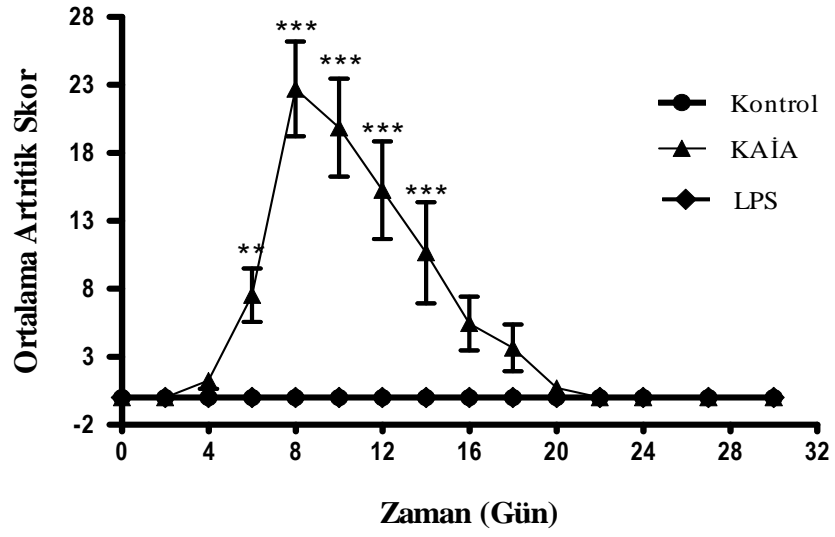
Artritlik fareler (KAİA grubu) artrit indüksiyonunun 2. gününden itibaren taktıl allodini eşik değerlerinde anlamlı derecede azalma gösterdiler ($p<0,001$), eşik değerlerdeki bu azalma deneyin 10. gününde pik düzeye ulaştı ve deneyin son gününe kadar (30. gün) devam etti ($p<0,05$), (Şekil 15a).

KAİA grubundaki hayvanların soğuk allodini yanıtları sadece 8 ve 12. günlerde kontrol grubundan anlamlı derecede farklılık gösterdi ($p<0,01$), artmış olan yalama ve/veya sallama süreleri, daha sonra bazal aktivite değerlerine geri döndü (Şekil 15c).

LPS grubunda taktıl allodini ve soğuk allodini yanıtları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$), (Şekil 15b ve 15d).

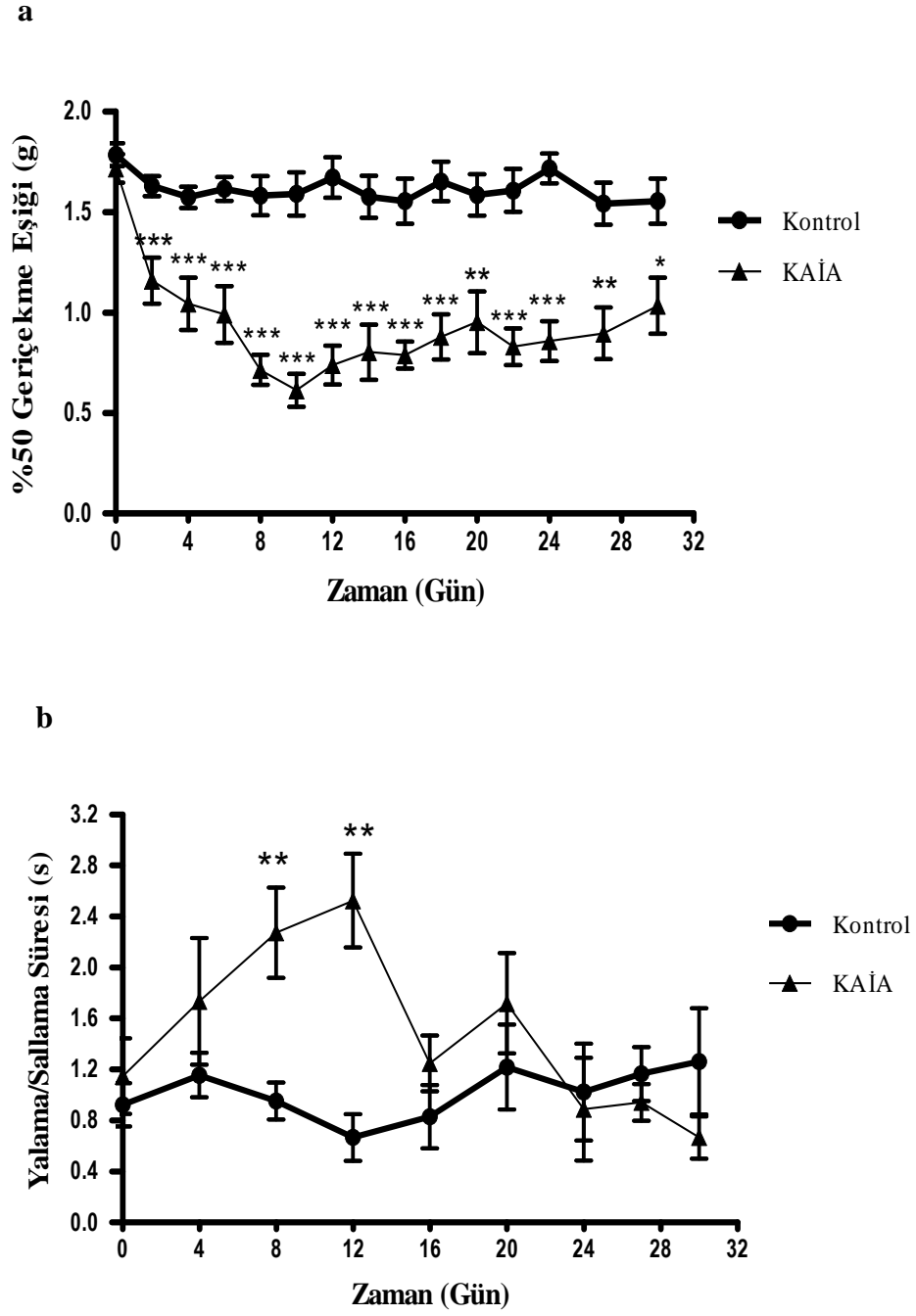


Şekil 13. Kontrol, KAİA ve LPS gruplarında vücut ağırlıklarında anlamlı değişiklik görülmedi

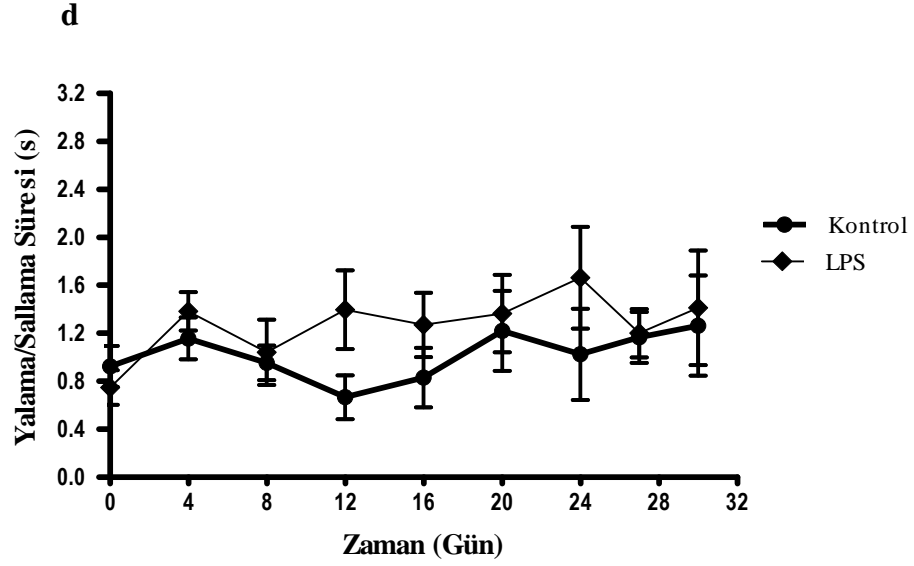
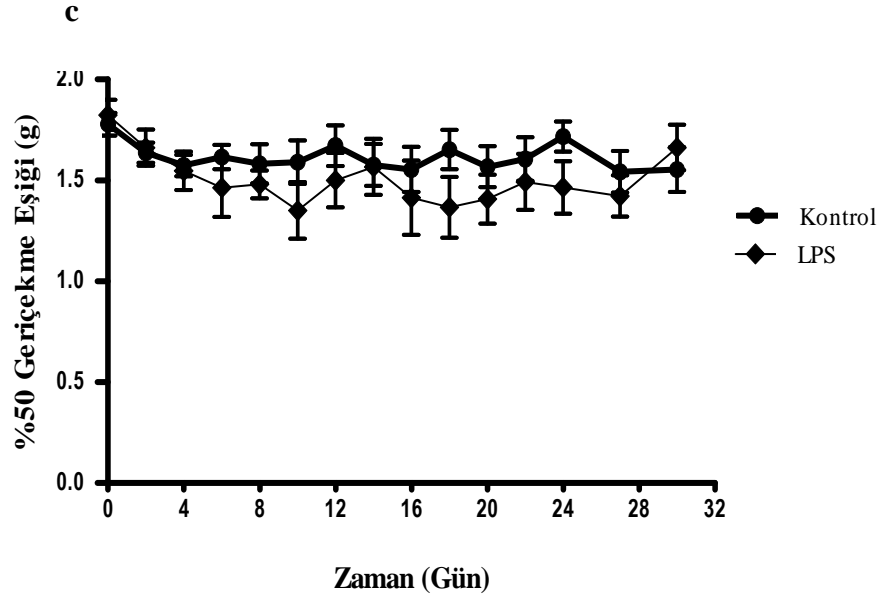


Şekil 14. Kontrol, KAİA ve LPS grubundaki farelerin klinik skorlanması

** p<0,01, *** p<0,001



Şekil 15.(a) Artritlik farelerin taktıl allodini eşik değerlerinde 2. ve 30. günler arasında istatistiki olarak anlamlı azalma görüldü **(b)** Kontrol ve KAİA hayvanlarının soğuk allodini yanıtları arasındaki fark 8. ve 12. günlerde istatistiki olarak anlamlı bulundu * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$



Şekil 15c, d. LPS ve kontrol gruplarının taktil ve soğuk allodini yanıtları arasında anlamlı fark yoktu

4.4. İNFLAMATUAR DÖNEMDE FARMAKOLOJİK TEDAVİ

4.4.1. Artritli Farelerde Diklofenak'ın Etkisi

İnflamatuar dönemin 8. gününde artritli farelerde taktil allodini eşik değerlerinde meydana gelen azalma ($p<0,001$), diklofenak uygulanmasından 2 saat sonra anlamlı olarak değişmedi ($p>0,05$), 4. saatte eşik değerlerde istatistiki olarak anlamlı artış görüldü ($p<0,05$), (Şekil 16).

4.4.2. Artritli Farelerde Buprenorfin'in Etkisi

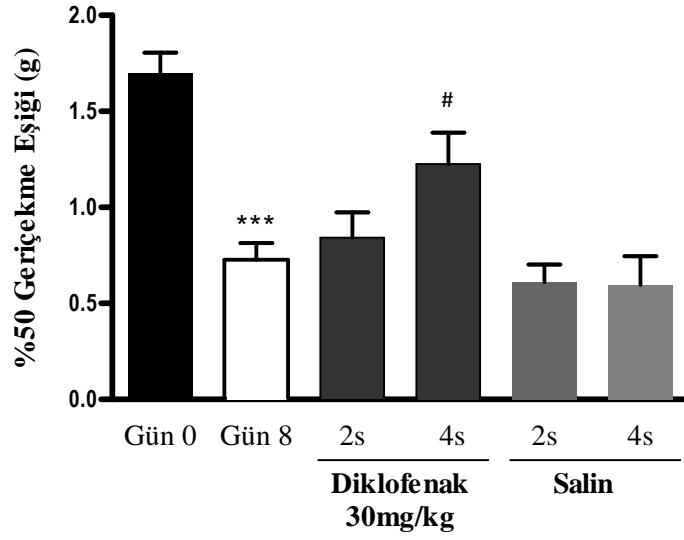
Artrit indüksiyonunu takiben deneyin 12. gününde taktil allodini eşik değerlerinde meydana gelen azalma ($p<0,001$), artritli farelere buprenorfin enjeksiyonundan 1,5 ve 3 saat sonra anlamlı olarak arttı ($p<0,001$), (Şekil 17).

4.4.3. Artritli Farelerde Anakinra'nın Etkisi

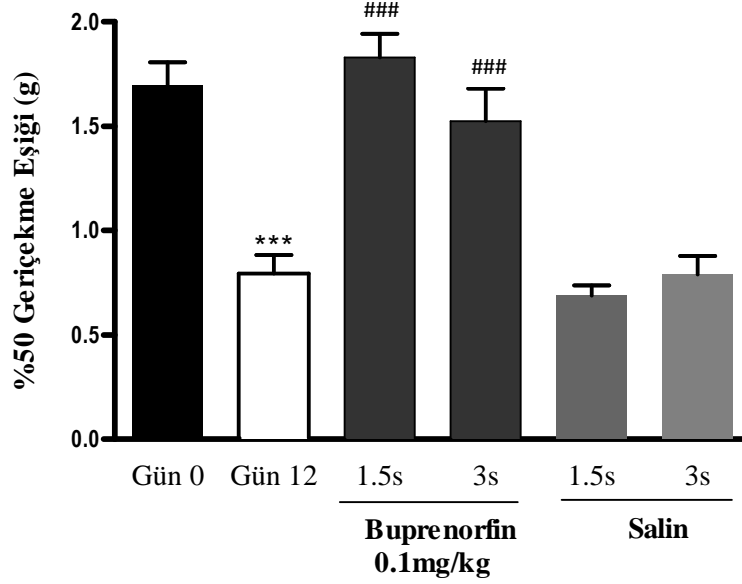
İnflamatuar dönemin 9. ve 10. günlerinde KAİA grubunda taktil allodini eşik değerlerinde meydana gelen azalma ($p<0,001$), anakinra uygulamasını takiben anlamlı olarak değişmedi ($p>0,05$), (Şekil 18a,b).

4.4.4. Artritli Farelerde Gabapentin'in Etkisi

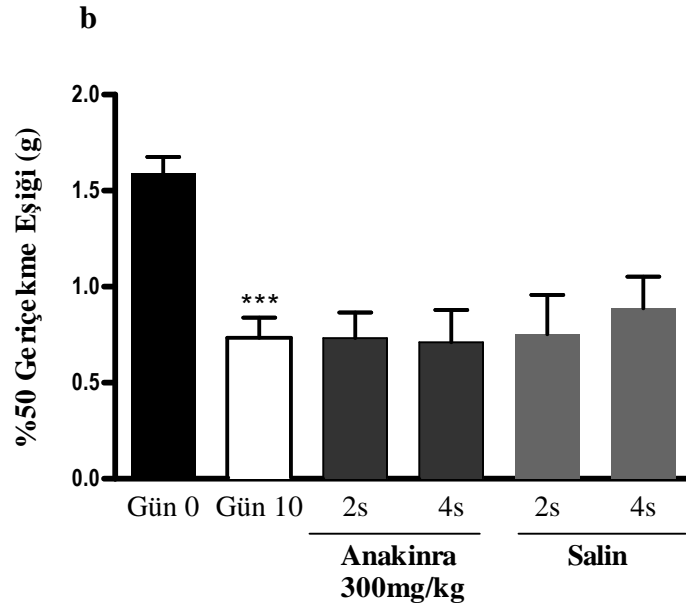
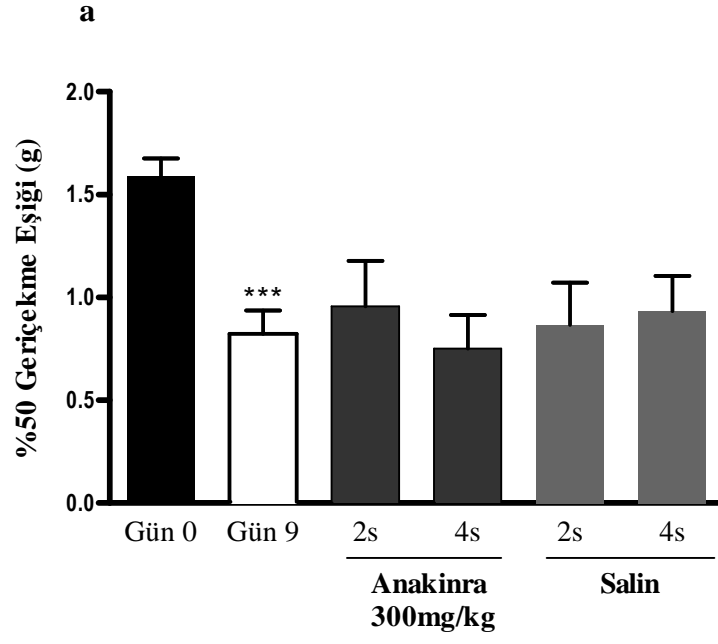
Artrit indüksiyonunu takiben deneyin 12. gününde taktil allodini eşik değerlerinde meydana gelen azalma ($p<0,001$), gabapentin uygulamasından 2 saat sonra anlamlı olarak arttı ($p<0,001$), 4. saatte anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$), (Şekil 19).



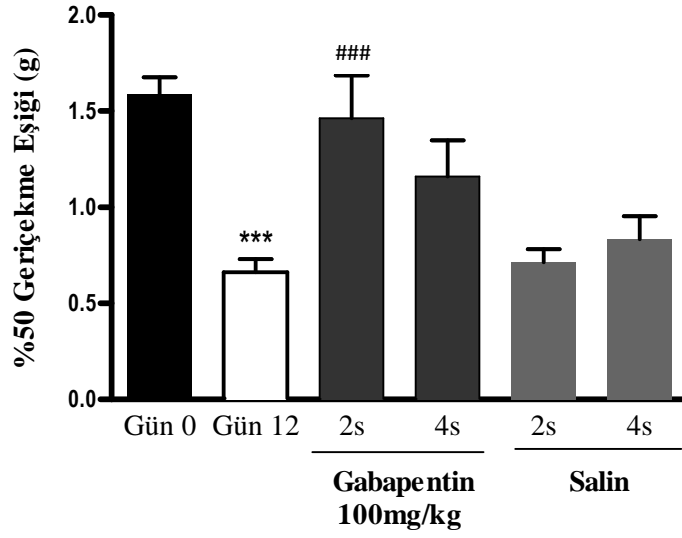
Şekil 16. KAİA grubunda diklofenak uygulamasından 4 saat sonra azalmış olan taktit allodini eşik değerleri anlamlı olarak arttı *** p<0,001 (0.güne göre), # p<0.05 (8.güne göre)



Şekil 17. KAİA grubunda buprenorfin uygulamasından sonra azalmış olan taktit allodini eşik değerleri anlamlı olarak arttı *** p<0,001 (0.güne göre), ### p<0.001 (12.güne göre)



Şekil 18a, b. Anakinra 9. ve 10. günlerde artritlik farelerde azalmış olan takti allodini eşik değerlerini değiştirmedir *** p<0,001 (0.güne göre)



Şekil 19. KAİA grubunda gabapentin 2 saat sonra azalmış olan taktıl allodini eşik değerlerini anlamlı olarak artırdı *** $p < 0,001$ (0.güne göre), ### $p < 0,001$ (12.güne göre)

4.5. POST-İNFLAMATUAR DÖNEMDE FARMAKOLOJİK TEDAVİ

4.5.1. Artritli Farelerde Diklofenak'ın Etkisi

Post-inflamatuar dönemin 26. gününde artritli farelerde devam eden azalmış taktıl allodini eşik değerleri ($p < 0,01$), diklofenak uygulanmasından sonra anlamlı olarak değişmedi ($p > 0,05$), (Şekil 20).

4.5.2. Artritli Farelerde Buprenorfin'in Etkisi

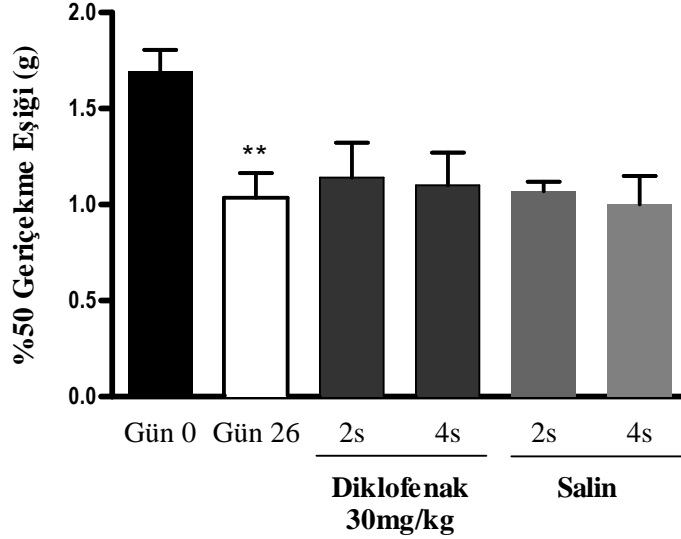
Deneyin 30. gününde taktıl allodini eşik değerlerinde meydana gelen azalma ($p < 0,001$), artritli farelere buprenorfin enjeksiyonundan 1,5 ve 3 saat sonra anlamlı olarak arttı ($p < 0,001$), (Şekil 21).

4.5.3. Artritli Farelerde Gabapentin'in Etkisi

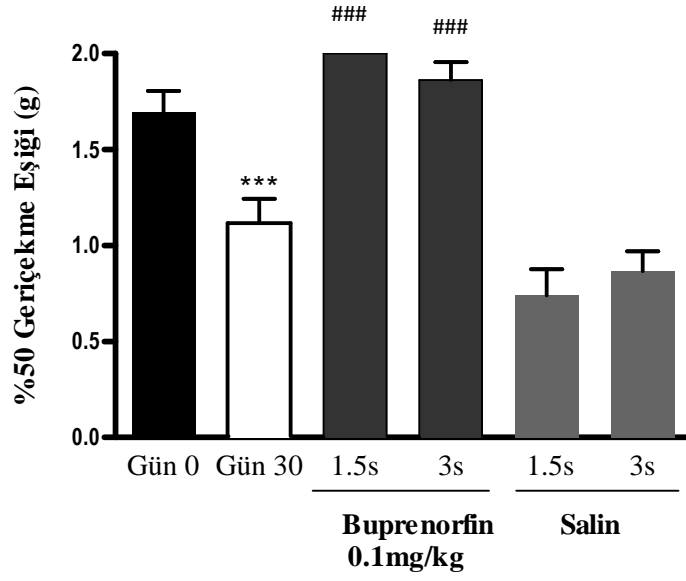
Artrit indüksiyonunu takiben deneyin 29. gününde devam eden azalmış taktıl allodini eşik değerleri ($p<0,001$), gabapentin uygulamasından 2 saat sonra anlamlı olarak arttı ($p<0,05$), 4. saatte anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$), (Şekil 22).

4.5.4. Artritli Farelerde Anakinra'nın Etkisi

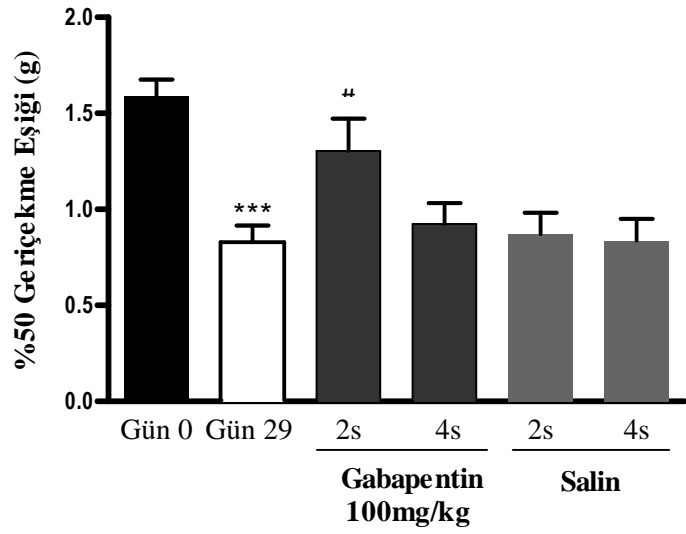
Post-inflamatuvar dönemin 31. gününde KAİA grubunda taktıl allodini eşik değerlerinde meydana gelen azalma ($p<0,001$), anakinra uygulamasını takiben anlamlı olarak değişmedi ($p>0,05$), (Şekil 23).



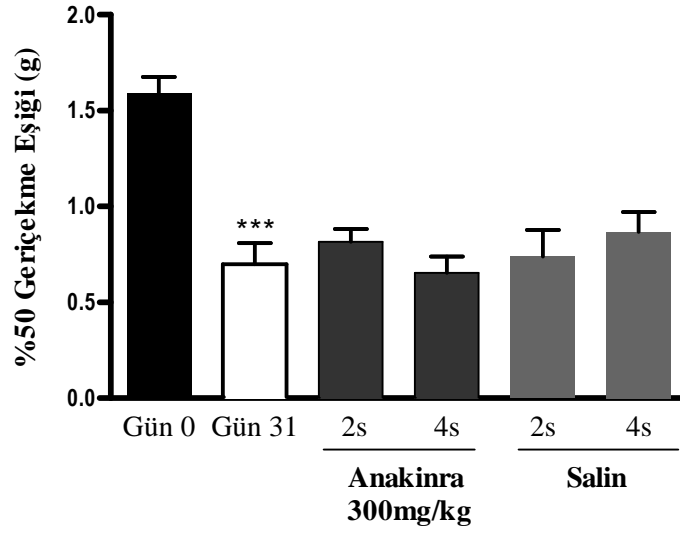
Şekil 20. Diklofenak artritlik farelerde azalmış olan taktıl allodini eşik değerlerini değiştirmedir ** $p<0,01$ (0.güne göre)



Şekil 21. Buprenorfin artritlik farelerde azalmış taktıl allodini eşik değerlerini anlamlı olarak artırdı *** p<0,001 (0.güne göre), ### p<0.001 (30.güne göre)



Şekil 22. KAİA grubunda gabapentin uygulandıktan 2 saat sonra taktıl allodini yanıtlarını anlamlı olarak artırdı *** p<0,001 (0.güne göre), # p<0.05 (29.güne göre)



Şekil 23. Anakinra azalmış taktıl allodini eşik değerlerini değiştirmedir *** $p < 0,001$ (0.güne göre)

4.6. SPİNAL GLİA AKTİVASYONUNUN DEğERLENDİRİLMESİ

4.6.1. Lamina 1-3/4'deki Spinal Astrosit Aktivasyonu

Lumbar dorsal boynuz lamina 1-3/4'ün ışık intesitesi/piksel imaje J software kullanılarak ölçüldü. Kontrol fareleri ile kaşılaştırıldığında 13. günde GFAP immünoreaktivitesinde anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p > 0,05$). 29. günde KAİA grubunda GFAP immünoreaktivitesi anlamlı olarak arttı ($p < 0,05$), (Şekil 24a).

4.6.2. Lamina 1-2'deki Spinal Astrosit Aktivasyonu

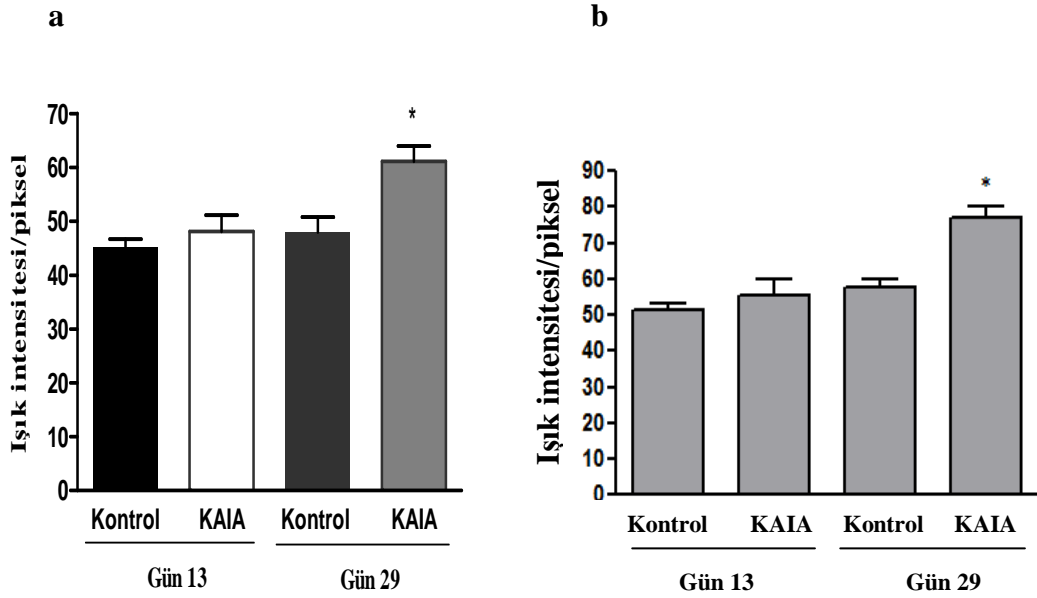
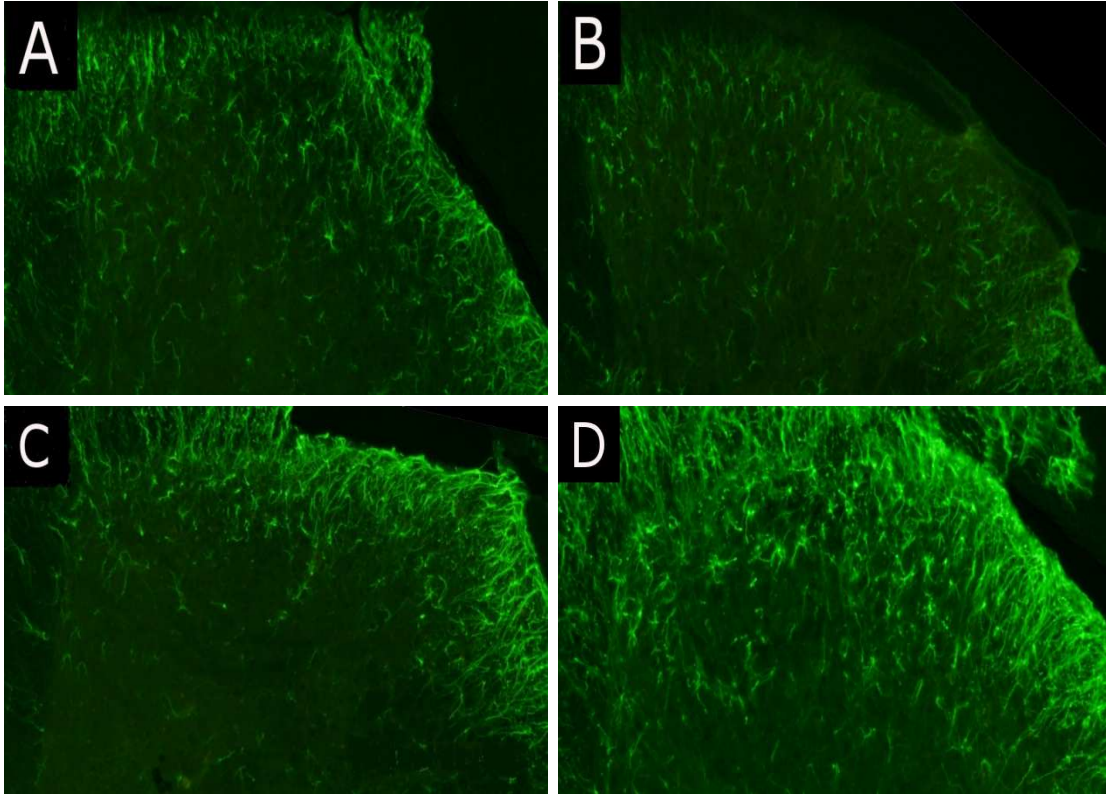
Lamina 1-3/4'den elde edilen sonuçlar dorsal boynuz lamina 1-2 üzerine standardize edilmiş karelerin koyulması esasına dayanan kuantifikasyon metodu ile doğrulandı. Bu kuantifikasyondan elde edilen sonuçlara göre; 13. günde GFAP immünoreaktivitesinde kontrol fareleri ile kaşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p > 0,05$). 29. günde KAİA farelerinde GFAP immünoreaktivitesi anlamlı olarak arttı ($p < 0,05$), (Şekil 24b).

4.6.3. Lamina 1-3/4'deki Spinal Mikroglia Aktivasyonu

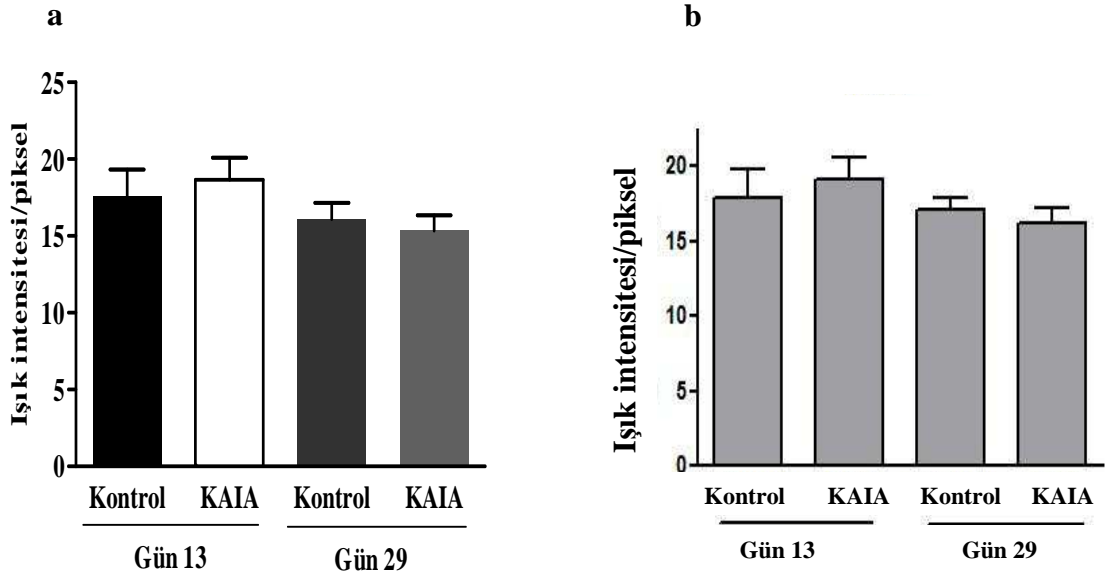
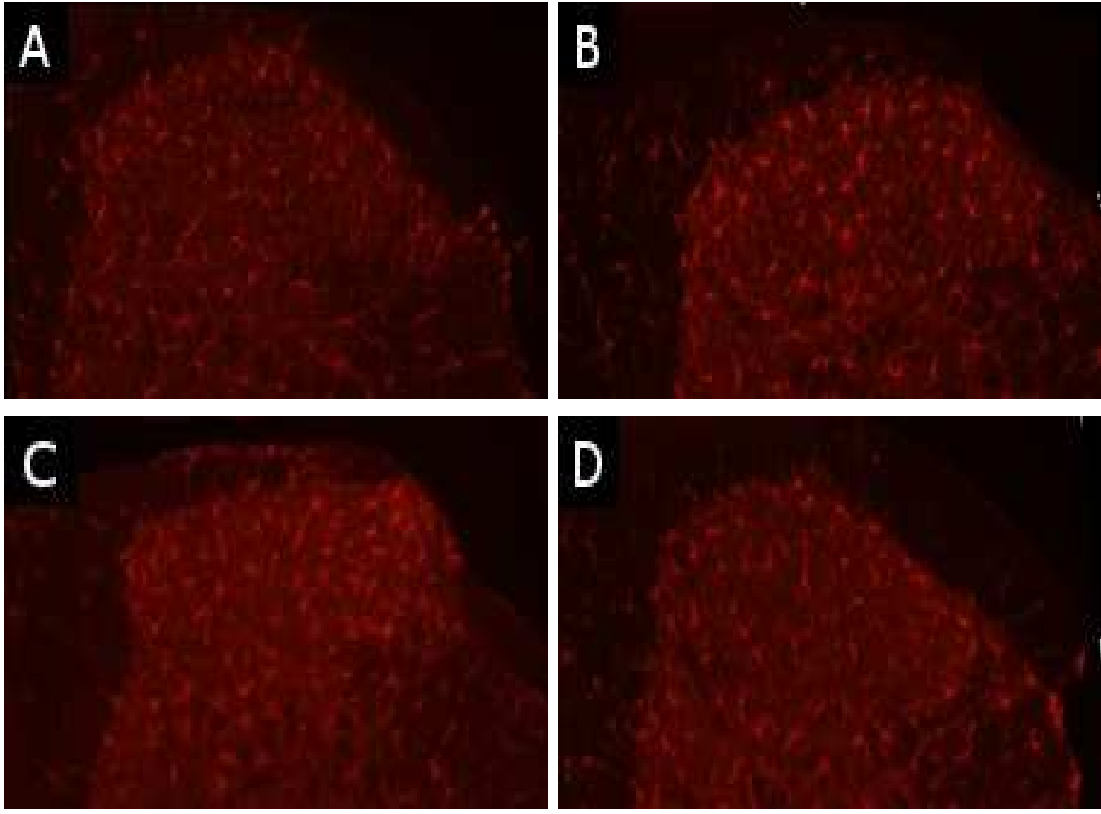
Lumbar dorsal boynuz lamina 1-3/4'ün ışık intensitesi/piksel imaje J software kullanılarak ölçüldü. Artrit indüksiyonunu takiben 13. ve 29. günlerde sakrifiye edilen KAİA farelerinde, eş zamanlı sakrifiye edilen kontrol hayvanlarıyla kıyaslandığında Iba-1 immünoreaktivitesinde her iki günde de anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p>0,05$), (Şekil 25a).

4.6.4. Lamina 1-2'deki Spinal Mikroglia Aktivasyonu

Lamina 1-3/4'den elde edilen sonuçlar dorsal boynuz lamina 1-2 üzerine standardize edilmiş karelerin koyulması esasına dayanan kuantifikasyon metodu ile doğrulandı. Bu kuantifikasyondan elde edilen sonuçlara göre; 13. ve 29. günde Iba-1 immünoreaktivitesinde kontrol fareleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p>0,05$) (Şekil 25b).



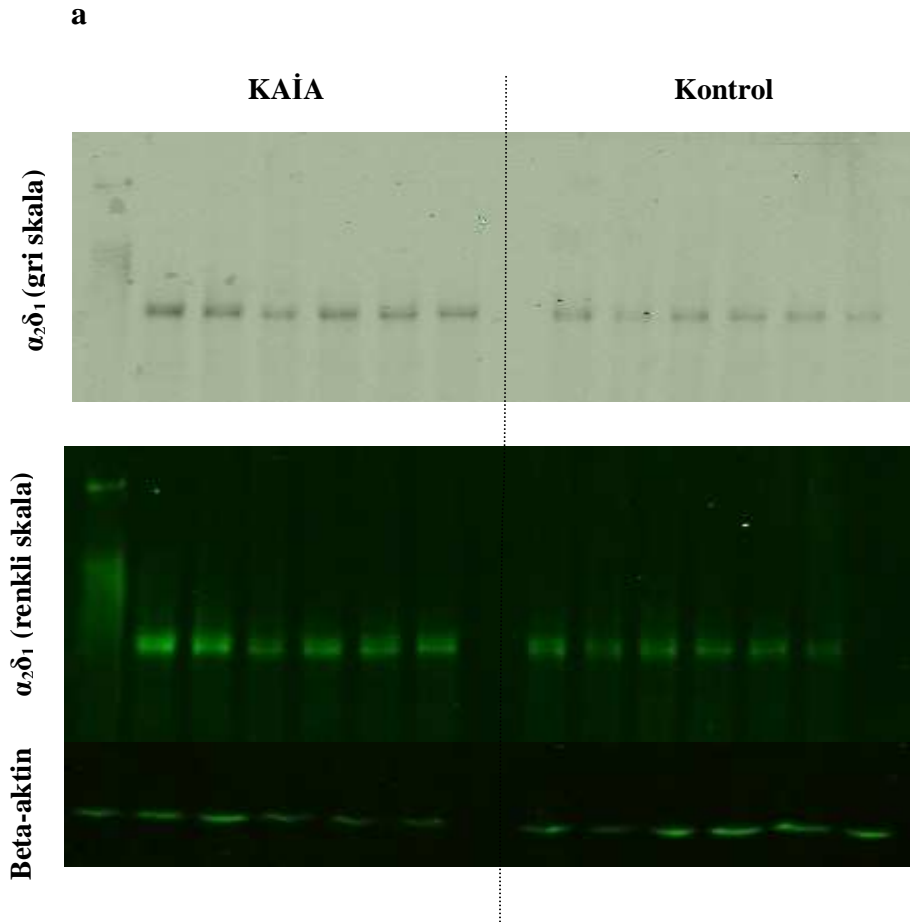
Şekil 24a,b. Kontrol ve KAİA lumbar spinal kord kesitlerinde GFAP immünoreaktivitesi 13. günde kontrol (A) ve KAİA (B) fareleri arasında fark bulunmadı 29. günde kontrol (C) grubuna göre KAİA (D) grubunda GFAP immünoreaktivitesinde artış görüldü * $p < 0,05$



Şekil 25a, b. Kontrol ve KAİA lumbar spinal kord kesitlerinde Iba-1 immünoreaktivitesi 13. günde kontrol (A) ve KAİA (B) fareleri arasında anlamlı fark bulunmadı 29. günde kontrol (C) grubuna göre KAİA (D) grubunda Iba-1 immünoreaktivitesinde anlamlı fark yoktu

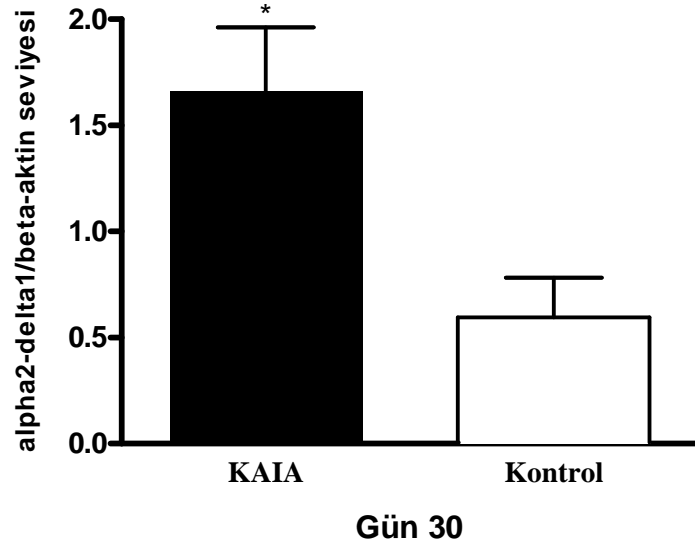
4.7. LUMBAR SPİNAL KORD ALPHA-2 DELTA-1 AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Deney protokolünün 30. gününde sakrifiye edilen kontrol ve KAİA grubuna ait hayvanların lumbar spinal kord'ları çıkarılarak $\alpha_2\delta_1^2$ aktivitesi western blot yöntemi ile tayin edildi (Şekil 26a). Kontrol hayvanları ile karşılaştırıldığında spinal kord seviyesinde $\alpha_2\delta_1$ aktivitesinde anlamlı artış görüldü ($p<0,01$), (Şekil 26b).



² İndirgenme koşulları altında delta peptidler alpha2 subünitesinden ayrılır bu nedenle Cav $\alpha_2\delta_1$ primer antikoru ile elde edilen bant sadece alpha2 subünitesini yansıtmaktadır.

b



Şekil 26. (a) Kontrol ve KAİA hayvanlarından elde edilen Odyssey görüntüleri (gri ve renkli skala) lumbar spinal kord dokularında $\alpha_2\delta_1$ aktivitesini göstermektedir **(b)** Spinal kord seviyesinde KAİA grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $\alpha_2\delta_1$ aktivitesi anlamlı olarak arttı
* $p < 0,05$

V. TARTIŞMA

Artrit, eklem iltihabı olarak tanımlansa da, klinik olarak hastalardaki temel bulgu kronik ağrıdır. Artrit ve ilişkili durumlardaki hastalardan ılımlıdan ciddiye giden ağrı şikayetinde bulunanların oranı diğer kronik rahatsızlığı olan hastalarda görülen ağrı şikayetinin üç katıdır (Backman, 2006). Bugün romatoid artrit (RA) ve osteoartrit (OA) hastalarında kullanılan tedaviler pek çok hastada ağrıyı azaltmakta fayda sağlayamamaktadır, bu ilaçların yan etkileri de kullanımlarını sınırlandıran bir diğer unsur olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle kronik inflamatuvar ağrının etkili tedavisi karşılanmamış bir ihtiyaç olarak kalmaktadır. Bugünkü farmakolojik tedaviler yarım yüzyıldan daha fazla süre önce bulunmuş ilaç mekanizmaları üzerinden sürdürülmektedir. Farmasötik şirketlerin ağrı araştırmalarındaki hatırı sayılır miktardaki yatırımları, ağrı ve ağrı yolaklarının daha iyi anlaşılır hale gelmesine ve hayvan deneylerinden elde edilen olumlu sonuçlara rağmen, yeni mekanizmalara dayanan ilaçların geliştirilmesinde başarılı olamamıştır. Bu nedenle klinik olarak pozitif bir sonucu öngörebilmede daha iyi pre-klinik ağrı modellerine ihtiyaç vardır.

Klinik olarak poliartriti taklit etmeye çalışan inflamatuvar ağrının orjinal modellerinde, inflamatuvar mediyatör (adjuvan), sistemik olarak sıçanlarda kuyruk tabanına enjekte edilmekte ve sonuçta başlangıç olarak injeksiyon alanında şiddetli inflamasyon ve hiperaljezi meydana gelmektedir. Bununla birlikte, bu modeller poliartikülasyon ve sonrasında gelişen göz, kulak, burun ve genital bölge lezyonları, yanı sıra lenf nodu büyümesi ve karaciğer metabolizmasındaki bozulma ile birlikte T hücreleri aracılı gecikmiş hipersensivite oluşturmaktadır. Ancak, bu genel etkiler klinik olarak RA veya OA'de gözlenen patolojiyi yansıtmakta başarılı olamamaktadır. Bu nedenle, modeller inflamatuvar mediyatörün küçük bir alana uygulanması ile sınırlandırılmıştır. Bu sınırlı maruziyet modelleri genel olarak inflamatuvar mediyatörün intra-plantar ve intra-artiküler enjeksiyonu şeklinde olup, çeşitli yöntemler ile ölçülebilen inflamasyon ve ağrıya neden olurlar. Sonuç olarak, daha akut modeller yeni kimyasal maddelerin efikasitesini belirlemek için kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, akut inflamatuvar ağrı modellerinde efikasite ve klinik yarar arasında belirgin ilişki olmasına rağmen, yeni tedavilerin keşfine olanak sağlayamamıştır.

Klinik olarak, inflamatuvar ağrı en çok RA, OA gibi periferel ve santral sinir sistemindeki herhangi bir inflamasyon veya plastik nöronal değişikliklerin zaman içinde meydana geldiği kronik durumlar ile ilişkilidir. Adjuvan enjeksiyonunun ardından gelişen hasardan sonraki saatler içinde meydana gelen eklem ağrısının patofizyolojisi periferel sensitizasyonu içerir. Daha sonraki santral sensitizasyon başlangıçtaki hasara bağlı aralıksız nosiseptif primer aferent değarjı takiben meydana gelebilir. Bu sonuçlar, inflamatuvar hasarın santral aracılı değişiklikleri indükleyebilmek için zamanının olduğu kronik hayvan modellerinin insandaki patolojiyi öngörebilmede daha iyi birer model olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak inflamatuvar eklem ağrıları genellikle kroniktir, bu nedenle de çalışmalar için kronik modeller gerekmektedir. Ayrıca, kronik modellerin avantajı eklem ağrısının oluşması ve devam etmesi için önemli olan patolojik değişikliklerin tüm spektrumunun ortaya konulmasını sağlar ve kronik inflamatuvar ağrının farmakolojik tedavisini hedef alan yeni tedavilerin değerlendirilmesinde daha uygun olabilir (McDougall, 2005, Wilson ve ark., 2005; Schaible ve ark., 2009).

Bu bağlamda, romatoloji ve ağrı araştırmaları arasında köprü kuracağına inandığımız çalışmamızın birinci amacı; yeni bir kronik inflamatuvar ağrı modeli adayı olarak kollajen antikoru ile indüklenen artrit modelinin (KAİA) karakterizasyonunu ortaya koymaktır. Daha önce yapılan çalışmalarda KAİA modelinin deneysel romatoid artrit modeli olarak karakterizasyonu yapılmıştır. RA patogenezinin araştırılması, B ve T hücre yanıtlarının değerlendirilmesi amacıyla bu model sıkça kullanılmıştır (Nandakumar ve ark., 2003; 2004; Rowley ve ark., 2008). Kısaca bu çalışmalarda BALB/c, B10.RIII, QB gibi genetik olarak yatkın fare türlerine kollajen tip II spesifik monoklonal antikor kokteyli kuyruk venine enjekte edilmektedir. Daha sonra artrit indüksiyonunun insidansını ve şiddetini artırmak amacı ile deney protokolünün 5. veya 7. gününde intraperitoneal LPS enjeksiyonu yapılmaktadır. Antikor kokteylinin enjeksiyonunun ardından farklı deney günlerinde skorlanan hayvanlarda artrit indüksiyonun göstergesi olarak klinik olarak değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu klinik değişiklikler farelerin hem ön hem de arka pençelerinde poliartrit indüksiyonu şeklinde olup kızarıklık ve şişlik ile karakterizedir (Nandakumar ve ark., 2004; Nandakumar ve Holmdahl, 2005; 2007). Bilindiği üzere çok sayıda inflamatuvar mediyatör inflamasyon

sirasında üretilmekte ve salınmaktadır. Bunun sonucunda da şişlik, kızarıklık, hipertermi ve ağrı gibi inflamasyonun klasik belirtileri görülmektedir (Schaible ve Richter, 2004).

Çalışmamızda QB fareler kullandık. Hayvanların genel sağlık durumları deney süresince iyiydi ve önemli bir kilo kaybı gözlemlenmedi. Bazı inflamatuvar ağrı modellerinde inflamatuvar ajanın enjeksiyonun ardından belirgin kilo kaybı görülmektedir (Nagakura ve ark., 2003). Hayvanların genel sağlık durumlarının iyi olması onları uzun süreli takibimizde avantaj sağladı.

Antikor kokteylinin enjeksiyonunun ardından belirmeye başlayan klinik değişiklikler özellikle LPS enjeksiyonunu (5.gün) takiben istatistiki olarak anlamlı hale geldi. Klinik olarak KAİA farelerinde gördüğümüz değişiklikler daha önce bu modelde aynı tür fareler kullanılarak yapılan çalışmalara benzer bir patern gösterdi (Nandakumar ve Holmdahl, 2005). LPS ve kontrol grubunda beklenildiği şekilde (Nandakumar ve ark., 2003) klinik değişiklik görülmedi. LPS antikor aracılı artrit insidansını ve şiddetini artırır, epitop spesifitesini atlar ve pro-inflamatuvar mediyatörleri ve toll-benzeri reseptör 4 (TLR-4) sinyali gibi kompleman komponentlerinin aktivasyonunu artırır. Ancak artrit özelliği yoktur (Nandakumar ve Holmdahl, 2006).

Daha önce yapılan çalışmalarda, kollajen antikor ile indüklenen artrit modelinde ağrı davranışı değerlendirilmemiştir. Çalışmamız artrit indüksiyonunu takiben artrit farelerdeki ağrı davranışının değerlendirilmesi ve hastalığın ilerlemesi sırasında eşlik eden nosiseptif süreçte meydana gelen değişiklikleri incelemek amacıyla KAİA modelinin araç olarak kullanıldığı ilk çalışmadır. Ağrı davranışının değerlendirilmesinde daha önce yapılan birçok çalışmada kullanılan standart davranış metodları olan **von Frey metodu (taktil allodini)** ve **aseton damla testi (soğuk allodini)** kullanılmıştır (Tablo 3 ve 4).

Antikor kokteylinin enjeksiyonun ardından fareler taktil allodini eşik değerlerinde anlamlı derecede azalma gösterdiler ve bu azalma deneyin son gününe (30. gün) kadar devam etti. Enjeksiyonu takiben (2. gün) hemen başlangıçta görülen azalmış taktil allodini eşik değerleri, pençe ve el-ayak bileklerinde görülen şişlik kızarıklık gibi klinik belirtiler ile korelasyon gösterdi. Ancak, ilginç olarak inflamasyon belirtilerinin kaybolmasından sonra da mekanik hipersensivite devam etti. Çalışmamızda artrit

indüksiyonunu takiben gelişen ve deneyin son gününe dek devam eden taktıl allodini eşik değerlerindeki azalma persistan bir ağrı paterni göstermektedir. Bizim sonuçlarımızdan farklı olarak, bir başka poliartrit modeli olan kollajenle indüklenen artrit (KİA) ile yapılan çalışmada artrit indüksiyonunu takiben artan klinik skor ve pençe şişliği deney süresince hiperaljezi ile korele ilişki göstermiştir ve inflamasyon belirtileri deney süresince kaybolmamıştır (Inglis ve ark., 2007). Yine bir başka poliartrit modeli ile yapılan çalışmada ise farelerde K/BxN serum transferinin ardından pençe ve bilek şişliği ile etkilenen eklemlerin sayısında artan hipersensivite ile uyumlu artış görülmüştür. Ancak sinovitin histolojik ve gözlemlenen belirtilerinin kaybolmasından iki hafta sonra bile çalışmamızdaki sonuca benzer şekilde mekanik hipersensivite değerlerinin bazal aktivite değerlerine dönmediği ve devam ettiği gösterilmiştir (Christianson ve ark., 2010).

Hayvan modellerinde görülene benzer şekilde RA hastalarında da ağrı eşik değerlerinde düşme görülmektedir. Romatoid artrit hastalarının istatistiksel olarak daha düşük ağrı eşiklerine sahip oldukları ve hem inflame hem de inflame olmayan dokuların ağrılı uyarana artmış hassasiyeti görülmektedir. Ayrıca ağrı hassasiyetindeki bu artış RA'li bireylerde hastalığın kronikleşen süreciyle birlikte daha da artıyor görünmektedir (Gerecz-Simon ve ark., 1989; Edwards ve ark., 2009).

Anti-CII mAb'ler ile yapılan in vitro çalışmalar bu antikorların kondrositlere karşı inflamatuvar mediyatörlerin yokluğunda bile patojenik olabileceğini, zayıflatılmış kartilaj formasyonuna, kollajen fibrinogenezisin güçlü inhibisyonuna ve CII fibrillerin ekstraselüler matriks veya artmış matriks sentezi içindeki deorganizasyonuna katıldığını göstermektedir. Bundan başka bu mAb'lerin daha önceden oluşmuş kartilaj üzerinde de zararlı etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular antikorların patojenik olayları inflamatuvar fazdan bile önce başlattıklarını gösterebilir (Nandakumar ve Holmdahl, 2006). Çalışmamızda inflamasyon belirtileri ortaya çıkmadan görülen azalmış taktıl allodini yanıtları da bu bulgular ile desteklenebilir.

Çalışmamızda soğuk allodini yanıtları hayvanların klinik skorları ile korelasyon gösterdi. Klinik skorun arttığı ve maksimum düzeye ulaştığı dönemde (8-12.gün) artrit farelerin aseton uygulanmasının ardından pençe yalama ve/veya sallama süreleri kontrol hayvanları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttı. Taktıl allodini

yanıtlarından farklı olarak, önce artan soğuk allodini eşik değerleri daha sonra bazal aktivite değerlerine geri döndü.

İnflamatuvar ağrının genel özellikleri arasında ısı ve soğuk allodini yer alır (Katsura ve ark., 2007). Soğuk bir çevreye maruziyetin romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar koşullardaki hastalarda ağrıyı sıklıkla indüklediği, RA hastalarının sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında daha düşük eşik değerlere sahip oldukları ve yeni bir nosiseptif soğuk uyarısını daha çok ağrı verici olarak tanımladıkları gösterilmiştir (Jahanshahi ve ark., 1989). Biz de bu nedenle çalışmamızda artrit farelerde soğuk allodini yanıtlarını değerlendirdik. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde, sıçanlarda complete freund's adjuvant (CFA) ile indüklenen inflamasyonda hayvanlarda ısı ve soğuk allodini meydana gelmiştir (Katsura ve ark., 2007). Elde ettiğimiz sonuçlar artrit farelerde gördüğümüz soğuğa gösterilen artmış hassasiyetin direkt olarak inflamasyonla bağlantılı olduğunu ve inflamasyon belirtileri varken ortaya çıktığı sonucunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda deney protokolünün 5.gününde 25 µg/ fare lipopolisakkarit (LPS)'i, i.p. olarak uyguladık. Sonuç olarak, LPS grubunda ne taktit allodini ne de soğuk allodini eşik değerleri kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir azalma göstermedi. Daha önce fare veya sıçanlarda LPS ile yapılan nosiseptif davranış çalışmalarında LPS'in kronik olmayan fakat akut nosiseptif etkisi gösterilmiştir (Cahill ve ark., 1998; Kehl ve ark., 2004; Satyanarayana ve ark., 2004; Suo ve ark, 2008; Guo ve Schluesener, 2008). Bu nedenle biz de çalışmamızda artrit indüksiyonunu takiben gözlemlediğimiz hipersensivitenin LPS etkisinden bağımsız olduğunu kanıtlamak amacı ile sadece LPS uyguladığımız farelerde taktit allodini ve soğuk allodini yanıtlarını değerlendirdik. Önceki çalışmalarda genel olarak bizim kullandığımız dozdan daha yüksek LPS dozu (5 mg/kg, 2 mg/kg, 1 mg/kg) kullanılmıştır (Cahill ve ark., 1998; Suo ve ark, 2008; Guo ve Schluesener, 2008). Farelerde grip force cihazı ile ağrı davranışının değerlendirildiği bir çalışmada LPS (0.9 mg/kg, i.p.)'e bağlı gelişen hipersensivitenin enjeksiyondan sonraki 9. saatte pik yaptığı gösterilmiştir (Kehl ve ark., 2004). Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada ise LPS (5 mg/kg, i.p) enjeksiyonundan sonra 24. saatte maksimum mekanik hiperaljezi gösterilmiştir ve 13 gün süresince gün aşırı ölçülen arka pençe geriçekme eşiği yanıtlarında kronik bir

hiperaljezi yanıtı gözlemlenmemiştir (Guo ve Schluesener, 2006). Sonuç olarak, LPS enjeksiyonuna bağlı olarak ortaya çıkan hiperaljezi farklı nosiseptif davranış modellerinde benzer bir şekilde akut bir patern göstermektedir, bizim çalışmamızda LPS enjeksiyonundan (5. gün) en az 24 saat sonra ölçüm yapıldığından (6. gün) LPS grubunda nosiseptif yanıtlarda herhangi bir değişiklik görülmemesi bu şekilde açıklanabilir.

KAİA modelinde ağrı davranışının karakterizasyonun ardından artritlik farelerde farklı gruplarda yer alan ve bugün RA tedavisinde kullanılan ilaçların etkilerini modelin hem inflamatuvar hem de post-inflamatuvar döneminde **von Frey metodu** ile değerlendirdik.

Çalışmamızda ilk olarak karma etkili COX inhibitörü olan diklofenak'ı kullandık. KAİA modelinin inflamatuvar döneminde (8. gün) 30 mg/kg, i.p. uyguladığımız diklofenak enjeksiyonun ardından 2. saatte etkili olmazken, 4. saatte azalmış olan taktıl allodini eşik değerlerini anlamlı olarak artırdı. Ancak diklofenak post-inflamatuvar dönemde (26. gün) etkili değildi. RA ve OA'deki akut ağrının ve yanı sıra, belirti ve semptomlarının tedavisinde kullanılan bugünkü anti-inflamatuvar tedavilerin merkezinde PG üretiminin NSAİİ'ler tarafından modülasyonu yer alır (Pulichino ve ark., 2006). PG'ler ve özellikle PGE2 nosiseptörlerin ve inflame eklemleri içeren inflame dokudaki mekanoreseptörlerin sensitizasyonuna katılır (Schaible ve ark., 2006). Periferal sensitizasyona ek olarak, eklem iltihabı gibi çeşitli inflamatuvar modellerde özellikle COX-2'nin inflamasyonun indüksiyonundan sonra birkaç saat içinde up-regüle olduğu bunun sonucunda da COX ürünlerinin özellikle de PGE2'nin spinal hipereksitabilitenin (santral sensitizasyon) oluşumuna belirgin olarak katıldığı gösterilmiştir (Telleria-Diaz ve ark., 2010). PGE2 nosiseptif stimülasyonu takiben spinal kord dorsal boynuzundan salınır ve ağrı sinyalinde önemli role sahiptir. COX inhibitörleri tarafından sağlanan analjezi büyük oranda santral PGE2'nin üretiminin inhibisyonuna dayanır ve bu nedenle direkt olarak anti-inflamatuvar etkileri ile bağlantılı değildir (Schaible ve ark., 2006).

Sonuçlarımızdan farklı olarak, bir başka inflamatuvar ağrı modeli olarak CFA'nın kullanıldığı çalışmada profilaktik olarak ağrı yanıtlarının en yüksek olduğu (9.

günde) dönemde uygulanan diklofenak'ın (10, 30, 100 mg/kg, ip) hiçbir dozda mekanik allodini (von Frey metodu) yanıtlarını etkilemediği gösterilmiştir (Nagakura ve ark., 2003). Sıçanlarda oluşturulan osteoartrit modelinde ise 30mg/kg, subkutan (s.c.) olarak uygulanan diklofenak artrit indüksiyonunu takiben modelin erken/inflamatuar ve geç dönemlerinde uygulanmıştır. Her ne kadar insandaki OA inflammatuar olmayan bir hastalık olarak tanımlanıyor ise de hastalığın patolojisi ve eşlik eden ağrı ile ilişkili belirgin moleküler ve klinik inflammatuar göstergeler vardır. Bu bağlamda, bizim elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde diklofenak sadece inflammatuar dönemde ağrı davranışlarını azaltmıştır. Bu çalışmada, diklofenak ile sadece erken dönemde görülen etki, daha geç dönemdeki ağrı davranışında inflammatuar olmayan mekanizmaların rol oynadığı görüşüyle açıklanmıştır (Fernihough ve ark., 2004). Farklı olarak, bu modelde diklofenak'ın analjezik etkisi enjeksiyondan 1 saat sonra görülmüştür. Bu farklılıklar, tür farklılığına (sıçan) ve ilacın uygulama yolunun farklı (s.c.) olmasına bağlanabilir. Başka bir NSAİİ'nin (Ketorolak) kullanıldığı K/BxN modelinde yapılan çalışmada ise çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde NSAİİ sadece modelin inflammatuar döneminde etkili bulunmuş, ancak geç döneminde etkisiz olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç; NSAİİ'lerin ağrı sürecinin post-inflamatuar döneminde küçük bir role sahip olduğunu gösterebileceği ya da tek doz uygulamasının yeterli olamayabileceği şeklinde açıklanmıştır (Christianson ve ark., 2010). Bu görüşü destekler nitelikte, karragenan ile yapılan subkronik inflammatuar modelde 3 mg/kg, per oral (p.o.) diklofenak 15 gün boyunca uygulanmıştır. Diklofenak pençe ödemi anlamlı derecede birkaç gün içinde azaltmasına rağmen, anti-allodinik etkiler ancak birkaç gün geçtikten sonra görülmüştür (Peter-Szabo ve ark., 2007).

Çalışmamızda 0,1 mg/kg, i.p. olarak uyguladığımız parsiyel etkili mü reseptör agonisti buprenorfin'in KAİA modelinin hem inflammatuar (12. gün) hem de post-inflamatuar döneminde (30. gün) etkili olduğunu bulduk. Enjeksiyonun ardından buprenorfin azalmış taktik allodini eşik değerlerini 1.5 saat sonra artırdı ve 3. saatte de etkisi devam etti. Çalışmalar opioidlerin OA ve RA hastalarında uyku ve hayat kalitesini düzelttiğini göstermektedir (Dickson, 2005). Parsiyel etkili opioid reseptör agonisti olan buprenorfin'in daha önce hayvanlarda akut ve kronik ağrı yanıtlarının değerlendirildiği çalışmalarda ve hem inflammatuar hem de nöropatik ağrı modellerinde

etkili olduğu, gösterilmiştir (Christoph ve ark., 2004; Yamamoto ve ark., 2006; Santiago ve ark., 2009). Periferik inflamasyon santral bölgeleri etkiler ve opioid etkisini değiştirir. İnflamasyon çeşitli opioid reseptör agonistlerinin spinal potensini artırır. Opioidlerin inflame dokudan kaynaklanan nosisepsiyonu lokal periferik etki göstererek, olasılıkla duysal sinirlerdeki terminal bölge yolu ile inhibe ederler (Przewocki ve Przewłocka, 2001). Sonuç olarak KAİA modelinde buprenorfin ile elde ettiğimiz olumlu sonuçlar aslında beklenen sonuçlar olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bir diğer ilacımız olan voltaj kapılı kalsiyum kanal inhibitörü gabapentinin (GBP) hem inflamatuvar (12. gün) hem de post-inflamatuvar dönemde (29. gün) etkili olduğunu gösterdik. 100 mg/kg, i.p. olarak uygulanan GBP 2 saat sonra azalmış taktik allodini eşik değerlerini anlamlı olarak artırdı, 4 saat sonra ise etkisi ortadan kalktı. Nöropatik ağrının yanı sıra GBP'nin sıçanlarda inflamasyonla indüklenen ağrıyı azalttığı gösterilmiştir ancak, analjezik etkisinin temel mekanizması bilinmemektedir. Kaolin/karragenan ile indüklenen inflamatuvar artrit modelinde gabapentin termal hiperaljeziye karşı santral, mekanik hipersensitiviteye karşı da periferik etki göstermiştir (Fernihough, 2004). Bununla birlikte, GBP'nin çeşitli inflamatuvar ağrı çalışmalarında efektif analjezik ilaç olduğu gösterilmekle birlikte bu modellerdeki ne ağrı davranışını değerlendiren tüm testler de ne de tüm inflamatuvar ağrı modellerinde etkili bulunmamıştır, sonuçlarda görülen farklar olasılıkla testlere, ilaç uygulama yoluna ve modele bağlıdır (Curros-Criado ve Herrero, 2007). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları destekler şekilde K/BxN modelinde hem inflamatuvar hem de post-inflamatuvar dönemde etkili olan ilaç GBP olarak bulunmuştur (Christianson ve ark., 2010). Bundan başka, bizim sonuçlarımızdan farklı olarak, OA modeli kullanılarak GBP'in (100mg/kg, p.o.) analjezik etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada artrit indüksiyonundan 3 (erken/inflamatuvar dönem), 14 (gelişme dönemi) ve 28 gün (geç dönem) sonra taktik allodini ve mekanik hiperaljezi yanıtları değerlendirilmiştir. GBP hiçbir dönemde mekanik hiperaljezi yanıtlarını değiştirmezken, taktik allodini yanıtlarını sadece inflamasyonun gelişme döneminde azaltmış, ancak modelin geç döneminde etkili bulunmamıştır. Bir romatoid artrit modeli olan KAİA modelinde GBP'nin analjezik etkilerinin nedenlerini araştırmak ve mekanizmayı değerlendirmek için ileri çalışmalar gerekmektedir. GBP ile elde ettiğimiz olumlu sonuçların ardından, bu sonuçlarımızı

desteklemek amacıyla, GBP'nin de $\alpha 2\delta 1$ subünitesine bağlanarak etki gösterdiği bilindiğinden KAİA modelinde deney protokolünün son günü (30. gün) sakrifiye edilen farelerde western blot analizi ile $\alpha 2\delta 1$ seviyelerine baktık. Sonuç olarak spinal kord $\alpha 2\delta 1$ seviyelerinde artış gördük. Çeşitli çalışmalar voltaj-kapılı kalsiyum kanallarının $\alpha 2\delta 1$ subünitesinin sinir hasarının ardından spinal kord ve DRG'de yüksek düzeyde up-regüle olduğunu göstermektedir (Luo ve ark., 2001; Li ve ark., 2006; Boroujerdi ve ark., 2008). Bu sonuçlar, hayvan modellerinde gelişmiş olan nöropatik ağrı ile ilişkilendirilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda inflamatuvar bir ağrı modelinde $\alpha 2\delta 1$ seviyeleri incelenmemiştir. Bu nedenle bir ön çalışma niteliğindeki sonuçlarımız arthrit ile indüklenen ağrı modelinde $\alpha 2\delta 1$ seviyelerindeki artışı göstermesi bakımından önemlidir. Bir nöropatik ağrı metodu olan spinal sinir ligasyonu çalışmasında ligasyon yapılan sıçanlarda hem DRG hem de spinal kordda ligasyondan sonraki 5. ve 14. günlerde $\alpha 2\delta 1$ seviyelerinde up-regülasyon görülmektedir. İlginç olarak bu çalışmada spinal kord $\alpha 2\delta 1$ seviyesindeki artışın allodininin devamlılığı için değil fakat, başlangıcı için kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir (Boroujerdi ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda ise, deneyin son günü spinal kord $\alpha 2\delta 1$ düzeyinde artış görülmektedir. Elde ettiğimiz sonuçların daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Özellikle daha erken dönemlerde sakrifiye edilen hayvanlarda spinal kord $\alpha 2\delta 1$ seviyelerinin değerlendirilmesi ve ayrıca hem erken hem de geç dönemde $\alpha 2\delta 1$ seviyelerinin DRG'lerde de değerlendirilmesi önemli olacaktır. Bu bağlamda, KAİA modelinde inflamatuvar ağrıdan nöropatik ağrıya bir geçişin olup olmadığı sorularının yanıtlanması açısından da kuşkusuz önem taşımaktadır.

Çalışmamızda son olarak IL-1Ra olan anakinra'nın etkilerini değerlendirdik. Anakinra (300 mg/kg, i.p.) ne inflamatuvar dönemde (9.ve 10. günler) ne de post-inflamatuvar dönemde (31. gün) etkili bulunmadı. Enjeksiyondan sonraki 2. ve 4. saatlerde azalmış taktıl allodini eşik değerleri üzerindeki etkileri değerlendirilen anakinra kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik meydana getirmedi. Son dönemde yapılan çalışmalar IL-1 β gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin noksius uyarılarının transmisyonunu ve işlenmesini kolaylaştırdığını göstermektedir. IL-1 β inflamatuvar ve nöropatik ağrı durumlarında spinal kordda up-regüle olmaktadır.

IL-1Ra'nın anti-allodiniik etkiler meydana getirdiği sıçanlarda yapılan nöropatik ağrı modellerinde gösterilmiştir (Zhanga ve ark., 2008). Biz de bu nedenle anakinra'nın analjezik etkisini KAİA modelinde değerlendirdik. Baamonde ve ark.larının çalışmasında, 30-300 mg/kg, i.p. anakinranın etkisi CFA ve osteosarkomanın indüklediği ağrıda değerlendirilmiştir. Osteosarkoma ile indüklenen mekanik hiperaljezi 100 ve 300 mg/kg anakinra tarafından doz bağımlı olarak injeksiyondan 2 ve 4 saat sonra inhibe edilmiştir. CFA ile indüklenen mekanik hiperaljezi kısmen ve sadece 300mg/kg anakinra tarafından 2. ve 4. saatlerde azaltılmıştır. Bizim sonuçlarımız ile benzer şekilde anakinranın maksimum dozu (300 mg/kg) her iki modelde de mekanik allodini yanıtlarını değiştirmemiştir. Anakinra'nın hem inflamatuvar hem de neoplastik mekanik allodiniyi değiştirmemesi ilginçtir. Önceki çalışmalardan bazıları nöropatik orjinli allodininin IL-1 β bağımlı olduğunu bazıları ise bağımsız olduğunu göstermektedir. Her iki model de spinal korddaki IL-1 β seviyelerinin artmasına rağmen hiçbir dozda anakinra'nın etkili olmaması bu sitokinin allodiniik yanıtta katılmadığı olasılığı ile açıklanmıştır. Bununla birlikte, yine bu çalışmada anakinra mekanik ve termal hiperaljezi yanıtlarında da inflamatuvar ağrı modelinden daha çok osteosarkoma modelinde etkili bulunmuştur ve bu sonuçlar IL-1ra tedavisinin romatoid artrit dışındaki patolojik durumların tedavisi için etkili bir tedavi stratejisi olabileceği görüşüyle açıklanmıştır (Baamonde ve ark., 2007). Nitekim klinik bir çalışma anakinra'nın romatoid artrit tedavisindeki etkisini zayıf olarak nitelendirmektedir (Prescrire Int., 2004). Bizim elde ettiğimiz sonuçlar da bu varsayımlar üzerinden açıklanabilir. Bunun dışında, intratekal (i.t.) IL-1ra kullanılarak yapılan ve CFA ile indüklenen modelde profilaktik olarak uygulanan IL-1Ra, termal ve mekanik hiperaljezi testinde artmış yanıtları azaltmıştır (Zhanga ve ark., 2008). Benzer sonuçlar bir başka çalışmada da gösterilmiştir (Weyerbacher ve ark., 2009).

KAİA modelinde anakinra'nın etkinliğinin ortaya konulabilmesi için başka çalışmalara ihtiyaç vardır. Öncelikle anakinra RA tedavisinde kronik kullanılan bir ilaçtır. Belki de analjezik etkilerinin görülebilmesi için kronik olarak uygulamak gerekmektedir. Biz çalışmamızda inflamatuvar dönemde ilk gün (9. gün) yanıt göremediğimizden ikinci gün (10. gün) tekrar anakinra uyguladık. Ancak ikinci günde de kontrol yanıtları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı. Olasılıkla bir etki

görebilmek için daha uzun süreli tedavi uygulamak gerekmektedir. Anakinra'nın periferik etkilerinin dışında santral etkilerinin değerlendirilebilmesi için i.t. olarak uygulanması da önemli olabilir. Bununla birlikte ağrı ile indüklenerek up-regüle olan IL-1 β 'nın astrositler tarafından mı yoksa mikroglia tarafından mı üretildiğini araştıran çalışmada kaynağın astrositler olduğu gösterilmiş ve inflamatuvar ağrı durumunda astrositlerin etkilerini IL-1 β üreterek gösterdiği, mikrogliaların ise etkilerini IL-1 β dışındaki sitokinler üzerinden gösterebileceği şeklinde açıklanmıştır (Weyerbacher ve ark., 2009). Yine, monoklonal antikor ile indüklenen artritte IL-1 β 'nın rolü gösterilmiştir (Kagari ve ark., 2002). KAİA modelinde artritte indüklenen ağrıda IL-1 β 'nın rolü ve anakinranın etkinliği tam olarak ortaya konduktan sonra astrositler ve/veya mikroglia ile IL-1 β 'nın ko-lokalizasyonun değerlendirilmesi modelin kullanılacağı ilerki çalışmalarımızın kaynağıdır.

Çalışmamızın ikinci amacı çeşitli persistan ağrı modellerinde önemli roller oynadığı gösterilen astrosit ve mikroglia aktivasyonlarının bu modelde değerlendirilmesidir. Kontrol ve artrit farelerde astrosit ve mikroglia aktivasyonunu sırasıyla GFAP ve Iba-1 intensitesini immünohistokimyasal olarak analiz ettik. Bulduğumuz sonuçlar KAİA indüksiyonunu takiben spinal kord dorsal boynuzunda astrosit aktivasyonu olduğunu göstermektedir. Astrositler KAİA modelinin geç fazında (29. gün) aktive olurken, aynı dönemde mikroglia aktivitesinde değişiklik gözlemlenmedi. Modelin inflamatuvar fazı olan erken dönemde (13. gün) ise hem astrosit hem de mikroglia aktivitesinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı. Hayvanlarda yapılan çeşitli nöropatik ve inflamatuvar ağrı modellerinde spinal kord dorsal boynuzunda mikroglia ve astrosit gibi nöronal olmayan hücrelerin aktivasyonu gösterilmiştir (Watkins ve ark., 2001). KAİ modelinde bizim çalışmamıza benzer şekilde mikroglia aktivasyonu olmaksızın astrosit aktivasyonu gösterilmiştir. Bu çalışmada aktive olan astrosit ve mikroglia sayısı değerlendirilmiştir. Aktive olan astrosit sayısı artrit indüksiyonundan sonraki 10. günden itibaren artmaya başlamış ve deneyin son gününe (28. gün) kadar devam etmiştir. Bu süreç içinde hiçbir günde mikroglia aktivasyonu saptanmamıştır. Bununla birlikte 14. günde (erken dönem) KAİ modelinde astrosit aktivasyonu bizim modelimizden farklı olarak bulunmuştur (Ingliss ve ark., 2007). K/BxN modeli ile yapılan çalışmada ise, bizim sonuçlarımızdan farklı

olarak; mikroglia aktivasyonunun hem inflamatuvar (6. gün) hem de post-inflamatuvar (28. gün) dönemde, astrosit aktivasyonunun ise sadece inflamatuvar dönemde arttığı gösterilmiştir (Christianson ve ark., 2010). Genel olarak mikroglial aktivasyonun geçici olduğu ve daha uzun süreli olan astrosit aktivasyonundan önce geliştiğini bununla birlikte her iki hücre tipinin aktivasyonun ağrıyı artırdığı belirtilmiştir (Tanga ve ark., 2004). Astrosit inhibitörlerinin kullanıldığı çalışmalardan elde edilen sonuçlar da astrositlerin ağrı sürecindeki rolüne işaret etmektedir. Astroglial toksin L- α -aminoadipate (L-AA)'ın uygulandığı nöropatik ağrı çalışmasında mekanik allodini geriye dönmüş ve spinal kord'daki GFAP-pozitif astrositler de azalmıştır (Wang ve ark., 2009). Astrosit ve mikroglia aktivasyonunun nöropatik ağrı modellerindeki rolü pek çok çalışma ile desteklenmiş olmasına karşın periferik inflamatuvar ağrıdaki rolleriyle ilgili daha az çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte, glia hücrelerinin kronik inflamasyondaki ağrı mekanizmalarına katılıp katılmadığı bilinmemektedir. Olasılıkla ve kanıtlanmamış olmakla birlikte, nöropatik ve inflamatuvar durumlarda glia yanıtlarının başlatılmasından farklı faktörler sorumludur. Nöropatik durumlarda, sensoryal nöronlarda eksprese edilen ve salınan transmitterlerde belirgin değişiklikler olduğu bilinmektedir ve olasılıkla bunların biri veya birkaçı glial hücrelerin artmış yanıtlarına neden olmaktadır. İnflamatuvar durumlarda ise bu transmitterler tipik olarak sensoryal nöronlarda up-regüle olmakta ve devam eden nöronal aktivitenin sonucunda ve temel olarak eksprese edilen faktörlerin salınımı ile hızlı, fakat daha zayıf glial yanıtların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (McMahon ve ark., 2005; McMahon ve Malcangio, 2009).

Çalışmamızda glia aktivasyonu sadece iki zamanda değerlendirildi. Bu nedenle de astrositlerin mikroglia aktivasyonu olmaksızın aktive olduklarını kesin olarak söylemek güçtür. Çünkü mikroglia aktivasyonunun daha erken bir dönemde (13. günden önce) görülmesi olasıdır. Bu sonuçlar, başka dönemlerde, özellikle de daha erken, mikroglia ve astrosit aktivasyonunun değerlendirildiği çalışmalar ile desteklenmelidir. Kuşkusuz, bu çalışmalar, KAİA modelindeki ağrı mekanizmasında spinal gliaların rolü hakkında daha fazla bilgi sahibi olmamıza olanak sağlayacaktır. Bununla birlikte, mikroglia aktivasyonu olmaksızın sadece astrosit aktivasyonunun

varlığı da bu modelin astrosit fonksiyonunu mikroglia etkisi olmaksızın çalışılmasına olanak sağlaması bakımından önemli olabilir.

Ağrı ve hareket kısıtlılığının kronik artrit ile ilişkili temel klinik problemler olduğu bilinmektedir (Inglis ve ark., 2005). Ancak, eklem ağrısına neyin neden olduğu hakkında hala sınırlı bilgiye sahibiz. İnflamasyon sırasında eklem sinirlerinin mekanik stimulusa karşı çeşitli faktörler yoluyla hassaslaştığı bilinmektedir. Artiküler indeks skoru ve ağrı intensitesinin oranları arasında güçlü bir korelasyon vardır. Bu da RA'deki ağrının inflamasyon ile indüklenen bir hipersensitivite durumu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Periferal ve santral sensitizasyon inflame eklemlerin hareketi sırasında oluşan ağrı ve eklemlerdeki spontan ağrıda önem kazanmaktadır. Eklemden uyarı alan spinal kord dorsal boynuz nöronlarının reseptif alanları sadece eklemler ile sınırlı değildir aynı zamanda derin ve kutanöz dokulardan da uyarı almaktadır. Bu durum inflame olmayan dokulara da ağrının yayılmasından sorumlu olabilir (Leffler ve ark., 2002). İnflamasyon sırasında periferal ve SSS'de meydana gelen major plastik değişiklikler ağrı eşiklerini düşürür, allodini ve hiperaljezi oluşmasına neden olur. Artritlik eklemlerde ağrı meydana gelmesine katkıda bulunan faktörlerden biri C-liflerinin bir grubu olan sessiz reseptörlerin aktivasyonudur (McDougall, 2006). Bununla birlikte, kronik eklem ağrısının mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bazı araştırmalar inflamasyon sırasında eklemlerin innervasyon paternlerinin değiştiğine işaret etmektedir. Ayrıca, kronik olarak inflame olan eklemlerde duysal liflerin veya sempatik innervasyonun kaybından bahsedilmektedir (Schaible, 2009).

KAİA modelinde inflamatur dönemde meydana gelen değişiklikler, inflamatur mediyatörlerin salgılanması, takiben meydana gelen periferal ve santral sensitizasyon artritlik farelerde taktıl ve soğuk allodini eşik değerlerinin azalma nedeni olabilir. Nitekim, temel etkisi PG sentez inhibisyonu olan diklofenak'ın modelin inflamatur fazında etkili olması bu görüşü desteklemektedir. Ancak, diklofenak modelin post-inflamatur döneminde etkili değildir. Sonuç olarak, her iki dönemdeki farklı farmakolojik etki profili modelin inflamatur ve post-inflamatur dönemlerinde farklı mekanizmaların devreye girdiği görüşünü doğrulamaktadır. Bununla birlikte, sorulması gereken soru, inflamasyon belirtileri geçtikten sonra KAİA modelinde persistan ağrıya neden olan mekanizmaların neler olduğudur. Eklemdaki tüm yapılar

normal kartilaj hariç nosiseptörler ile innerve edilmektedir (Schaible ve ark., 2009). Ancak, KAİA indüksiyonu için kullanılan CII antikorları artiküler kartilaja bağlanmaktadır (Nandakumar ve Holmdahl, 2005). Bu da KAİA modelindeki antikor aracılı inflamatuvar yanıtın nosiseptörleri direkt olarak etkilemediğini göstermektedir. Periferel sinirlerin yakınındaki immün aktivasyon periferel sinirlerin eksitabilitesinin ve/veya hasarının artışı için yeterlidir (Watkins ve Maier, 2002). Periferel sinir hasarı anormal elektriksel aktiviteye ve duysal nöronlarda gen ekspresyonu değişikliğine neden olur ki, bu da sonuç olarak glia aktivasyonunu başlatabilir (Milligan and Watkins, 2009). Çalışmamızda immünohistokimyasal analizlerden elde edilen sonuçlar artrit indüksiyonundan 29 gün sonra astrosit aktivasyonu olduğunu göstermektedir. Pentoksifilin ve benzeri astrosit inhibitörlerinin yine bu zamanda kullanılacağı davranış çalışmaları astrosit aktivasyonunun persistan ağrı ile ilişkili olup olmadığını ortaya koyabilir.

Periferel sinir hasarının küçük bir komponentinin kronik inflamasyona neden olduğu KAİ modelinde gösterilmiştir (Inglis ve ark., 2007). Yine K/BxN modeli ile yapılan çalışmada post-inflamatuvar dönemde (28. gün) DRG'de ATF-3 (sinir hasarı markırı) pozitif hücreler artış göstermişlerdir (Christianson ve ark., 2010). KAİA modelindeki geçici inflamatuvar yanıtın, persistan ağrı oluşumunda potansiyel bir mekanizma olan periferel sinir hasarına neden olup olmadığını gösterilmesi, bu modelde persistan ağrıya neden olan etkenin ortaya konmasında bir bakış açısı sunabilir. Ayrıca, GBP'nin modelin her iki döneminde etkili olması, inflamatuvar belirtiler geçtikten sonra allodinin devam etmesi, NSAİİ'nin post-inflamatuvar dönemde etkili olmaması, spinal kord'da artmış $\alpha 2\delta 1$ seviyeleri inflamatuvar bir ağrıdan, nöropatik bir ağrıya geçişin olup olmadığı sorularını da beraberinde getirmektedir. Genel olarak, inflamatuvar ağrı periferel sinir hasarından (nöropatik ağrı) kaynaklanan ağrıdan ayrılmaktadır. Bununla birlikte, periferel sinirlerdeki lokal inflamasyonun nöropatik ağrının gelişiminde önemli bir etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir (Schaible ve ark., 2006). Bir başlangıç niteliğindeki çalışmamızda, bu ve benzeri soruların cevaplanması ve persistan ağrı mekanizmalarının ortaya konması için ileri çalışmalar gerekmektedir.

Sonuç olarak, KAİA modeli artrit-indüklenen ağrı mekanizmalarının araştırılması için yeni bir araç sunarken ve RA benzeri koşullarda ağrıyı azaltmak için yeni tedavi seçeneklerinin araştırılmasına da yardımcı olabilir.

VI. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. KAİA grubunda, antikor kokteylinin enjeksiyonunun ardından belirmeye başlayan pençe ve el-ayak bileklerinde görülen şişlik, kızarıklık gibi klinik değişiklikler özellikle 5. günde LPS enjeksiyonunu takiben istatistiki olarak anlamlı hale geldi.
2. Kontrol ve LPS grubunda klinik değişiklik görülmedi.
3. Antikor kokteylinin enjeksiyonunun ardından artritik fareler taktil allodini eşik değerlerinde deneyin 2. gününden başlayarak anlamlı derecede azalma gösterdiler ve bu azalma deneyin son gününe kadar devam etti. Hemen başlangıçta görülen azalmış taktil allodini eşik değerleri klinik belirtiler ile korelasyon gösterdi, ancak inflamasyon belirtilerinin kaybolmasından sonra da devam etti.
4. Soğuk allodini yanıtları hayvanların klinik skorları ile korelasyon gösterdi. Klinik skorun arttığı ve maksimum düzeye ulaştığı dönemde (8-12. günler) KAİA hayvanlarındaki pençe yalama ve/veya sallama süreleri ile tanımlanan soğuk allodini eşik değerleri kontrol hayvanlarıyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede arttı. Soğuk allodini yanıtları taktil allodini yanıtlarından farklı olarak daha sonra bazal aktivite değerlerine geri döndü.
5. Kontrol ve LPS grubundaki hayvanların taktil ve soğuk allodini yanıtlarında deney süresince anlamlı değişiklik görülmedi.
6. KAİA modelinin inflamatuvar döneminde (8-12.günler) diklofenak (30mg/kg, i.p.), buprenorfin (0,1 mg/kg, i.p.) ve gabapentin (100 mg/kg, i.p.) azalmış taktil allodini eşik değerlerini anlamlı olarak artırdı. Ancak anakinra (300mg/kg, i.p.) bu dönemde etkili bulunmadı.
7. Modelin post-inflamatuvar döneminde (26-31.günler) sadece buprenorfin ve gabapentin azalmış taktil allodini eşik değerlerini anlamlı olarak artırdı.
8. KAİA indüksiyonunu takiben spinal kord dorsal boynuzunda astrosit aktivasyonu görüldü. Astrositler KAİA modelinin geç fazında (29. gün) aktive olurken, aynı dönemde mikroglia aktivitesinde değişiklik gözlemlenmedi. Modelin inflamatuvar fazı olan erken dönemde (13. gün) ise hem astrosit hem de

mikroglia aktivitesinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı.

- 9.** Spinal kord dorsal boynuzunda deneyin son günü (30. gün) sakrifiye edilen hayvanlarda KAİA grubunda alpha2-delta1 aktivitesinde artış görüldü.
- 10.** KAİA modelinde güçlü ve persistan bir ağrı yanıtı meydana geldi.
- 11.** Modelin inflamatuvar ve post-inflamatuvar dönemlerindeki farmakolojik tedavi yanıtları farklılık gösterdi.
- 12.** Sonuç olarak, KAİA modeli, ağrı ve romatoloji çalışmaları arasında köprü kuracak ve yeni tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlayacak yeni bir inflamatuvar ağrı modelidir.

VII. KAYNAKLAR

- Aldemir T. Akut ağrı fizyopatolojisi. Erdine S. Editör, Ağrı'da, 1. Baskı, İstanbul, Nobel Kitapevi, 2000;111-119.
- Allen NJ, Barres BA. Glia-more than just brain glue. *Neuroscience*. 2009;457:675-677.
- Apkarian AV, Baliki MN, Geha PY. Towards a theory of chronic pain. *Prog Neurobiol*. 2009;87(2):81-97.
- Aydın ON. Ağrı ve ağrı mekanizmalarına güncel bakış. *ADÜ Tıp Fak Derg*. 2002;2:37-48.
- Aydınlı I. Ağrının fizyopatolojisi. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg*. 2005;51(2):B8-B13.
- Backman CL. Arthritis and pain. Physiological aspects in the management of arthritis pain. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:221.
- Baamonde A, Curto-Reyes V, Juárez L, Meana A, Hidalgo A, Menéndez L. Antihyperalgesic effects induced by the IL-1 receptor antagonist anakinra and increased IL-1beta levels in inflamed and osteosarcoma-bearing mice. *Life Sci*. 2007;81(8):673-82.
- Bockbrader HN, Wesche D, Miller R, Chapel S, Janiczek N, Burger P. A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pregabalin and gabapentin. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49(10):661-9.
- Boroujerdi A, Kim HK, Lyu YS, Kim DS, Figueroa KW, Chung JM, Luo ZD. Injury discharges regulate calcium channel alpha-2-delta-1 subunit upregulation in the dorsal horn that contributes to initiation of neuropathic pain. *Pain*. 2008;139(2):358-366.
- Buch M, Emery P. The etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Hospital Pharmacist*. 2002;9:5-10.
- Burkhardt H, Sehnert B, Bockermann R, Engström A, Kalden JR, Holmdahl R. Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2005;35(5):1643-52.
- Cahill CM, Dray A, Coderre TJ. Priming enhances endotoxin-induced thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in rats. *Brain Res*. 1998;808(1):13-22.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994;53(1):55-63.

- Christianson CA, Corr M, Firestein GS, Mobargha A, Yaksh TL, Svensson CI. Characterization of the acute and persistent pain state present in K/BxN serum transfer arthritis. *Pain*. 2010;151(2):394-403.
- Christoph T, Kögel B, Schiene K, Méen M, De Vry J, Friderichs E. Broad analgesic profile of buprenorphine in rodent models of acute and chronic pain. *Eur J Pharmacol*. 2005;507(1-3):87-98.
- Curros-Criado MM, Herrero JF. The antinociceptive effect of systemic gabapentin is related to the type of sensitization-induced hyperalgesia. *J Neuroinflammation*. 2007;5:4-15.
- DeLeo, JA. Basic science of pain. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88(2):58-62.
- Dickson DJ. Opioids for non-operable osteoarthritis and soft-tissue rheumatism. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(5):193-194.
- Durmaz B. Ağrı mekanizmaları. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg*. 1998;44:14-20.
- Eilers H, Schumacher MA. Mechanosensitivity of primary afferent nociceptors in the pain pathway. In: Kamkin A, Kiseleva I, editors. *Mechanosensitivity in cells and tissues*. Moscow, Academia. 2005.
- Edwards RR, Wasan AD, Bingham CO 3rd, Bathon J, Haythornthwaite JA, Smith MT, Page GG. Enhanced reactivity to pain in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):R61.
- Erdine S. Ağrı; Sendromları ve Tedavileri. İstanbul, Nobel Kitapevi. 1987;1-18.
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain*. 2004;112(12):83-93.
- Gan TJ. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Curr Med Res Opin*. 2010;26(7):1715-31.
- Gauriau C, Bernard JF. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol*. 2002;87:251-258.
- Gerecz-Simon EM, Tunks ER, Heale JA, Kean WF, Buchanan WW. Measurement of pain threshold in patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, ankylosing spondylitis, and healthy controls. *Clin Rheumatol*. 1989;8(4):467-74.
- Guo LH, Schluesener HJ. Acute but not chronic stimulation of glial cells in rat spinal cord by systemic injection of lipopolysaccharide is associated with hyperalgesia. *Acta Neuropathol*. 2006;112(6):703-13.

- Hamuryudan V. Romatoid artrit. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi. 2007;55:69-86.
- Heiberg T, Finset A, Uhlig T, Kvien TK. Seven year changes in health status and priorities for improvement of health in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:191-195.
- Heit HA, Gourlay D. Buprenorphine: New tricks with an old molecule for pain management. *Clin J Pain*. 2008;24:93-97.
- Holmdahl R. The use of animal models. *Methods Mol Med*. 2007;136:185-9.
- Inglis JJ, Nissim A, Lees DM, Hunt SP, Chernajovsky Y, Kidd BL. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):R807-16.
- Inglis JJ, Notley CA, Essex D, Wilson AW, Feldmann PA, Williams R. Collagen-induced arthritis as a model of hyperalgesia functional and cellular analysis of the analgesic actions of tumour necrosis factor blockade. *Arthritis Rheum*. 2007;56:4015-4023.
- Jenkins JK, Hardy KJ, McMurray RW. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: A guide to therapy. *Am J Med Sci*. 2002;323(4):171-180.
- Jahanshahi M, Pitt P, Williams I. Pain avoidance in rheumatoid arthritis. *J Psychosom Res*. 1989;33(5):579-89.
- Kagari T, Doi H, Shimozato T. The importance of IL- β and TNF- α , and the non-involvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J Immunol*. 2002;169(3):1459-1466.
- Kannan K, Ortmann R, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology*. 2005;12(3):167-181.
- Katsura H, Obata K, Mizushima T, Sakurai J, Kobayashi K, Yamanaka H. Activation of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in primary afferent neurons contributes to heat and cold hyperalgesia after inflammation. *J Neurochem*. 2007;102(5):1614-24.
- Kehl LJ, Kovács KJ, Larson AA. Tolerance develops to the effect of lipopolysaccharides on movement-evoked hyperalgesia when administered chronically by a systemic but not an intrathecal route. *Pain*. 2004;111(1-2):104-15.
- Kim HJ, Krenn V, Steinhauser G, Berek C. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Immunol*. 1999;162:3053-3062.

- Khachigian LM. Collagen antibody-induced arthritis. *Nature*. 2006;1(5):2512-16.
- Kozanhan B. Nöropatik ağrılı lumbal disk hastalarında preemtif pregabalinin anestezik madde tüketimine katkısı ve postoperatif analjeziye etkisi. Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, Uzmanlık Tezi, 2008;16.
- Leffler AS, Kosek E, Lerndal T, Nordmark B, Hansson P. Somatosensory perception and function of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in patients suffering from rheumatoid arthritis. *Eur J Pain*. 2002;6(2):161–176.
- Li CY, Zhang ZL, Mathews EA, Li KW, Kurwa A, Boroujerdi A, Gross J. Calcium channel $\alpha_2\delta_1$ subunit mediates spinal hyperexcitability in pain modulation. *Pain*. 2006;125(1-2):20-34.
- Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, Sorkin LS, Stauderman KA, Williams KE, Yaksh TL. Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2 (delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nevre-injured rats. *J. Neurosci*. 2001; 21:1868-1875.
- McMahon SB, Cafferty WBJ, Marchand F. Immune and glia cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol*. 2005;192(2):444-462.
- McMahon SB, Malcangio M. Current Challenges in Glia-Pain Biology. *Neuron*. 2009;64(1):46-54.
- Melli M, Kayaalp SO. Non-Steroidal Anti-İnflamatuar İlaçlar Kayaalp SO Editör. *Tıbbi Farmakoloji*'de, 10. Baskı, Ankara; Hacettepe-Taş. 2002; 960-994.
- Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 1999;57(1):1-164.
- Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. 2002;66(6):355-474.
- Miller RH, Raff MC. Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci*. 1983;4:585-592.
- Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nature*. 2009;10(1):23-35.
- Molander C, Xu Q, Grant G. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J Comp neurol*. 1984;230:133-141.
- Morgan GE, Mickhail MS. *Clinical Anesthesiology*. 3rd Ed., Los Angeles; Appleton&Lange. 2002;309-358.

- Nagakura Y, Okada M, Kohara A, Kiso T, Toya T, Iwai A. Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: Time course of progression and efficacy of analgesics. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306(2):490-497.
- Nandakumar KS, Andrén P, Martinsson P, Bajtner E, Hellstöm S, Holmdahl R, Kleinau S. Induction of arthritis by single monoclonal IgG anti-collagen type II antibodies and enhancement of arthritis in mice lacking inhibitory Fc γ RIIB. *Eur J Immunol.* 2003;33(8):2269-2277.
- Nandakumar KS, Svensson L, Holmdahl R. Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice. Description of the disease and the influence of age, sex and genes. *Am J Pathol.* 2003;163(5):1827-1837.
- Nandakumar KS, Bäcklund J, Vestberg M, Holmdahl R. Collagen type II (CII)-specific antibodies induce arthritis in the absence of T or B cells but the arthritis progression is enhanced by CII-reactive T cells. *Arthritis Res Ther.* 2004; 6(6):R544-50.
- Nandakumar KS, Holmdahl R. Efficient promotion of collagen antibody induced arthritis (CAIA) using four monoclonal antibodies specific for the major epitopes recognized in both collagen induced arthritis and rheumatoid arthritis. *J Immunol Meth.* 2005;304(1-2):126-136.
- Nandakumar KS, Holmdahl R. Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(6):223.
- Nandakumar KS, Holmdahl R. Collagen antibody induced arthritis. *Methods Mol Med.* 2007;136:215-23.
- Nandakumar KS, Bajtner E, Hill L, Böhm B, Rowley MJ, Burkhardt H, Holmdahl R. Arthritogenic antibodies specific for a major type II collagen triple-helical epitope bind and destabilize cartilage independent of inflammation. *Arthritis Rheum.* 2008;58(1):184-196.
- Oğuz H. Kronik ağrı tedavisi. Oğuz H Editör, Tıbbi Rehabilitasyon'da, 1. Baskı, İstanbul; Nobel Kitapevi. 1995;685-696.
- Özsoy MH, Altinel L, Başarır K, Çavuşoğlu AT, Dinçel VE. Romatoid artrit eklemler hastalığının patogenezi. *TOTBİD.* 2006;5(3-4),101-110.
- Peter-Szabo M, Kekesi G, Nagy E, Sziver E, Benedek G, Horvath G. Quantitative characterization of a repeated acute joint inflammation model in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34(5-6),520-6.
- Przewłocki R, Przewłocka B. Opioids in chronic pain. *Eur J Pharmacol.* 2001;429(1-3),79-91.

- Prescrire Int. Anakinra: new preparation. Weakly effective in rheumatoid arthritis. 2004;13(70):43-5.
- Pulichino AM, Rowland S, Wu T, Clark P, Xu D, Mathieu MC. Prostacyclin antagonism reduces pain and inflammation in rodent models of hyperalgesia and chronic arthritis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(3):1043-1050.
- Romero-Sandoval EA, Horvath RJ, DeLeo JA. Neuroimmune interactions and pain: focus on glia-modulating targets. *Curr Opin Investig Drugs.* 2008;9(7):726-734.
- Rowley MJ, Nandakumar KS, Holmdahl R. The role of collagen antibodies in mediating arthritis. *Mod Rheumatol.* 2008;18(5):429-441.
- Sandkühler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev.* 2009;89(2):707-758.
- Santiago JM, Rosas O, Torrado AI, Gonzalez MM, Kalyan-Masih PO, Miranda JD. Molecular, anatomical, physiological, and behavioral studies of rats treated with buprenorphine after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2009;26(10):1783-1793.
- Satyanarayana PS, Jain NK, Singh S, Kulkarni SK. Effect of selective inhibition of cyclooxygenase-2 on lipopolysaccharide-induced hyperalgesia. *Inflammopharmacology.* 2004;12(1):57-68.
- Schaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;966:343-54.
- Schaible HG, Richter F. Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg.* 2004;389(4):237-243.
- Schaible HG, Schmelz M, Tegeder I. Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(2):323-42.
- Schaible HG, Richter F, Ebersberger A, Boettger MK, Vanegas H, Natura G, Vazquez E, von Banchet GS. Joint pain. *Exp Brain Res.* 2009;196(1):153-162.
- Seo YJ, Kwon MS, Choi HW, Choi SM, Nam JS, Lee JK. The differential effects of acetaminophen on lipopolysaccharide induced hyperalgesia in various mouse pain models. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008;91(1):121-7.
- Sills GJ. Not another gapapentin mechanism. *Epilepsy Curr.* 2005;5(2):75-77.
- Small RE. Diclofenac sodium. *Clin Pharm.* 1989;8(8):545-58.

- Smith SB, Crager SE, Mogil JS. Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: responses in 10 inbred mouse strains. *Life Sci.* 2004;74(21):2593-604.
- Sturrock RD. Update on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *International Congress Series.* 2006;1295:1-8.
- Sweeney SE, Firestein GS. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Bio.* 2004;36:372-278.
- Şentürk T. Biyolojik tedaviler-3N1K: ne, nasıl, ne zaman, kime? 11. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, Antalya, 2009.
- Tanga FY, Raghavendra V, DeLeo JA. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem Int.* 2004;45(2-3):397-407.
- Weyand CM, Goronzy JJ. Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003;987:140-149.
- Weyerbacher AR, Xu Q, Tamasdan C, Shin SJ, Inturrisi CE. N-Methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) independent maintenance of inflammatory pain. *Pain.* 2010;148(2):237-246.
- Wilson AW, Medhurst SJ, Dixon CI, Bontof NC, Winyard LA, Brackenborough KT. An animal model of chronic inflammatory pain: pharmacological and temporal differentiation from acute models. *Eur J Pain.* 2006;10(6):537-549.
- Yamamoto T, Shono K, Tanabe S. Buprenorphine activates mu and opioid receptor like-1 receptors simultaneously, but the analgesic effect is mainly mediated by mu receptor activation in the rat formalin test. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318(1):206-13.
- Zhanga RX, Lia A, Liua B, Wang L, Renb K, Zhanga H. IL-1ra alleviates inflammatory hyperalgesia through preventing phosphorylation of NMDA receptor NR-1 subunit in rats *Pain.* 2008;135(3):232–239.
- <http://www.kineretrx.com/>, 2011
- <http://www.pacificu.edu/>, 2011.

VIII. ÖZGEÇMİŞ

AD SOYAD: Duygu Belkıs Baş
YER ve DOĞUM TARİHİ: Sinop; Ağustos 30, 1980
YABANCI DİL: İngilizce

EĞİTİM:

2009-2010: Karolinska Enstitüsü Fizyoloji ve Farmakoloji AbD. Camilla I. Svensson-Molecular Pain Group, Visitor PhD Student

2007- : OMU, Tıp Fakültesi, Farmakoloji AbD., PhD Eğitimi

2004-2007: OMU, Tıp Fakültesi, Farmakoloji AbD., Yüksek Lisans Eğitimi

2000-2004: İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

YAYINLAR:

1. Yardan T, Meric M, Bozkurt A, Bilge S, **Bas DB**, Bedir A, Ozdemir T, Baydin A. The role of heart-type fatty acid-binding protein in the evaluation of carbon monoxide poisoning in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2011;30(2):124-8.
2. Ozyurek H, Bozkurt A, Bilge S, Ciftcioglu E, İlkaya F, **Bas DB**. Effect of prenatal levetiracetam exposure on motor and cognitive functions of rat offspring. *Brain Dev*. 2010;32(5):396-403.
3. Bakuridze K, Savli E, Gongadze N, **Bas DB**, Gepdiremen A. Protection in glutamate-induced neurotoxicity by imidazoline receptor agonist moxonidine. *Int J Neurosci*. 2009;119(10):1705-17.
4. Bilge S, Bozkurt A, **Bas DB**, Aksoz E, Savli E, İlkaya F and Kesim Y. Chronic treatment with fluoxetine and sertraline prevents forced swimming test-induced hypercontractility of rat detrusor muscle. *Pharmacol Rep*. 2008;60(6):872–879.
5. Aksöz E, Bilge S, İlkaya F, **Bas DB**, Çelik S, Kesim Y The effects of SSRI's plus sildenafil combination on vas deferens contraction *J. Exp. Clin. Med.*, 2009; 26:x-xx