



T.C.
GAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK
LİSANS
TEZİ

İZOKSAZOL TÜREVİ BİLEŞİĞİN *in-vivo* ANALJEZİK VE
ANTIENFLAMATUVAR AKTİVİTESİ ÜZERİNDE
ÇALIŞMALAR

Özgür ÖRNEK

FARMAKOLOJİ (ECZ.) ANABİLİM DALI

ARALIK 2019



**İZOKSAZOL TÜREVİ BİLEŞİĞİN *in-vivo* ANALJEZİK VE
ANTIİNFLAMATUVAR AKTİVİTESİ ÜZERİNDE
ÇALIŞMALAR**

Özgür ÖRNEK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMAKOLOJİ (ECZ.) ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2019

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı ,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

Bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı beyan ederim.

Özgür ÖRNEK

İZOKSAZOL TÜREVİ BİLEŞİĞİN *in-vivo* ANALJEZİK VE ANTIİNFLAMATUVAR AKTİVİTESİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

(Yüksek Lisans Tezi)

Özgür ÖRNEK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2019

ÖZET

Non-Steroid Antiinflatuvar İlaçlar (NSAİİ) ağrı ve inflamasyonun olduğu hastalıkların tedavisinde akut veya kronik olarak çok sık kullanılan bir ilaç grubunu oluşturmaktadırlar. NSAİİ'lerin yaygın kullanımı özellikle kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisinde yan etkilerinin yaygınlaşarak artmasına yol açmıştır. Bu sebeple yan etkisi daha az ve etkili olabilecek güçlü etkili yeni moleküllerin tedaviye girişi önem arz etmektedir. Bu çalışmada Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerimiz tarafından sentezlenen izoksazol türevi iki yeni molekülün (BRP-187 ve BRP-292 olarak kodlanmışlardır) antiinflatuvar/analjezik aktivitesi ölçülmüş ve midede akut ülserojenik etkisine bakılmıştır. Bu çalışmada kullanılan BALB/c erkek fareler, BRP-187 ve BRP-292'nin 3 farklı dozu (10, 30 ve 100 mg/kg), referans İbuprofen, çözücü dimetil sülfoksit (DMSO) ve SF (% 0.9 Serum fizyolojik) n=6 olacak şekilde gruplara ayrılmıştır. Antiinflatuvar aktivite tayini karragenan ile oluşturulan pençe ödemi testi ile analjezik aktivite tayini ise p-benzokinon ile oluşturulan kıvrınma testi ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca BRP-187 ve BRP-292'nin analjezik aktivitesinin test edildiği fareler madde uygulanmasından 4 saat sonra eter anestezisi altında ötenazi yapılarak mideleri mikroskop altında incelenmiş ve İbuprofen'e kıyasla mide hasarları tespit edilmiştir. Antiinflatuvar etkinlik belirlemede 0, 90, 180, 270, 315 ve 360. dakikalarda kayıt alınarak karagenin (24 µl/pençe) ile meydana gelen pençe ödemi testi, analjezik etkinlik belirlenmesi amacıyla p-Benzokinon (2.5 mg/kg, i.p.) ile yapılan abdominal kıvrınma testi kullanılmıştır. Madde enjeksiyonundan 4 saat sonra ötenazi yapılan farelerin mideleri mikroskopla gözlenmiş ve midede oluşan peteşi sayıları tespit edilmiştir. Pençe ödemi testinin 270. dakikasında maksimum aktivite gözlenmiştir. BRP-187 ve BRP-292'nin en güçlü olduğu antiinflatuvar dozunun 100 mg/kg olduğu tespit edilmiştir. 270. dakikada yüzde inhibisyon BRP-187 için %39.47, BRP-292 için %52.89, İBU için %71.05 ve antinosiseptif etki; BRP-187 için %44.4, BRP-292 için: %70.4 ve İBU için ise %77.8 bulunmuştur. Ülserojenik etki ise BRP-187 ve BRP-292 için 0, İBU için +2 şeklinde bulunmuştur. BRP-187 ve BRP-292'nin antiinflatuvar ve analjezik etkisinin İBU'ya kıyasla daha az olduğu gözlenmiş ancak gastrointestinal yan etkilerinin olmaması nedeniyle özellikle BRP-292'nin ilaç molekülü olabileceği düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 1018.1
Anahtar Kelimeler : Analjezik, Antiinflatuvar, İzoksazol, BRP-187, BRP-292, NSAİİ
Sayfa Adedi : 62
Danışman : Prof. Dr. Mecit Orhan ULUDAĞ

STUDIES ON *in-vivo* ANALGESIC AND ANTIINFLAMMATORY ACTIVITIES OF
IZOKSAZOLE DERIVATIVE COMPOUND

(M. Sc. Thesis)

Özgür ÖRNEK

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

December 2019

ABSTRACT

Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs (NSAIDs) are a group of drugs that are used frequently in acute or chronic treatment of pain and inflammation. The widespread use of NSAIDs has led to an increase in side effects, especially in the treatment of chronic inflammatory diseases. For this reason, it is important to introduce new molecules with powerful effects that may have less side effects is important. In this study, antiinflammatory / analgesic activity of two new isoxazole derivatives (coded BRP-187 and BRP-292) synthesized by our faculty members of Pharmaceutical Chemistry Department were measured and acute ulcerogenic effect in stomach was examined. The BALB/c male mice used in this study divided into groups (n=6) which are 0.9% Serum physiological, solvent dimethyl sulfoxide (DMSO), 3 different doses of BRP-187 and BRP-292 (10, 30 and 100mg / kg) and reference Ibuprofen. Antiinflammatory activity was determined by paw edema test with carrageenan and analgesic activity was determined by p-benzoquinone writhing test. In addition, the mice with the analgesic activity of BRP 187 and BRP 292 were tested for euthanasia under ether anesthesia 4 hours after substance administration and their stomachs were examined under a microscope and gastric damage was determined compared to ibuprofen. Paw edema test with carrageenin (24µl / paw) was recorded at 0, 90, 180, 270, 315 and 360 minutes for antiinflammatory efficacy and p-Benzokinone (2.5mg/kg, ip) for analgesic efficacy. Abdominal constriction test was used. The stomachs of the mice that were euthanized 4 hours after substance injection were observed under microscope and the number of petechiae in the stomach was determined. Maximum activity was observed at 270 minutes of paw edema test. BRP-187 and BRP-292 were found to be the strongest anti-inflammatory doses of 100 mg / kg. Percent inhibition at 270 min 39.47% for BRP-187, 52.89% for BRP-292, 71.05% for IBU and antinociceptive effect; It was found that 44.4% for BRP-187, 70.4% for BRP-292 and 77.8% for IBU. Ulcerogenic effect was found as 0 for BRP-187 and BRP-292 and +2 for IBU. The anti-inflammatory and analgesic effects of BRP-187 and BRP-292 have been observed to be less than that of IBU, but it is thought that BRP-292 may be a drug molecule in particular due to the absence of gastrointestinal side effects.

Science Code : 1018.1
Key Words : Analgesic, Antiinflammatory, İzoksazole, BRP-187, BRP-292 NSAID
Page Number : 62
Advisor : Prof. Dr. Mecit Orhan ULUDAĞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübesi ve bilgisiyle tezi yazmamda her zaman destekçim olan, tez yazım sürecinde de ilgisini eksik etmeyen çok kıymetli hocam, danışmanım Prof. Dr. M. Orhan ULUDAĞ başta olmak üzere,

Tez çalışmama konu olan ilaç adayı molekülleri sentezleyen Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nın saygıdeğer öğretim üyeleri Prof. Dr. Erden BANOĞLU ve Doç. Dr. Burcu ÇALIŞKAN'a ve çalışma ekibine (Banoğlu Research Group),

Yüksek lisans eğitimimde bilgi ve tecrübeleriyle sağladıkları değerli katkılarından dolayı hocalarım Prof. Dr. Nurettin ABACIOĞLU'na, Prof. Dr. Fatma AKAR'a,

Yüksek lisans deneysel çalışmalarımı yürütürken bilgisini, desteğini esirgemeyen Dr. Ecz. Sevtap HAN'a,

Zor zamanlarımda desteklerini esirgemeyip daima yanımda olan sevgili aileme ve TİTCK'daki arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ağrının Sınıflandırılması.....	3
2.2. Ağrının Algılamasının Temel Mekanizmaları	6
2.2.1. Santral mekanizmalar	6
2.2.2. Periferik mekanizmalar	11
2.3. Deney Hayvanlarında Ağrı Oluşturma Yöntemleri.....	14
2.3.1. Termal uyarıcıyla oluşturulan ağrı metodları.....	15
2.3.2. Kimyasal etkenle yapılan ağrı metodları.....	17
2.4. İnflamasyon.....	18
2.4.1. İnflamasyonun sınıflandırılması.....	19
2.4.2. İnflamasyonun mediatörleri	20
2.5. Ağrının Tedavisi.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Deney Hayvanları.....	27
3.2. Kimyasal Maddeler	27

3.2.1. İsoksazol türevi bileşikler.....	27
3.2.2. Diğer kimyasal maddeler	28
3.3. Araç ve Gereçler.....	28
3.4. Deney Grupları ve Deney Protokolleri.....	30
3.4.1. Deney grupları.....	30
3.4.2. Antiinflamatuvar aktivite ölçüm protokolü.....	32
3.4.3. Analjezik aktivite ölçüm protokolü.....	32
3.4.4. Mortalite ve ülserojenik etkinlik ölçümü	33
3.5. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Deney Gruplarında Ortaya Çıkan Antiinflamatuvar Etkiler	35
4.1.1. BRP-187'nin pençe ödemi üzerine etkisinin zamanla değişimi.....	35
4.1.2. BRP-292'nin pençe ödemi üzerine etkisinin zamanla değişimi.....	36
4.1.3. Test ve referans maddelerinin pençe ödemi üzerine antiinflamatuvar % inhibisyon değerleri.....	37
4.1.4. Test ve referans maddelerinin CG uygulamasından 270 dakika sonra ortaya çıkan antiinflamatuvar etkileri	39
4.2. Deneyde Kullanılan Maddelerin Farelerde Kıvrınma Sayıları Üzerine Etkisi	40
4.2.1. SF, DMSO ve İBU gruplarında elde edilen kıvrınma sayıları	40
4.2.2. BRP-187'nin antinosiseptif etkinliği.....	41
4.2.3. BRP-292'nin antinosiseptif etkinliği.....	41
4.3. Deneyde Kullanılan Maddelerin Fareler Üzerine Akut Toksisitesinin Değerlendirmesi	43
4.4. Deneyde Kullanılan Maddelerin Ülserojenik Aktivite Değerlendirmesi	43
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ	49
KAYNAKLAR	51

	Sayfa
EKLER.....	59
EK-1 Etik Kurul İzin Belgesi	60
ÖZGEÇMİŞ	62



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. BRP-187 için antiinflamatuvar etkinlik (% inhibisyon)	38
Çizelge 4.2. BRP-292 için antiinflamatuvar etkinlik (% inhibisyon)	38
Çizelge 4.3. Farelerde p-BK ile oluşturulan abdominal konstrüksiyon aljezi yöntemi ile kontrol, test maddeleri ve referans madde gruplarında elde edilen kıvranma sayıları (Ortalama±SH, n=6) ve antinositif aktivite (% inhibisyon).....	43



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Ağrının periferik iletimi.....	14
Şekil 2.2. AA metabolizasyonu	24
Şekil 3.1. BRP-187 ve BRP-292 şeklinde isimlendirilen bileşiklerin sentez yolları..	28
Şekil 4.1. Farede CG (Tip IV λ , 24 μ l/pençe, %2 a/h) ile oluşturulan pençe ödeminin BRP-187 ve İBU etkisine bağlı zamansal değişimi. Sonuçlar pençe kalınlıkları arasındaki farkların ortalamaları ve ortalamaların standart hatası şeklinde verilmiştir (Ortalama \pm SH, n=6). İBU (100 mg/kg), BRP-187 (10, 30 ve 100 mg/kg) ve aynı volümde saf DMSO (0,15 ml/30g) s.c. olarak CG'den 30 dakika önce verilmiştir.....	36
Şekil 4.2. Farede CG (Tip IV λ , 24 μ l/pençe, %2 a/h) ile oluşturulan pençe ödeminin BRP-292 ve İBU etkisine bağlı zamansal değişimi. Sonuçlar pençe kalınlıkları arasındaki farkların ortalamaları ve ortalamaların standart hatası şeklinde verilmiştir (Ortalama \pm SH, n=6). İBU (100 mg/kg), BRP-292 (10, 30 ve 100 mg/kg) ve aynı volümde saf DMSO (0,15 ml/30g) s.c. olarak CG'den 30 dakika önce verilmiştir.....	37
Şekil 4.3. CG uygulamasından sonra 270. dakikada elde edilen pençe ödem kalınlıkları. Farelerde CG ile oluşturulan pençe ödemi testinde elde edilen pençe ödem kalınlıkları (Ortalama \pm SH, n=6). *Kontrol (DMSO) grubu ile farklı (İBU için $p<0,0001$; BRP-187 için $p<0,05$), #İBU'dan farklı ($p<0,05$).	39
Şekil 4.4. CG uygulamasından sonra 270. dakikada elde edilen pençe ödem kalınlıkları. Farelerde CG ile oluşturulan pençe ödemi testinde elde edilen pençe ödem kalınlıkları (Ortalama \pm SH, n=6). *Kontrol (DMSO) grubu ile farklı ($p<0,05$).....	40
Şekil 4.5. Farelerde p-BK ile oluşturulan abdominal konstrüksiyon aljezi yönteminde elde edilen kıvrınma sayıları (Ortalama \pm SH, n=6), *Kontrol (SF) grubu ile farklı, #Kontrol (DMSO) ile farklı ($p<0,05$).	42

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Hot plate metodu için düzenek	16
Resim 2.2. Kuyruk çekme metodu için düzenek.	17
Resim 2.3. Abdominal konstrüksiyon (Writhing: Kıvranma/ Karın germe) testinde farede ortaya çıkan karın gerilme hareketi.	18



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
%	Yüzde
°C	Celsius
µl	Mikro litre
a/h	Ağırlık/hacim
Ca ⁺⁺	Kalsiyum
g	Gram
i.p.	İntraperitonal
kg	Kilogram
m	Metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
Na ⁺	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
s.c.	Subkütan
sn	Saniye
α	Alfa
δ	Delta
γ	Gama
κ	Kappa
µ	Mü
AA	Araidonik asit
AMPA	α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonikasit
CG	Karragenan

Kısaltmalar**Açıklamalar**

CGRP	Kalsitonin geni ilişkili peptid
COX	Siklooksijenaz
CSF	Koloni stimüle edici faktör
CPPN	Merkezi ağrıyı ileten nöronlar
DMSO	Dimetil sülfoksit
FLAP	5-Lipooksijenaz aktive edici protein
GABA	Gamma aminobütirik asit
HETE	Hidroeikosotetraenoik asit
HPETE	Hidroperoksieikosotetraenoik asit
IASP	Uluslararası ağrı çalışma birliği
İBU	İbuprofen
IgE	İmmunoglobulin E
İL	İnterlökin
İNİ	İnterferon
LTA₄	Lökotrien A ₄
LTB₄	Lökotrien B ₄
LTC₄	Lökotrien C ₄
LTD₄	Lökotrien D ₄
LTE₄	Lökotrien E ₄
LOX	Lipooksijenaz
MSS	Merkezi sinir sistemi
NE	Norepinefin
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	Nitrik oksit
NSAİİ	Non-steroid antiinflamatuvar ilaç
PAF	Trombosit aktive edici faktör
PAG	Mezensefalik periaqueduktal grisi
p-BK	Para-benzokinon
PG	Prostaglandin
RVM	Rostroventral medulla

Kısaltmalar**Açıklamalar****SF**

Serum fizyolojik

SH

Standart hata

TAF

Trombosit aktive edici faktör

TNF

Tümör nekroz faktörü

TXA₂Tromboksan A₂**TXB₂**Tromboksan B₂**WDR**

Geniş dinamik aralık



1. GİRİŞ

Ağrı geçmişten beri insan sağlığı açısından önemli bir klinik sorun olarak algılanmış, dünya çapında bir sağlık sorunu olmasından ötürü de tedavisi üzerinde uzun yıllar çalışılmış bir olgudur. Uluslararası Ağrı Çalışmaları Birliği (IASP) ağrıyı “vücudun belirli bir bölgesinden kaynaklanan doku harabiyetine bağlı olan ya da olmayan, kişinin geçmişteki deneyimleri ile ilgili hoş olmayan emosyonel bir duyum” şeklinde tanımlamıştır [1]. Ömür boyunca kazalar, hastalıklar gibi birden fazla sebepten dolayı oluşabilecek ağrının, hasta yönünden ifade edilişi yaş, cinsiyet, sosyo-kültürel durum gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Bununla birlikte yapılan bir çalışmada Türkiye’de ağrı prevalansının %63.7 gibi yüksek bir değerde olduğu tespit edilmiştir. Yine İstanbul’da yaşayan ve yaş ortalaması 35.6 olan 250 kişilik bir araştırma grubu üzerinde yapılan çalışmada vücudun farklı bölgelerindeki ağrı prevalansı %92.8 bulunmuştur [2].

Bireyi fiziksel, psikolojik ve toplumsal açıdan etkileyen ve hayat kalitesini ciddi şekilde etkileyen ağrının tedavisi ve kontrol altına alınması bu bakımdan çok önemlidir. Ağrı kontrolünde farmakolojik yöntem (analjezikler) tedavide kullanılan başlıca ve en etkili yöntemdir [3]. İlaç tedavisinde non-steroid antiinflamatuar ilaçlar (NSAİİ) ise ağrı ve inflamasyon tedavisinde temel teşkil etmektedir [4]. Asetilsalisilik asitin (ASA) 1899’da pazara sunulmasından 1960’ların ilk yıllarına dek antiinflamatuar ve analjezik ajanların mekanizmaları tam olarak bilinmiyorken 1970’lerde aspirin ve NSAİİ’lerin mekanizmasının keşfedilmesiyle yeni NSAİİ’lerin geliştirilmesinin önü açıldı [5]. Bilinen birçok yan etkileriyle birlikte, bugün NSAİİ’ler, başlıca kas iskelet sistemi hastalıkları ve ağrının çeşitli formlarını tedavi etmek amacıyla kullanılan en etkili ilaçlardır. NSAİİ’lerin alt-üst gastrointestinal hasar, akut böbrek yetmezliği, konjestif kalp yetmezliği gibi akut ya da kronik durumlarla doğrudan bağlantısının olduğu bilinmekte ve ilacın kullanımını dahi kısıtlayabilen ağır, istenmeyen etkilerinden ötürü yeni, yan etkileri az ve daha etkili olabilecek NSAİİ türevi ilaçların geliştirilmesi gerekli olmuştur [6].

Biz bu çalışmamızda Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri tarafından sentezlenen, moleküler yapı aktiviteleri araştırılan yeni iki ağrı kesici ilaç adayı izoksazol türevi bileşiği analjezik ve antiinflamatuar etkileri bakımından incelemeyi amaçladık.

Antiinflamatuvar aktivitesini değerlendirmek istediğimiz izoksazol türevi iki moleküle (BRP-187 ve BRP-292) farelerde karajenan (carrageenan: CG) ile oluşturduğumuz penęe ödem metodunu uyguladık. Analjezik değerlendirme için de yine farelerde para-benzokinon (p-BK) ile oluşturulan ağrı modelini (writhing) kullandık. Çalışmada ağrı tedavisinde daha az yan etkiye sahip ve daha etkili NSAİİ türevlerinin keşfedilmesi ve kaynaklara ilave edilmesini hedefledik. Her iki bileşiğin de bu bağlamda ağrı tedavisinde yeni bir ilaç olarak dūřünülebileceęi ve yeni molekül bulunmasının temellerine ve literatüre katkı sağlayacağı görüşündeyiz.



2. GENEL BİLGİLER

Merskey ağrının tanımını “hakikatte var olan ya da var olması olası doku zararıyla beraber olan nahoş, hissi, duygusal ve ruhsal deneyim” şeklinde vermiştir [7]. Esener'e göre ağrı: Bir dokuda zarar meydana geldiğinde beliren karmaşık ve hoş olmayan bir anlama/kavrayış olup hastanın hekime başvurmasına neden olan en önemli etkidir. Ertekin ise ağrıyı: “vücudun bir noktasından kaynak alan, nahoş, hastayı telaşa ve durumdan uzaklaşma/paniğe yönlendiren algıdır” olarak tarif etmiştir [8].

Ağrı çok çeşitli hasar, yaralanma ve bazen de hastalığın kendisiyle doğrudan ilişkilidir. Bazı durumlarda postoperatif ağrı veya malignite ile ilişkili ağrı gibi ayrı bir nedenden kaynaklanan ağrı ve ilişkili semptomlar/koşullar oluşabilir ya da ağrının nöropatik ağrı, başağrısı gibi birincil sorunu oluşturduğu durumlar meydana gelebilir. Bu yüzden ağrının sınıflandırmasının yapılması ve mekanizmasının anlaşılabilmesi önem taşımaktadır.

2.1. Ağrının Sınıflandırılması

Ağrının sınıflandırılması; başlangıç zamanı, vücuttaki bölgesi, mekanizması vs. gibi çeşitli parametreler dikkate alınarak yapılabilir. Biz 3 başlık altında ağrıyı sınıflandıracamız.

Patofizyolojik kökenine göre ağrı

Somatik ağrı

İç organlar haricinde vücudun eklem, kemik, kaslarında oluşan ağrılar örnek verilebilir. Aniden başlar ve genelde yeri bellidir [9]. Somatik liflerle ilerleyen, değişik şekilde vücudun herhangi bir yerinde beliren ağrı, hızlı Aδ ve yavaş C fibrilleri tarafından iletilir [10]. Eğer uyaran kısa süreli ise ve doku hasarına sebebiyet vermez ise uyarıcı kesildiğinde ağrı da durur [11]. Batma, sızlama ve zonklama şeklinde kendini gösterir.

Viseral ağrı

İç organlardan çıkan uyarılar, otonom sinir sistemine ait afferent yollarla taşınırlar. Visseral ağrı genellikle yaygın, yavaş yavaş şiddeti artan, yeri zor belli olan tiptedir [9]. Viseral ağrı sempatik liflerle iletilir. Yavaş oluşur, sızlayıcıdır, geniştir, lokalizasyonu güçtür. Bundan dolayı tanısı da zordur [12].

Sempatik ağrı

Sempatik sinir sisteminin etkinleşmesi ile meydana gelen damarsal kaynaklı ağrılar, kompleks ağrı sendromu gibi türleri vardır. Daha geç başlar ve ilerleyen zamanlarda daha da şiddetlenir [9]. Yanma şeklinde kendini belli eder.

Zamana göre ağrı

Akut ve kronik şeklinde sınıflandırılabilir zamana göre ağrı türleri.

Akut ağrı

Travma, enfeksiyon, inflamasyonun neden olduğu 3-6 aydan daha kısa süren ve aniden meydana gelen ağrıdır. 3-6 aydan daha fazla sürmüştü ise artık kronik ağrı karakteristiğine evrilir. Genellikle akut ağrılar, özellikle postoperatif ağrılar, tabiatı gereği nosiseptiftir, somatik veya viseral kaynaklıdır. Sebebiyet veren doku bozukluğu ile bölge, büyüklük ve süre açısından benzer ilişki vardır [9]. Akut ağrının fizyolojik gayesi hastanın ağrıya sebebiyet veren etkenden uzaklaşmasını sağlamaktır [13].

Kronik ağrı

Kronik ağrı aktif hastalık süreçleri, doku hasarı ve diğer travmalardan kaynaklanmaktadır. Romatoid artrit, kanser, kas-iskelet sistemi sorunları, kalp hastalıkları, baş ağrısı kronik ağrıya neden olabilecek bazı durumlardandır. Altta yatan nörofizyolojik, anatomik ve kimyasal nedenler tam olarak bilinmemektedir [14].

Mekanizmasına göre ağrı

Ağrının anlaşılabilmesi ve tedavisi açısından mekanizmasının bilinmesi oldukça önemlidir.

Nosiseptif Ağrı

Nosiseptif ağrı en sık görülen tiptir. Bunun nedeni, vücudun etrafındaki nosiseptörler tarafından algılanan potansiyel olarak zararlı uyarılardan kaynaklanır. Nosiseptörler, vücudun zarar görmesinden kaynaklanabilecek her türlü acıyı hissetmek için var olan reseptör türüdür. Vücut, zararlı uyarıcıları veya aşırı sıcak/soğuk, basınç, sıkışma ve kimyasallar gibi vücuda zarar verebilecek şeyleri tespit eden nosiseptörler adı verilen özel sinir hücrelerini içerir. Bu uyarı sinyaller daha sonra sinir sistemi boyunca beyne iletilir ve nosiseptif ağrı ile sonuçlanır [8]. Viseral ve somatik ağrı gibi 2 kısımda incelenir [15]. Nöropatik ağrıysa nosiseptif olmayan ağrı türüdür.

Nöropatik ağrı

Periferik veya merkezi sinir sisteminin birincil bir lezyon ya da fonksiyonsuzluğuna bağlı olarak oluşan ağrı şeklinde ifade edilir. Sinir sisteminin disfonksiyonu ya da birincil lezyonuna bağlı olarak inflamatuvar ağrının tersine ekseriyetle sinir tahribatından uzunca bir zamanın ardından ortaya çıkar. Nöropatik ağrı dışarıdan uyarandan olmaksızın ve/veya normalde zararsız bir uyarandan artmış spontan ağrı ile karakterizedir [14]. Nöropatik ağrıda nosiseptif ağrıdan değişik olarak devamlı bir uyarıcının olmayışı başlıca farklarıdır [16].

Deafferantasyon ağrı

Periferik ve santral sinir sisteminin hasarı sonrasında somatosensoryal uyarıcı aktarımının santral sinir sistemine iletiminin son bulması ile meydana gelir [8]. Tümör yoluyla nöronların hasarı ve diabetik nöropati benzeri nöropatiler nöronlarda ve sinir liflerinde harabiyete neden olabilmektedir [17].

Psikosomatik ağrı

Kronik ağrılı hastalarda kronik ağrıya bağlı olarak bir takım psikolojik semptomların ortaya çıkması doğaldır. Çünkü kronik ağrılı hastanın sosyal yaşantısında değişiklikler olmakta, işinden gücünden alıkonmakta ve kendisini toplumdan itilmiş hissetmektedir. Ancak psikosomatik ağrı daha farklı bir kavramdır. Hastanın psişik ya da psikososyal sorunlarını ağrı biçiminde ifade etmesidir. Buna örnek olarak somatizasyon bozukluğu dediğimiz klinik durum verilebilir. Hasta bir anlamda ağrıyı kullanmakta, çeşitli kişisel, ekonomik ve toplumsal sorunlarını ağrı biçiminde ifade ederek ilgi çekmeye ve toplumun kendisi üzerinde dikkatini toplamaya çalışmaktadır [9].

2.2. Ağrı Algılanmasının Temel Mekanizmaları

Vücutta tahrip edici ve ağrı verici uyarıcıları algılamak amacıyla spesifik, nosiseptör denilen reseptörler doku ve organlarda bulunmaktadır. Nosiseptörler vasıtasıyla iletilen uyarı omurilikten talamusa geldiğinde ağrı hissiyatı meydana gelerek limbik sistem ve serebral kortekste sürer [18].

Ağrı mekanizmaları; meydana geldiği bölge, karakteristiği ve nöromedyatörler dikkate alınarak periferik ve santral mekanizmalar şeklinde iki bölüme ayrılabilir.

2.2.1. Santral mekanizmalar

Ağrı meydana gelmesi beyinde birçok bölgenin interaktif olmasına bağlıdır ve ağrının beyinde oluşmasına yardım eden santraller ağrının nöromatriksini meydana getirirler. Bütün bu santraller ağrının hissel, emosyonel, kognitif, motorsal ve zihinsel yoldan birçok yönünü beslemektedir [19].

Periferik mekanizmalar tek başına nöropatik ağrının tüm özelliklerini açıklayamaz; merkezi mekanizmalar da kritik bir rol oynamaktadır [20]. Santral nosiseptör nöronlarının anormal hiper-stabilitesi olan merkezi sensitizasyon olarak bilinen anahtar bir sürecin, periferik yaralanma, taşıkinin ve nörotransmitterlerin salınması nedeniyle omurilikte meydana geldiği düşünülmektedir. Taşıkininler, nöropeptid P maddesi ve nörokinin A'yı içerir [21].

Nörotransmitterler arasında glutamat, kalsitonin geni ile ilişkili peptid ve γ -aminobütirik asit (GABA) bulunur. Bu maddelerin nöral reseptörlere uzun süre bağlanması ve salınması, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörünü aktive eder ve bu da hücre içi kalsiyum seviyelerinde bir artışa neden olur [22]. Kalsiyum seviyelerindeki artışın, merkezi sinir sistemindeki birkaç kalsiyum kanalından biri olan N tipi kalsiyum kanallarından [23] meydana geldiğine ve merkezi sensitizasyonun korunmasında önemli olduğu düşünülmektedir [24, 25]. Bu değişiklikler, sırayla, dorsal boyun nöronlarında bir dizi biyokimyasal reaksiyona neden olur. Aktivasyon için eşik düşürülür, uyarılara cevap arttırılır (hem büyüklük hem de süre içinde) ve alıcı alanın boyutu büyütülür (uyaran almak için nöron yüzeyinde daha büyük bir alan bulunur) [21]. Sonuçta bu değişiklikler, omurilik nöronlarının uyarılma kabiliyetinin ve hassasiyetinin artması olarak tanımlanan ve "wind-up" olarak bilinen bir fenomenle sonuçlanır [26].

Santral sensitizasyon, periferik sinir hasarını takiben nöropatik merkezi ağrının klinik semptomlarının altında yatan önemli fizyolojik bir fenomendir [27]. Santral sensitizasyon, esas olarak, dorsal boynun yüzeysel tabakalarına yansıyan miyelinsiz nosiseptif C-liflerinin ateşlenmesiyle tetiklenir [11]. Bu lifler, 20 saniyeye kadar sürebilen yavaş uyarıcı postsinaptik potansiyeller üretir. Kısa tekrarlayan afferent nosiseptif lif girişi, merkezi ağrıyı ileten nöronlarda (CPPN'ler) "wind-up" fenomenini indükleyen bu yavaş potansiyellerin geçici olarak toplanmasına neden olur. Bu durumda, daha sonraki C-fiber girişi, CPPN'lerin aksiyon potansiyeli çıktısında aşamalı bir artışa neden olur. Bu nöronal tepkinin kazancı, aktiviteye bağlı bir NMDA reseptörü tarafından kontrol edilir [28, 29].

Çıkan Ağrı Yolağı

Nosiseptif uyarı omurilikten üst merkezlere 5 ana çıkan yolak ile iletilir.

Spinotalamik yol

İnsanlardaki spinotalamik yolun acı, soğuk, sıcaklık ve dokunma hissine aracılık ettiğine inanılmaktadır. Bu inanç büyük ölçüde ağrıyı gidermek için yapılan anterolateral kordotomilerin veya omuriliğin hastalık veya travma nedeniyle hasar görmesinden kaynaklanan eksikliklerin sonuçlarına dayanmaktadır. Bununla birlikte, spinal lezyonlardan

önce ve sonra zararlı uyaranlara davranışsal tepkilerinde değişikliklerin ölçüldüğü primatların deneysel çalışmalarının sonuçları klinik kanıtlarla tutarlıdır [30].

Spinoretiküler yol

Bu sistem, ağrı, sıcaklık, dokunma ve kaşıntı ile ilişkili zararsız ve zararlı potansiyelleri yayan WDR, SN ve N-NOC tiplerinin nöronlarından kaynaklanmaktadır [31-36]. Medullada, bu nöronların gövdeleri lamina I ve V'de daha fazla sayıda bulunur, ancak lamina II, IV, VI, VII, VIII ve X'de de bulunur.

Spinomezansefalik yol

Spinomezansefalik yolağın aktivasyonu mezansefalik periakvaduktal boz alan ve periventriküler alandaki nöronların uyarılması ile ağrı kontrol sisteminin harekete geçmesine sebep olur [37].

Spinoservikal yol

Genellikle lamina III ve IV'ten kaynaklanan nöronlardan meydana gelir. Bunların aksonlarının ekseriyetle omuriliği çapraz geçerek talamusta bittiği bilinmektedir [38].

Spinohipotalamik yol

Lamina I, V, VII, X'da bulunan nöronlardan kaynaklanır. Aksonlar supraspinal kontrol alanlarına yol alarak nöroendokrin ve kardiyovasküler cevabı kontrol ederler [39].

İnen ağrı yolağı

Çoklu nöroanatomik seviyelerin azalan ağrı inhibisyon sistemiyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bunlar korteks, diensefalon, limbik sistem, mezensefalik periaqueduktal grisi (PAG), rostroventral medulla (RVM), nucleus raphe magnus (NRM) ve sırt boynuzunu kapsar. Mezensefalondaki yükselen spinal nosiseptif sinapsların gelişi PAG'deki inhibe edici substratları tetikler. Bu sinyaller daha sonra nükleus raphe magna (NRM) iletilir ve ardından nosisepsiyon modülasyonunun gerçekleştiği dorsal kornaya düşen liflere

gönderilir. Bu nosisepsiyon üzerindeki azalan etki, inhibe edici veya kolaylaştırıcı olabilir. Sırt boynuzu I, II ve V laminalarında NRM terminallerini alır (STT'nin nosiseptif nöronlarının, spinoretiküler ve spinomezensefalik yolların inhibe edilmesiyle). Lamina II'de (substantia jelatinosa) inhibisyon, 5-HT'nin (serotonin) ve inen engelleyici liflerden gelen norepinefrinin (NE) salınmasından sonra meydana gelir. P maddesinin inhibisyonu inhibitör interneronlar ve/veya opioid salımı ile engellenmesi bloke edilir [40].

Santral ağrının nöromedyatörleri

GABA

GABA salınmasını sağlayan nöronlar beynin bütününde ve omurilikte yerleşmişlerdir. Çoğunlukla retina ve omurilikte yer alan bu nöromedyatörler omurilikteki sinir noktalarında presnaptik inhibisyon oluştururlar [41].

Nöronlar ve glia tarafından salınan GABA, hem nöronlar hem de glial hücrelerde presinaptik ve sinaptik zarlarda dağıtılan komşu GABA reseptörleri aracılığıyla inhibe edici bir rol sağlar [42, 43]. Üç tür GABA reseptörü vardır: 1) GABA-A, 2) GABA-B ve 3) GABA-C. GABA-A reseptörü bir iyonotropik ligand kapılı Cl^- kanalıdır ve hem nöronlarda hem de glial hücrelerde omurilik gri maddesi boyunca bulunur. GABA-A reseptörünün aktivasyonu, klorür iyonlarının geçirgenliğini artırır ve sinaptik sonrası nöronların hiperpolarizasyonunu sağlar ve bu, hücrenin istirahat membran iletkenliğinde artışlara neden olur [44, 45]. GABA-B reseptörü, bir G-proteinine birleştirilmiş bir metabotropik reseptördür ve hem nöronlar hem de glial hücrelerde omurilik boynuzu yüzeyel katmanlarında yoğunlaşmıştır [46-49]. GABA-B reseptörünün aktivasyonu, omurilikteki primer afferent terminallerde sinaptik iletimi önler, presinaptik terminalde kalsiyum girişini azaltarak ve sinaptik terminalde hiperpolarizasyonu azaltarak potasyum iyonlarının iletkenliği artar [50]. GABA-C reseptörü, GABA-A'nın bir alt tipidir ve benzodiazepine duyarsızdır [51, 52]. Günümüzde, iyonotropik GABA-C reseptörünün somatosensör sistemlerdeki rolü bilinmemektedir, ancak biliş ve nöronal işlemede önemli olduğu görülmektedir [53-55].

Glutamat

Glutamat reseptörlerinin modülasyonunun, merkezi (örneğin, omurilik yaralanması) veya periferik hastalıktan kaynaklanan ve/veya hastalıktan kaynaklanan nöropatik ağrı da dahil olmak üzere, çeşitli kalıcı ağrı kategorilerinde terapötik fayda potansiyeli olabileceği fikrini destekleyen kanıtlar ortaya çıkmaktadır. Bu inatçı ağrı sınıfları ile ilişkili semptomlar arasında: hafif zararlı uyaranlara karşı artan bir ağrı hissi olan hiperaljezi; normalde zararlı olmayan uyaranlarla ilişkili bir ağrı olan allodini; ve kendiliğinden ağrı bulunur. Bu klinik kalıcı ağrı formları belirgin olsa da, hepsinin, en azından kısmen, nosiseptif yollardaki, genellikle merkezi sensitizasyon olarak adlandırılan glutamaterjik sinyallemenin sinaptik etkinliğindeki uzun vadeli artışlara bağlı olduğu tahmin edilmektedir. Orijinal olarak omuriliğin dorsal boynuz nöronlarında yoğun periferik zararlı uyaranlara, doku yaralanmasına veya sinir hasarına bağlı olarak artmış bir sinaptik iletim düzeyi olarak tarif edilen [56], supraspinal nosiseptif bölgelerde glutamaterjik yollarda merkezi sensitizasyon belirgindir [57]. Santral sensitizasyon, ağrı eşiğinde (allodini) azalma ile birleşen dorsal korn nöronlarının yanıt verme kabiliyetinde artışlara, ağrı yanıtlarının artmasına (hiperaljezi) ve ağrı duyarlılığının yaralanmamış bölgelere yayılmasına yol açar. Merkezi sensitizasyon ile ilişkili uzun vadeli sinaptik plastisitenin, esas olarak, iyonotropik glutamat reseptörlerinin (yani, NMDA ve AMPA reseptörlerinin) biyofiziksel özelliklerinde ve/veya postsinaptik membrana yönelik AMPA reseptör kaçakçılığının tanıtımında fosforilasyonla indüklenen değişiklikler olarak ifade edilmesi önerilmektedir. Bununla birlikte, önceden veya postnafik olarak etki eden metabotropik glutamat reseptörlerinin, merkezi sensitizasyonun induksiyonunu ve/veya korunmasını düzenlediği gösterilmiştir [58]. Nosiseptif transmisyonun belirginliğinin altında yatan ağrı yollarındaki değişikliklere ek olarak, merkezi sinir sistemindeki (MSS) ödül ve aversiyon devreleri arasındaki etkileşimin kalıcı ağrı durumlarının duygusal yönlerini değiştirdiği düşünülmektedir [59].

Nöropeptidler

C liflerinin aktivasyonuna bağlı olarak projeksiyon hücrelerinde çok da hızlı olmayan ve uzun zamanlı depolarizasyona neden olurlar. P maddesi, Kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) ve nörokinin A nöropeptid türlerine birer örnektir [60].

2.2.2. Periferik mekanizmalar

Periferik sinir sisteminde bir hasardan sonra, kimyasallar hasarlı hücrelerden ve inflamatuvar hücrelerden (örneğin mast hücreleri, lenfositler) salınır [22]. Bu kimyasallar noradrenalin, bradikinin, histamin, prostaglandinler (PG), potasyum, sitokinler, NE, serotonin ve nöropeptidleri içerir. Bu hücrel mediatörler, nosiseptörleri daha fazla nöral girdilere duyarlı hale getirmek için hareket ederler [24]. Bu, hasarlı nosiseptör sinir liflerinde ve dorsal kök ganglionlarında iyon kanallarında ve özellikle sodyum iyon kanallarında ve yerlerinde değişiklikler üretir [21]. Bununla birlikte, depolarizasyon için eşik düşürülür ve ektojik boşalma olarak bilinen kendiliğinden boşalma anormal yerlerde meydana gelebilir. Sonuç olarak, nosiseptörlerin periferik duyarlılık olarak bilinen bir olgu olan termal ve mekanik uyarılara tepkisi artmıştır [21, 24]. Bazı hastalık süreçlerinde, azalan kan beslemesinden kaynaklanan sinir demiyelinizasyonu, sinir lifi boyunca ektojik boşalmaların üretimine de katkıda bulunabilir [22].

Normal şartlar altında, bitişik sinir lifleri birbirlerinden izole edilir [61, 62]. Bununla birlikte, kalıcı sinirsel aktivite ve sinir hasarı nedeniyle meydana gelen değişiklikler, hasar görmüş sinir lifleri ile yakındaki yaralanmamış lifler arasında kimyasal aracılı elektrik bağlantılarına neden olabilir. Ephaptik iletim ("çapraz uyarma" veya "çapraz konuşma") olarak bilinen bu iletimin, bu normal "sessiz" nosiseptörlerdeki aktiviteyi uyandırmasına ve dolayısıyla acı çekmemesine neden olduğu düşünülmektedir [22, 25, 62].

Hiperalezi (normal olarak ağrılı bir uyarana yanıt olarak artan ağrı hissi) bazen klinik olarak ağrı olan hastalarda görülür. Günümüzde, C-fiber primer afferent nöronların aracılık ettiği periferik duyarlılığın hiperaleziden sorumlu mekanizma olduğu düşünülmektedir [63]. Bu değişiklikler bazen klinik ortamda spontan ağrı olarak belgindir [22, 64]. Yanma ağrısının duyuları C-liflerinde sürekli boşalmanın sonucu olabilir, oysa dizestezi (hoş olmayan anormal duyular) ve parestezi (anormal duyular) A- δ veya A- β liflerinde aralıklı kendiliğinden boşalmalardan kaynaklanabilir [65].

Kapsamlı araştırmalarla yapılan bir başka periferik mekanizma sempatik duyuş eşleşmedir [20, 25]. Klinik uygulamada, küçük bir hasta grubunda nöropatik ağrının sempatik sinir sistemine (örneğin, karmaşık bölgesel ağrı sendromu tip 1) bağlı olduğu görülmüştür. Buna

bazen sempatik olarak tutulan ağrı denir. Bunun ne zaman ve neden gerçekleştiği tam olarak anlaşılmasına rağmen, sempatik sinir sistemi ile duyuşal sinir sistemi arasındaki anormal bir bağlantı, bu tür ağrının altında yatan neden olabilir [25].

Nöropatik ağrı için etkili olan bazı ilaçlar, periferik duyarlılığa katkıda bulunan ektoşik boşalmaları baskılayan sodyum kanallarının modülasyonu ile etki eder. Bunlar arasında bazı antikonvülsan ilaçlar (örneğin karbamazepin, okskarbazepin), lokal anestezişler (örneğin lidokain, meksiletin) ve trisiklik antidepresanlar (örneğin, desipramin, nortriptilin) bulunur [21].

Primer afferent nosiseptörler

Nosiseptörler sinir sistemi haricinde bütün doku ve organlarda mevcuttur. A (alfa, beta, gama ve delta), B ve C şeklinde gruplanmışlardır. Ağrı bilgilerini spinal kordun arka boynuzuna ileten A delta mekanotermal ve C polimodal nosiseptörleridir [16].

Primer afferent nosiseptörler nosiseptif olguların başlama odağıdır. Bu nosiseptörler ısısal, kimyasal ve mekanik uyarıcılara cevap oluşturan sinir uçlarıdır. Nosiseptöre ait cevap karakteristiğiyle ilişkili olarak spinal kord doğrultusunda bir yayılma oluşur. Ağrıya ait bilginin yayılmasına ilişkin olarak reseptörler iki bölümde incelenir: A-delta mekanotermal ile C polimodal nosiseptörler. Pekçok ağrı türü primer afferent reseptörlerden C polimodal nosiseptörlerin uyandırılmasıyla başlatılır. Fakat nosiseptör aktive aşamasında değişik etmenler de olaya katılır. Mesela, derinin çizilmesi o alanda inflamatuvar olayları da tetikler ve bununla birlikte bazı maddeler salgılanır. Normal şartlarda uyarıcılar yüksek eşikteki reseptörleri uyarırlar [16]. Klinikteyse ağrıya sebep olan uyarıcı uzayan travma ile doku yaralanmasına bağlıdır. Doku yaralanması ise inflamasyona ve dolaylı olarak da nosiseptörlerin fazlaca uyarılmalarına sebep olur.

Nöronlarda uyarıcının ulaşma şiddeti, aksonların genişliği ve miyelinli/miyelinsiz olması ile yakından bağlantılıdır. A-delta lifleri ince miyelinlidir ve ağrının hızlı iletilmesini sağlar. Miyelin kılıf sahibi olmayan C lifleri ise yavaş ağrı iletiminden mesuldür [37]. Büyüklüklerine bağlı olarak afferent liflerin gücü de farklılık arz etmektedir. Küçük lifler

nosisepsiyon oluşturan eksitatör tesir meydana getirirlerken büyük lifler (A-alfa/beta) omurilikte uyarımda inhibitör davranış sergilerler [66].

Nosiseptörler harekete geçtiğinde doku harabiyetinin olduğu alanın etrafında ve omurilikte yeni dizi nöronların sinaps alanlarında; glutamat, P maddesi ve CGRP gibi kızarma, ödem, iritasyon oluşturan nörotransmitterlerin salınmasına sebebiyet vererek ağrıyı meydana getirir [17].

Periferik ağrıda nosisepsiyon genellikle dört temel kavramla tanımlanır [26].

Transdüksiyon

Nosisepsiyonun ilk süreci olan transdüksiyon, nosiseptörler adı verilen primer afferent nöronların (serbest sinir uçları) yaygın olarak dağıldığı periferde (deri, deri altı doku, visseral veya somatik yapılar) başlar. Nosiseptörler mekanik, termal veya kimyasal zararlı uyarılara cevap verir. Doku hasarı, dokular bu uyarılara yeterli miktarda maruz kaldığında meydana gelir. Bu hasar, ağrının periferden omuriliğe iletilmesini kolaylaştıran bir dizi maddenin (örneğin PG'ler, bradikinin ve P maddesi) salınmasına neden olur [67]. Basitçe söylemek gerekirse, transdüksiyon, zararlı uyarıların ağrıyı iletmek için gereken elektrik enerjisine değiştirildiği hücrenel süreçtir [68].

Transmisyon

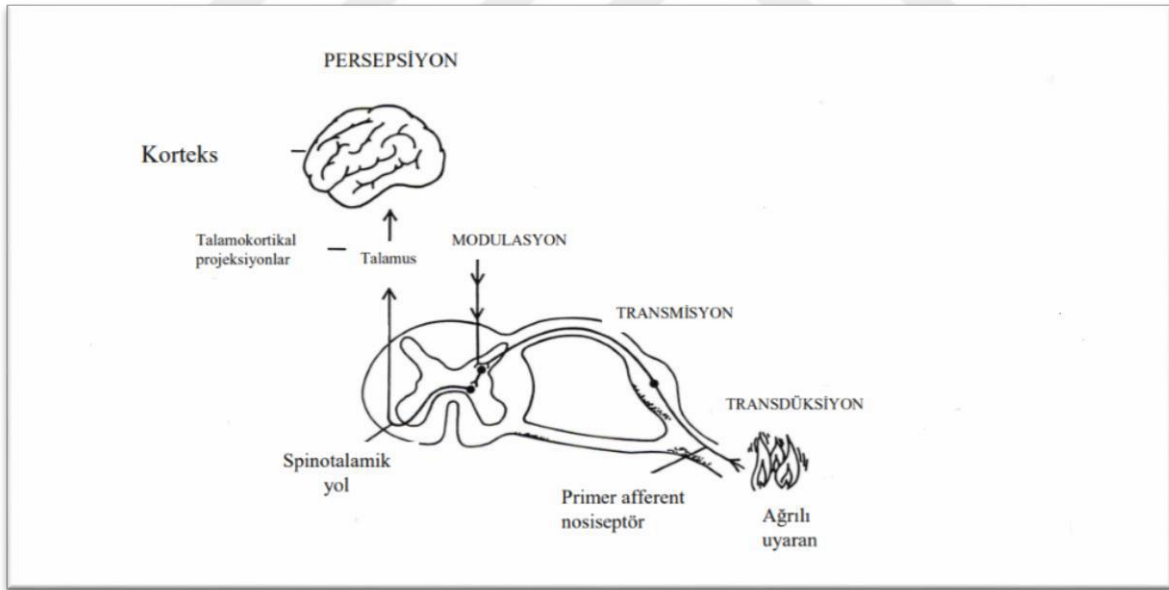
Nosiseptör lifleri boyunca (sinir aksonları) ağrı darbesinin iletimi, transdüksiyon tamamlandığında başlar. İki tip nosiseptör lifi, C lifi ve A lifi, transdüksiyon bölgesinden (çevre) omuriliğe ağrı iletir. C-lifleri, zayıf lokalize, donuk ve ağırlı ağrıyı ileten miyelinsiz, küçük çaplı, yavaş iletken liflerdir. A-δ lifleri ince uçlu miyelinli, geniş çaplı, hızlı ileten liflerdir ve bunlar iyi lokalize keskin ağrılar iletir. Aktarımın birinci bölümü sırasında, itici, omuriliğin dorsal boynuzuna artan bir şekilde nosiseptör lifleri boyunca taşınır. Bu omurilikten beyin sapı ve talamusa iletimle takip edilir. Bir röle istasyonu olarak görev yapan talamus, dürtüyü işlenebileceği kortekse gönderir [67].

Modülasyon

Ağrı geçişinin modülasyonu (inhibisyonu ve değiştirilmesi) merkezi sinir sistemi içerisinde çeşitli yerlerde meydana gelir [69]. Modülasyonda yer alan nöronal yollara genellikle inen ağrı sistemi denir, çünkü bunlar beyin sapından kaynaklanırlar ve omuriliğin sırt boynuzuna inerler [70]. Bu inen yollar, endojen opioidler, serotonin ve NE gibi, zararlı uyarıların iletimini engelleyebilen ve analjezi oluşturabilen maddeleri serbest bırakmaktadır [67].

Persepsiyon

Ağrı algısı ve iletimi modülasyonunun nöral aktivitesinin sonucudur ve davranışsal ve duygusal faktörlerden etkilenir [22], öznel acı deneyimidir. Persepsiyon ağrının algılanması mertebesidir [71]. Kortikal yapılarda ağrı algısının oluştuğu düşünülmektedir [69]. Bununla birlikte; beyinde, ağrının bilinçli bir deneyim haline geldiği ve bireylerin öznel acı deneyimlerinde değişiklik gösterme nedenlerinin kesin yeri belirsizdir [67].



Şekil 2.1. Ağrının periferik iletimi [72].

2.3. Deney Hayvanlarında Ağrı Oluşturma Yöntemleri

Nosisepsiyon ve ağrı hem sinirbilim hem de tıbbi araştırma için geniş bir alandır. Zaman içinde, konuyla ilgili temel ve çeviri araştırmaları için araçlar sağlamak üzere kemirgenlerde

çeşitli testler ve modeller geliştirilmiştir. Termal, mekanik ve kimyasal uyaranları kullanan testler, hiperaljezi ve allodini ölçümleri, inflamatuvar veya nöropatik ağrı modelleri, araştırmacılar için uygun bir araç kutusu oluşturur. Bu testler ve modeller, henüz yeni analjezik ilaçlara dönüşmemiş olsalar da, fizyolojik ve patolojik ağrının ana moleküler temelinde hızlı bir ilerleme sağlamıştır. Daha yakın zamanlarda, nosiseptif reflekslerden ziyade sıçanlarda veya farelerde ağrıyı değerlendirmeye çalışmak veya kronik ağrıdan etkilenen karmaşık durumları incelemek için artan bir çaba gösterilmiştir. Bu, temel araştırma, prelinik çalışma ve insan çalışmaları arasında dengeli araştırma çabaları olan bir alanda prelinik araştırmaların translasyonel değerini daha da arttırmaya yardımcı olmuştur [73].

2.3.1. Termal uyarıcıyla oluşturulan ağrı metodları

Sıcak Plaka (Hot plate) metodu

Sıcak plaka testi (Woolfe ve MacDonald, 1944, O'Callaghan ve Holtzman, 1975) bu alanda bir başka klasik testtir. Sıcaklık genellikle 52 veya 55°C'ye, daha nadiren 48°C'ye ayarlanır. 52 veya 55°C'lik bir kurulum, plakanın malzemesine bağlı olarak pençe yalamak için 5 ila 10 s arasındaki temel gecikmelerin gözlemlenmesine izin verir. Plaka malzemesi, aslında ısı iletimini etkileyebilir ve mevcut sıcak plaka markaları arasındaki gecikme değerlerinde küçük farklılıkları açıklayabilir. Bu sıcaklıklar, nosiseptif uyarıcı tespit edilinceye kadar cilt sıcaklığının artması için gereken süreyi ve geri çekilme tepkisini ortaya çıkarmak için gecikmeyi yansıtan ısı nosiseptörlerinin yanıt eşiğinden (10-15°C) daha yüksektir. Yüksek sıcaklıklar yanma riski nedeniyle kullanılamaz. Sıcak plaka testindeki cevaplar supraspinaldir. Ölçülen parametre genellikle pençe yalama gecikmesi veya tekrarlanan ölçümlere izin veren ilk gözlenen cevaptır. Bazı çalışmalar özellikle farelerde olmak üzere sıçrama gecikme süresine dayanmaktadır. Bununla birlikte, bu parametre, etik sorunları gündeme getirebilecek, daha uzun gecikmelere neden olacağı için dikkatli kullanılmalıdır ve aynı hayvan üzerinde önlemleri tekrarlama olasılığını sınırlayan bir öğrenme/beklenti sürecine de yol açabilir. Plaka sıcaklığındaki küçük farklılıklar, yanıt gecikme süresinde önemli farklılıklara neden olabilir. Bu nedenle, davranış testleri için özel olarak tasarlanmış güvenilir plakaların kullanılması, sıcaklık değişimlerinin hızlı ayarlanması ve sıcaklık

kontrolünde $0,1^{\circ}\text{C}$ hassasiyetle kullanılması önemlidir. Testin gerçekleştirilmesi kolay olsa da, otomatik değildir. Zamanlayıcı deneyci tarafından başlatılır ve durdurulur [73].



Resim 2.1. Hot plate metodu için düzenek [74].

Kuyruk çekme metodu

Bu metod 1941 senesinde D'Amour ve Smith'in bulduğu bir methodur. Rodentlerde çok yoğun biçimde kullanılan ağrı deneylerindedir. Methodda hayvanın kuyruğuna sıcaklık verilerek ağrı hissedip kuyruğunu geri almasına dair geçerli zaman hesabı yapılmaktadır.



Resim 2.2. Kuyruk çekme metodu için düzenek [74].

Kuyruk batırma metodu

Hayvanın kuyruğu sıcak sıvıya daldırılarak tail-flick metodunda olduğu gibi geri çekişine kadarki zamanın kaydedilmesine dayanır.

2.3.2. Kimyasal etkenle yapılan ağrı metodları

Kıvrınma (writhing testi) yöntemi

Bu yöntem 1957 senesinde Siegmund tarafından uygulanmıştır. Rodentlerde analjezik etkinlik tespitinde en çok tercih edilen metoddur. İntraperitoneal yoldan enjekte edilen madde ile ağrı oluşumu başlatılır. İzlem yapmak için fareler camdan bölmelere alınırlar. Ağrı oluşturan madde verildikten 15 dakika sonra karındaki kasılmalar izlenerek sayıları kaydedilir. Hayvanın vücudunun bir kısmını bükmesi, çevirmesi, arka bacaklarının geriye doğru gerilmesi ve ön-arka bacak mesafesinin uzaması gibi hareketlerle tespit edilir. Ağrıya neden olan madde olarak fenilkinon tercih edilir en fazla. Bizim deneyimizde paraben-zokinon kullanılmıştır. NSAİİ'lerin ağrı etkinliğini belirlemede kullanılan bir metoddur [75].



Resim 2.3. Abdominal konstrüksiyon (Writhing: Kıvrınma/ Karın germe) testinde farede ortaya çıkan karın gerilme hareketi [73].

Formalin testi yöntemi

Metodda %37'lik formalin çözeltisi subkutan yoldan enjekte edilir. Cevap iki kademededir. Enjeksiyonun ardından başlayan ve 5/10 dakika süren ilk faz ve 15 dakika 1 saat arasındaki ikinci faz. İkinci faz inflamasyonla birlikte gerçekleşir.

2.4. İnflamasyon

İnflamasyon, primer olarak vaskülerize bağ dokusunda olan hücre hasarına karşı oluşan kompleks bir yanıttır ve sıklıkla immün yanıt içerir. İnflamasyon mediatörleri hücre hasarının nedenleri ve atıkları ortadan kaldırarak doku onarımının sağlanması için işlev görürler. Ne yazık ki inflamasyon aynı zamanda ağrıya neden olur ve hücre hasarının nedeninin ortadan kaldırılamadığı durumlarda ise romatoid artrit örneğinde olduğu gibi kronik ağrı ve doku hasarıyla sonuçlanabilir. NSAİİ'ler ve non-opioid analjezik olan asetaminofen sıklıkla inflamasyondan kaynaklanan ağrının kontrol edilmesinde etkilidir. İnflamasyonun azaltılması için kullanılan diğer tedavi stratejileri ise immün yanıtı hedef almaktadır [76].

2.4.1. İnflamasyonun sınıflandırılması

İnflamasyonu temelde akut ve kronik inflamasyon şeklinde sınıflandırabiliriz.

Akut inflamasyon

Vücudun bir enfeksiyon veya travmaya ilk tepkisi akut inflamatuvar tepki olarak adlandırılır. Bu cevap spesifik değildir ve bedenin tehlikeye karşı ilk savunma hattıdır İmmün, endokrin ve nörolojik mediatörlerin koordineli bir lokal ve sistemik mobilizasyonundan oluşur. Sağlıklı bir cevapta, inflamatuvar cevap aktive olur, patojeni temizler (enfeksiyon durumunda), onarım işlemine başlar ve azalır. Bununla birlikte, iltihabın kendisi aksi halde iltihabı daha da teşvik edebilecek sağlıklı hücrelere zarar verebilir. Bu kaçak iltihaplanma organ yetmezliğine ve ölüme neden olabilir. Enfeksiyonun eşlik ettiği sistemik inflamasyon, klinik bulgularına dayanarak sepsis olarak tanımlanır. Sepsis sık görülen ve ölümcül bir durum olup, yalnızca ABD’de 1995’te 750.000 vaka görülmüştür [77].

Bakteriler gibi istilacı patojenler vücut tarafından hızlı bir şekilde tespit edilir ve akut bir inflamatuvar cevap oluşur. İlk cevaplayıcılar arasında nötrofiller ve makrofajlar gibi fagositik immün hücreler bulunur. Aktive edilmiş fagositik hücreler, oksijensiz radikaller gibi toksik kimyasalların yutulması ve salgılanması yoluyla bakterileri doğrudan öldürür. Bu maddeler sağlıklı hücrelere zarar verebilir. Bu hasarlı veya işlevsiz hücreler daha sonra daha fazla inflamasyona neden olabilir [77].

İdeal olarak, inflamatuvar yanıt patojeni ortadan kaldırır ve sonra azalır. Bazı durumlarda, yanıt patojeni temizlemek için yeterince güçlü olmayabilir. Diğer durumlarda, erken ve geç iltihaplanmayan dalgalar arasında, hafifletici olmayan iltihaplanma tepkisine yol açan pozitif bir geri besleme döngüsü ortaya çıkabilir. Klinik olarak, sürekli bir akut inflamatuvar yanıt, septik şok olarak kendini gösterir ve organ yetmezliği ve ölümü ile sonuçlanabilir [77].

Kronik inflamasyon

İnflamasyon, lökositlerin, damar hasarından doku hasarına neden olabilecek ajanları yok etmek için damarlardan hasarlı dokulara göç ettiği karmaşık bir savunma mekanizmasıdır.

Akut inflamasyon, özellikle bulaşıcı zorluklar sırasında sınırlı bir yararlı cevap iken, kronik inflamasyon doku hasarına yol açabilen kalıcı bir fenomendir. Akut inflamasyonun bir özelliği, başlangıçta lökosit infiltratının çoğunlukla nötrofilik olmasıdır, ancak 24 ila 48 saat sonra monositik hücreler baskındır. Buna karşılık kronik inflamasyon, makrofajlar ve lenfositler gibi mononükleer hücrelerin varlığı ile ilişkilidir. Her ne kadar birkaç açıklama öne sürülse de akuttan kronik inflamasyona dönüşüm sırasında nötrofilden monosit alımına geçişi kontrol eden mekanizmalar yeterince anlaşılmamıştır [78].

2.4.2. İnflamasyonun mediatörleri

Hücre Kaynaklı Mediatörler

Histamin

Histamin bir vazodilatör, düz kas konstrüksiyonu ve damar geçirgenliği, solunum mukusu ve mide asidi salgılanmasının güçlü bir uyarıcısıdır. Etkilerini düz kas hücreleri, nöronlar, glandüler hücreler (endokrin ve ekzokrin), kan hücreleri ve bağışıklık sisteminin hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine uygular [79]. Histamin, mast hücreleri ve bazofillerin Golgi aparatında histidinin dekarboksilasyonu ile sentezlenir ve daha sonra heparin, protein veya her ikisi ile komplekslerde salgı granüllerinde depolanır [80]. Duyarlı bireylerde histamin salımı mast hücreleri ve bazofiller üzerindeki immünglobulin E (IgE) antikoları, Ca^{++} 'a bağlı degranülasyon reaksiyonu başlatarak spesifik alerjenlerin bağlanması ile oluşur [81].

Serotonin

Trombositlerde ve mast hücrelerinde granüllerde depolanırlar. Trombositlerden serotonin çıkışını takiben, kolajenle temas veya antijenantikor kompleksleri ile temastan sonra uyarılır. IgE aracılı reaksiyonlarda mast hücrelerinden kaynaklanan trombosit aktive edici faktör (TAF), trombositlerden histamin ve serotonin salınımına ve trombosit agregasyonuna neden olur [82].

Arakidonik asit(AA) metabolitleri: PG'ler lökotrienler ve lipoksinler

AA çoğunlukla zar fosfolipidlerinde ester halinde olan yirmi karbonlu doymamış yağ asididir. Beslenmeyle gelen linoleik asitten üretilir.

İnflamatuvar süreci harekete geçiren fiziksel, kimyasal ve mekanik uyarıcılar ya da C5a benzeri inflamatif medyatörler hücre içindeki fosfolipazi aktive eder ve AA'in hücre zarındaki fosfolipazlarından salgılanmasına neden olur. Serbest kalan AA'in metabolize olmasına Siklooksijenaz (COX), Lipooksijenaz (LOX) ve sitokrom P450 sebep olur [83, 84].

Trombosit aktive eden faktör (PAF)

Makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri, eozinofiller gibi inflamatuvar cevaba giren birçok hücrenin zar fosfolipidleri üzerinden fosfolipaz A₂ vasıtasıyla meydana getirilir. PAF bir fosfolipit benzeri medyatördür. Trombositlerin degranülasyon ve agregasyonunu sağlar, trombositleri aktive ederek. Nötrofilleri de aktive eder. Endotel üstündeki eozinofillerin birikimini uyarır. Nötrofillerden epitel hücre yaralanmasına sebebiyet veren proteinlerin salgılanmasına neden olur. Bunlara ek olarak bronkokonstrüksiyon oluşturur, damar geçirimsizliğinin yükseltilmesi açısından histamine oranla 100 – 1000 kat daha kuvvetlidir [77, 95].

Sitokinler

Birçok sitokin (interlökinler, interferonlar, kemokinler, koloni stimüle edici faktörler CSF) inflamasyonun olduğu yerde üretilir. Sitokinler etkin hücrelerden salınan az molekül ağırlığı olan proteinlerdir. Doku harabiyetinin olduğu alanda salınan sitokinler damarsal geçimlilikteki ilk farklılıklardan doku tamamiyetinin çözünürlüğü ve yeniden yapımına dair farklılaşan inflamatuvar yanıtları düzenler. Bunlar endokrin, otokrin ve parakrin faaliyet sergileyen hormonlardır [77, 96]. İnflamatuvar cevabın meydana gelmesi ve büyümesinde payı olan önemli sitokinler Tümör nekroz faktörü (TNF α) ve İnterlökin (İL-1)'dir. Bunlar mast, endotel hücreleri ve başka tipteki hücrelerden uyarılmış makrofajlar aracılığıyla yapılırlar. Sitokinler, sitokin ağı denilen daha büyük birbiriyle ilişkili proteinler sisteminin

ve sinyal iletiminin bir parçası olarak işlev görür. Bunlar, farklı hücrelerin hücre tarafından alınan diğer sinyallere bağlı olarak aynı sitokine farklı yanıt verebildiği karmaşık etkileşimlerdir. Sitokin sinyalizasyonu oldukça değişkendir ve hem koruyucu hem de hasar verici tepkilere neden olabilir. Bir sitokin, genellikle diğer sitokinlerin sentezini etkiler. Bir kaskad başlatabilirler, arttırabilirler ya da diğer sitokinlerin üretimini bastırabilir. Ayrıca, genellikle diğer sitokinlerin davranışlarını etkileyebilirler. Bu etkiler antagonistik, aditif ya da sinerjistik olabilir.

COX yolağı

Kapsamlı kanıtlar COX-2-prostanoid yolunun akut inflamasyonda rol oynadığını göstermektedir. Artan COX-2 ekspresyonu, şişkinlik, ağrı ve ateş gibi ortak iltihaplanma belirtilerine aracılık eden bir dizi PG ve TX'lerin hücresel sentezi için bir substrat olan AA'in PGH-2'ye dönüşümüne yol açar [84-88]. Örneğin, PGE₂ bradikinin ve histaminin etkilerini büyük ölçüde güçlendirebilir [88]. NSAİİ'lerin COX inhibisyonuyla akut inflamasyonu azaltabildiği iyi bilinmektedir. Klinik olarak, COX-2'nin neden olduğu prostanoidlerin sentezi, alerjik rinit, artrit ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli kronik inflamasyonlarla ilişkilendirilmiştir [88, 89].

İnflamasyon bölgelerinde indüklenebilir bir COX izoformu olarak, COX-2, inflamatuvar süreçte COX-1'den daha önemli bir rol oynayabilir. Selektif COX-2 inhibitörleri, inflamasyonu azaltmada selektif olmayan COX inhibitörleri kadar etkilidirler [90]. Bununla birlikte, COX-2'nin proinflamatuvar rolü yakın zamanda, COX-2-nakavt farelerde inflamatuvar yanıtın koruyabildiği bulgusu ile sorgulanmıştır [91]. Ayrıca, COX-2 enzimlerinin inhibisyonu, kalın bağırsağın artmış inflamasyonu ile ilişkilendirilmiştir [92]. Böylece, hem COX-1 hem de COX-2'nin inflamasyon sürecine dahil olduğu anlaşılmaktadır, ancak her bir COX izoformunun katkıda bulunduğu derece tip, bölge ve iltihabik uyarıların seyri ile belirlenmektedir [88].

AA, enzim olan COX'un substratıdır. COX-2 kademeli bir süreçle AA'ten prostoglandin yapımını katalizler. Birinci basamakta AA'i PGG₂'ye dönüştürür (dioksijenaz aktive yoluyla). İkinci basamakta PGG₂'nin PGGH-2'ye indirgenmesini sağlar. Başka PG'lerin

prekürsörüdür PGH₂. PGH₂ üzerinden PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ ve Tromboksan A₂ (TXA₂) sentezlenir [93].

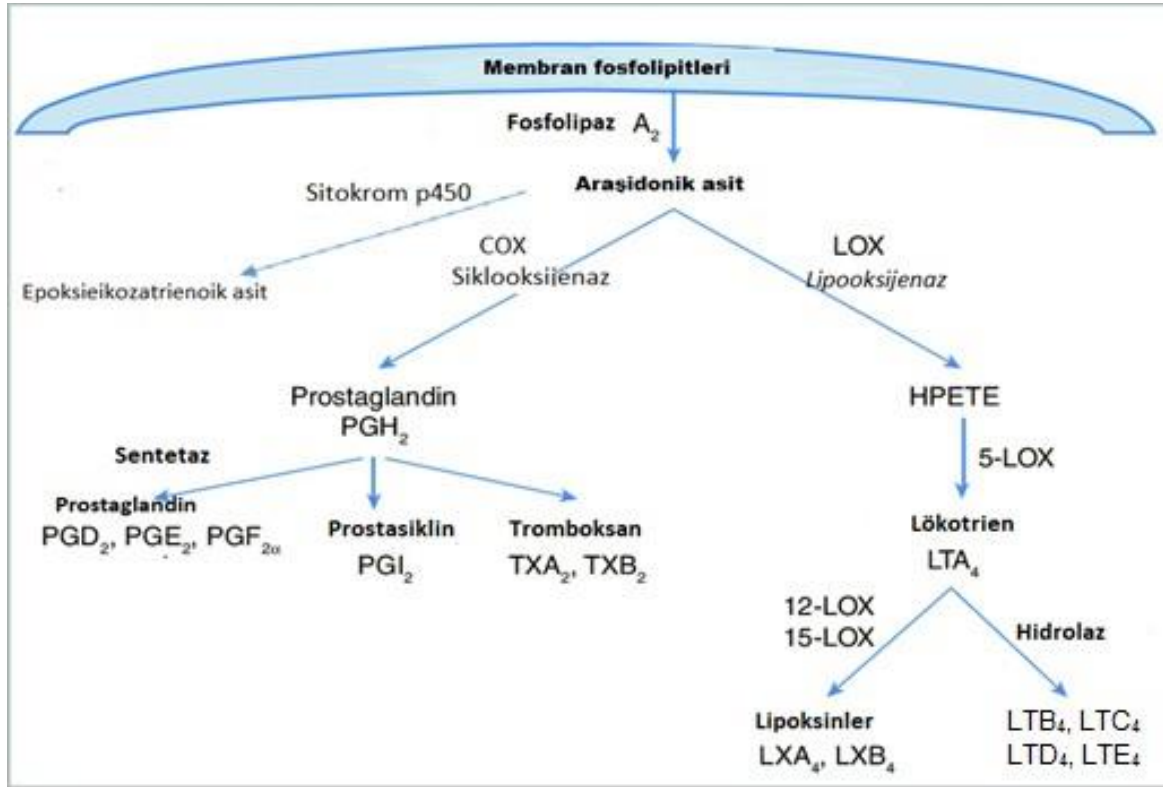
PG'ler gastrointestinal mukoza muhafazasında ve renal hemostazın düzeninde ehemmiyetli bir görev üstlenirler [93]. Damar geçimliliği ve bundan dolayı da ödem meydana gelmesini artıran PGD₂, PGF_{2α} ve PGE₂ vazodilatasyona sebep olurlar. PGE₂ ek olarak başka uyarıcılar önünde ağrı eşiğini azaltır ve sitokinlerle aktive olarak ateşin artmasına sebebiyet verir [89].

LOX yolu

LOX yolu arakidonik asidi parçalayarak lökotrien ve başka LOX ürünleri oluşturan yoldur. LOX enzimleri 5-12-15-LOX, lökosit trombosit ve endotelial hücrelerde vardır. 5-LOX lökotrien yapımına katkıda bulunması nedeniyle inflamasyon en fazla onun üstünden yürümektedir. Perinükleer zaradaki 5-LOX aktive edici protein (FLAP) ile bir araya gelerek aktifleşmektedir.

AA önce FLAP'a bağlanarak 5-LOX tarafından metabolizasyona uygun hale getirilir. Birinci aşamada AA'dan hidroperoksi türevi ara ürünler, Arakidonik Asit 5-Hidroperoksit (HPETE); daha sonra HPETE'den HETE ve HETE'den de vazoaktif lökotrien oluşumu gerçekleşir. İlk önce primer lökotrien LTA₄ oluşur. LTA₄ hidrolize uğrayarak LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄'e dönüşür [72, 82].

5-LOX'un 15-HPETE'yi ve 12-HPETE'yi etkilemesi ya da 15-LOX'un 5-HPETE'yi etkilemesinden lipoksinler oluşmaktadır. Lökotrien oluşumundan değişik olarak lipoksinlerin oluşmasında 12-LOX ve 15-LOX görev alır. Büyüme faktörleri ve sitokinler de oluşumlarını artırır. Lipoksinler inflamasyonu bitirip doku onarımına katkıda bulunurlar.



Şekil 2.2. AA metabolizasyonu

2.5. Ağrının Tedavisi

Ağrı tedavisini narkotik ağrı kesiciler ve narkotik olmayan ağrı kesiciler (adjuvan analjezikler-NSAİİ) şeklinde iki grupta inceleyebiliriz.

Narkotik analjezikler (Opioidler)

Santral sinir sistemine güçlü etkileri olan yarı yapay ve yapay morfin/kodein benzeri ilaçlardır. Tesirlerini reseptörleri (mü, delta, kappa, sigma, epsilon) vasıtasıyla ortaya çıkarırlar. Çokça yinelenen terapötik miktarlarda tesirlerine mukabil tolerans oluşabilir. Kullanım süresinin uzaması kapsamında değişen nispetlerde bağımlılık oluşturma olasılıkları vardır. Antiinflamatuvar ve antipiretik özellikleri yoktur [72, 97].

Adjuvan analjezikler

Asıl endike olduğu yer ağrı değildir fakat kimi ağrılı hallerde ağrı tedavisi için kullanılan ilaçlardır. Genellikle opioid ve NSAİİ'lerin ağrı kesici tesirini çoğaltmak ya da advers tesirlerini azaltmak maksadıyla dozunda düşüş elde etmek maksadıyla değerlendirilirler. Kimi özgün ağrı çeşitlerinde (polinöropati, trigeminal nevralji gibi) birincil ağrı kesici şeklinde de kullanılabilirler [98, 99].

NSAİİ'lerin tarihi ve etki mekanizması

Doğal kaynaklardan elde edilen salisilik asit ve salisilatlar uzun zamandan beri ilaç olarak kullanılmaktadır. Salisilik asit, 1860'da kimyasal olarak sentezlendi ve bir antiseptik, bir antipiretik ve bir antiromatik olarak kullanıldı. Neredeyse 40 yıl sonra, aspirin tadı daha iyi bir salisilat formu olarak geliştirildi. Kısa bir süre sonra, aspirine benzer etkilere sahip olan diğer ilaçlar keşfedildi ve gruba "aspirin benzeri ilaçlar" adı verildi. NSAİİ'lerin etki mekanizmasının, PG biyosentezini inhibe ettiği yoluyla önerildi. O zamandan beri, bu ilaçların şu anda en az iki farklı izoformu olduğunu bildiğimiz siklo-oksijenaz enzimini (COX) inhibe ederek çalıştığı genel kabul görmüştür: yapısal izoform, COX-1 ve indüklenebilir izoformu, COX-2. COX-1 açık fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Aktivasyonu, örneğin, endotel tarafından salındığında antitrombojenik ve mide mukozası tarafından salındığında sitoprotektif olan prostasiklin üretimine yol açar. Sonra keşfedilen COX-2, diğer hücrelerde inflamatuvar uyaranlar ve sitokinler tarafından indüklenir. Bu nedenle, NSAİİ'lerin anti-inflamatuvar etkilerinin, COX-2'nin inhibisyonundan kaynaklandığını, mide iç zarının tahrişi gibi istenmeyen yan etkilerin, COX-1'in inhibisyonundan kaynaklandığını söylemek olasıdır. En yüksek COX-2 aktivitesine ve daha iyi bir COX-2: COX-1 aktivite oranına sahip olan ilaçlar, daha az avantajlı bir COX-2: COX-1 aktivite oranına sahip ilaçlardan daha az yan etki ile güçlü bir anti-inflamatuvar aktiviteye sahip olacaktır [100].

NSAİİ'ler, PG'lerin sentezi için hız sınırlayıcı enzim olan siklooksijenazı (COX) inhibe eder. COX'in inhibisyonu, NSAİİ'lerin yararlı anti-inflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkilerinin altında olmasına rağmen, gastrointestinal mukozada eşzamanlı COX inhibisyonu, sıklıkla ciddi sonuçlara neden olabilen gastrik ve intestinal ülserlerle sonuçlanır. Aslında, şu

anda Amerika Birleşik Devletleri'nde reçeteye satılan tüm COX inhibe edici NSAİİ'ler yaşamı tehdit eden gastrointestinal ülserler hakkında bir uyarı taşımaktadır [101].

COX'un yapısal izoformu COX-1, açık fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Aktivasyonu, örneğin, mide mukozası tarafından salındığında sitoprotektif olan prostasiklin üretimine yol açar. İndüklenebilir izoform, COX-2, 27 yıl önce keşfedildi ve pro-inflamatuvar uyarımlarla bir dizi hücrede indüklendi. Yaklaşık 1 yıl sonra, indüklenebilir bir COX, farklı bir gen tarafından COX-1.27, 28, 29, 30'a kodlanan ayrı bir COX izoformu olarak tanımlandı. Normalde hücrelerde çok düşük olan COX-2 seviyeleri, sitokinler, hücre içi haberciler ve substrat mevcudiyeti dahil olmak üzere bir dizi faktör tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir [100].

COX-2, yapısal ve diğer hücrelerde inflamatuvar uyarıcılar ve sitokinler tarafından indüklendiğinden, NSAİİ'lerin anti-inflamatuvar etkilerinin, COX-2'nin inhibisyonundan kaynaklandığını, oysa iritasyon gibi istenmeyen yan etkilerin olduğunu söylemek olasıdır. Mide iç yüzeyinin ve böbrek üzerindeki toksik etkileri, COX-1'in inhibe edilmesinden kaynaklanmaktadır.

Eikozanoidlerin temelini oluşturan AA hücre zarındaki fosfolipidlerden fosfolipazA₂ yoluyla ayrılır. NSAİİ'lerse inflamasyona vasıta olan COX yoluyla oluşan bileşiklerin oluşumunu azaltırlar (COX'u inhibe ederek). Antiinflamatuvar gücü daha fazla olan glukokortikoidlerse fosfolipaz A₂'yi inhibe ederek COX ile birlikte LOX ürünlerinin oluşumu da azaltır. COX enzimlerinden COX-1 bazı fizyolojik olgularda regülatör görevi görür. Prostanoidler (COX-1 sentezler) PG ve TX'ın fizyolojik etkilerinden sorumludur. COX-2 ise inflamasyonda salınır ve COX-2'nin inhibisyonu NSAİİ'lerin olması gerekli etkilerine neden olabilir. NSAİİ'lerin COX-1 ve COX-2 üstündeki seçicilikleri bir değildir ve çok değişiklikler gösterir. Seçici olmayanda COX-1 inhibisyonuna bağımlı istenmeyen tesirler meydana gelirken, seçici durdurmada inflamasyon istenmeyen tesirler olmaksızın baskılanabilir. COX-1 ve COX-2 formlarının AA üzerinden PG meydana getirme potensleri eşittir. Araştırmalar COX-2: COX-1 yüzdesi az ilaçların advers reaksiyon profillerinin başkalarına kıyasla az çıktığını göstermiştir [102].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

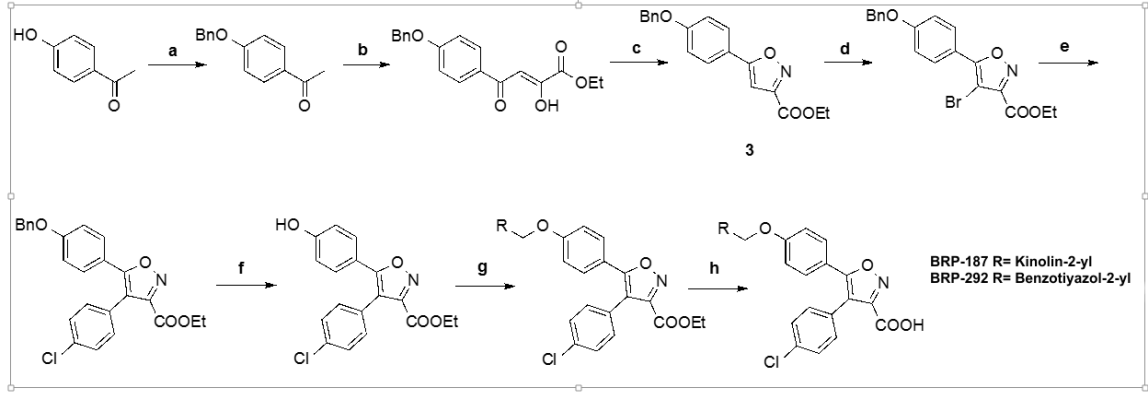
Deneyleerde kullanılan fareler ve deney protokolü için Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Komisyonundan 15/11/2016 tarih, E.137450 sayılı yazı ve 66332047-604.01.02 sayılı karar hayvanlarını korumaya tabi beynelminel etik kaideler rehberine uygun olacak şekilde barındırılmış ve izlenmiştir. Deney protokollerine aykırı herhangi bir işlem yapılmamıştır.

Deneyleerde, Ankara Kobay A.Ş. Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan alınan 26-35 g ağırlığındaki BALB/C albino erkek fareler kullanılmıştır. Fareler deneyden önce bir hafta süre ile standart laboratuvar koşullarına ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, 55 ± 5 bağıl nem) uygun olacak şekilde karantinaya alınmış ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda tutularak senkronize edilmiştir. Fareler kafeslerde standart pellet rejim ve çeşme suyu ile serbest şekilde beslenmişlerdir.

3.2. Kimyasal Maddeler

3.2.1. İzoksazol türevi bileşikler

Bu araştırma kapsamında farmakolojik aktivite ve yan etki araştırılması yapılan ve sırası ile BRP-187, BRP-292 olarak kodlanan izoksazol türevi bileşiklerin sentezi Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir [107]. Sentezlenen türevlerin kimyasal yapıları aşağıda şemada gösterilmiştir (Şekil 3.1). Kimyasal yapıları belirlenen bu bileşiklerin analjezik ve antiinflamatuvar etkinlikleri ile akut mide ülseri oluşturma potansiyelleri tez kapsamında araştırılmıştır.



(a) BnBr, K₂CO₃, MeCN; (b) (CO₂Et)₂, NaOEt, EtOH, rt; (c) NH₂OH-HCl, EtOH; (d) NBS, CAN, AcCN; (e) 4-klorofenilboronikasıit, Pd(PPh₃)₂Cl₂, NaHCO₃, H₂O, DMF; (f) Pd/C, H₂, MeOH:THF (1:1); (g) 2-(klorometil)kinolin veya 2-(klorometil)benzotiyazol, K₂CO₃, KI, MeCN; (h) LiOH, THF, H₂O.

Şekil 3.1. BRP-187 ve BRP-292 şeklinde isimlendirilen bileşiklerin sentez yolları

3.2.2. Diğer kimyasal maddeler

p-Benzokinon (p-BK) : (CAS: 106-51-4, Sigma, USA)

Serum fizyolojik (SF) : (%0,9 NaCl) (Haver, Türkiye)

Dimetil sülfoksit (DMSO) : (Sigma Aldrich, USA)

CG : (Carrageenan, λ, Tip IV, Santa Farma, İspanya)

İBU : (Sigma Aldrich, USA)

Distile su : Yerel

3.3. Araç ve Gereçler

Hassas terazi

Ultrasonik banyo

Vorteks

Kompas (mikrometre) 0,01 mm, (Ozaki Co., Japonya)

Hamilton Enjektör (50 µl)

Tek uçlu ve depolu otomatik pipetler

Pipet uçları

Zaman ölçer

Parafilm

Steril enjektör (1, 2, 5, 10 ve 20 ml)

İnsülin enjektörü

Balon joje (50 ml)

Erlen (50 ml)

Cam tüp (10 ml)

Plastik eldiven

Plastik tüp (10 ml)

Alüminyum folyo

Kıvrınma sayma kabı (2x5 bölmeli)

3.4. Deney Grupları ve Deney Protokolleri

3.4.1. Deney grupları

Deneylede toplam 84 adet Balb-C albino erkek fare kullanılmıştır. Rastgele seçilen farelerden antiinflamatuvar aktivite tayini için 9, analjezik aktivite tayini için 5 grup oluşturulmuştur.

Antiinflamatuvar etkinlik araştırma grupları

Her deney grubunda 6 adet olmak üzere fareler rastgele 9 gruba ayrılmıştır.

Grup 1: Kontrol (Serum Fizyolojik [SF]) grubu: Farelere CG enjeksiyonundan yarım saat önce subkutan SF (0,05 ml/10gram(g) fare) uygulanmıştır.

Grup 2: Çözücü (Dimetil sülfoksit [DMSO]) grubu; Farelere CG enjeksiyonundan yarım saat önce subkutan DMSO aynı volümde uygulanmıştır.

Grup 3: BRP-187 (10 mg) grubu: Farelere CG enjeksiyonundan yarım saat önce subkutan BRP-187 (10 mg/kg, s.c.) aynı volümde uygulanmıştır.

Grup 4: BRP-187 (30 mg) grubu: Farelere CG enjeksiyonundan yarım saat önce subkutan BRP-187 (30 mg/kg, s.c.) aynı volümde uygulanmıştır.

Grup 5: BRP-187 (100 mg) grubu: Farelere CG enjeksiyonundan yarım saat önce subkutan BRP-187 (100 mg/kg, s.c.) aynı volümde uygulanmıştır.

Grup 6: BRP-292 (10 mg) grubu: Farelere CG enjeksiyonundan yarım saat önce subkutan BRP-292 (10 mg/kg, s.c.) aynı volümde uygulanmıştır.

Grup 7: BRP-292 (30 mg) grubu: Farelere CG enjeksiyonundan yarım saat önce subkutan BRP-292 (30 mg/kg, s.c.) aynı volümde uygulanmıştır.

Grup 8: BRP-292 (100 mg) grubu: Farelere CG enjeksiyonundan yarım saat önce subkutan BRP-292 (100 mg/kg, s.c.) aynı volümde uygulanmıştır.

Grup 9: İbuprofen (İBU) grubu: Farelere CG enjeksiyonundan yarım saat önce subkutan İBU (100 mg/kg, s.c.) aynı volümde uygulanmıştır.

Analjezik etkinlik araştırma grupları

BRP-187 ve BRP-292 bileşiklerinin en yüksek antiinflamatuvar etkinlik gösterdikleri doz (her ikisi için de 100 mg/kg) analjezik aktivite testleri için seçilmiştir. Her bir deney grubunda rastgele seçilen 6 fare kullanılmıştır. Analjezik aktivite test grupları aşağıdaki gibidir.

Grup 10: Kontrol (SF) grubu: Farelere intraperitoneal aljezik madde (para benzokinon [p-BK], 2,5 mg/kg) uygulamasından yarım saat önce subkutan SF (0,05 ml/10g fare) uygulanmıştır.

Grup 11: Çözücü (DMSO) grubu; Farelere intra peritoneal aljezik madde (p-BK, 2,5 mg/kg) uygulamasından yarım saat önce subkutan DMSO aynı volümde uygulanmıştır.

Grup 12: BRP-187 (100 mg) grubu: Farelere intra peritoneal aljezik madde (p-BK, 2,5 mg/kg) uygulamasından yarım saat önce subkutan BRP-187 (100 mg/kg, s.c.) aynı volümde uygulanmıştır.

Grup 13: BRP-292 (100 mg) grubu: Farelere intra peritoneal aljezik madde (p-BK, 2,5 mg/kg) uygulamasından yarım saat önce subkutan BRP-292 (100 mg/kg, s.c.) aynı volümde uygulanmıştır.

Grup 14: İBU (100 mg) grubu: Farelere intra peritoneal aljezik madde (p-BK, 2,5 mg/kg) uygulamasından yarım saat önce subkutan İBU (100 mg/kg, s.c.) aynı volümde uygulanmıştır.

3.4.2. Antiinflamatuvar aktivite ölçüm protokolü

Antiinflamatuvar etkinliğin tespit edilebilmesi amacıyla literatürde kabul gören CG ile oluşturulan pençe ödemi ölçme yöntemi uygulanmıştır. Deney protokolü aşağıda verilmiştir.

Farelere; SF, DMSO, test bileşikleri ve referans madde İBU, gruplarda belirtilen dozlarda s.c. yoldan (0,05ml/10g fare) uygulanıp 30 dakika beklenmiştir. Daha sonra mikrometre (hassasiyeti 0,01 mm) ile sağ ve sol pençelerin kalınlıkları ölçülmüştür. Subplantar yoldan her farenin sağ arka pençesine CG (Tip-I λ , 0.48 mg/24 μ l/pençe, %2 a/h) enjeksiyonu yapılmıştır. Sol arka pençelerine ise volüm farkını çıkartmak üzere CG çözücüsü olan SF (24 μ l) verilmiştir. CG enjeksiyonundan itibaren 0, 90, 180, 270, 315 ve 360. dakikada pençelerdeki ödem hacmi mikrometre ile ölçülmüştür. Farelerin sağ ve sol pençe hacimlerinin farkı alınarak ortaya çıkan net ödem hacimleri hesaplanmıştır. Grup pençe ödemleri ortalamaları alınarak SD ve SH lar hesaplanmış ve gruplar arası fark karşılaştırılarak istatistiksel anlamlılıklar bulunmuştur. Her grubun ödem hacmindeki fark DMSO grubu ile mukayese edilmiştir.

Pençe ödemi üzerine test maddelerinin gösterdiği inhibitör etki antiinflamatuvar aktivite(% inhibisyon) olarak değerlendirilmiş ve bu yüzde değer aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(V_c - V_t) / V_c] \times 100$$

V_c : Kontrol (DMSO) grubunda ortalama ödem volümü

V_t : Tedavi alan grupta ortalama ödem volümü

Ödem volümü: Sağ pençe ödemi – Sol pençe ödemi

3.4.3. Analjezik aktivite ölçüm protokolü

Farelere SF içerisinde çözülen p-BK (2.5 mg/kg) intraperitoneal yoldan 0,05ml/10g beden ağırlığına karşılık gelecek şekilde verilerek aljezi oluşturulmuştur. Yapılan işlemler sırası ile aşağıda verilmiştir.

SF, DMSO, test bileşikleri ve İBU'nun gruplara verilmesinden yarım saat sonra farelere p-BK verilmiştir. p-BK uygulamasından sonraki ilk 3 dakika ve sonraki 15 dakika süresince kıvrınma sayıları kayıt altına alınmıştır. Kıvrınma hareketinin tespit edilebilmesine dair farelerde gözlenen bir takım hareketler şöyledir:

- i) Farelerin vücutlarını kasarak karınlarını iç bükey hale getirmesi
- ii) Konkav karınla bir yöne eğilmesi
- iii) Arka ayaklarında tek veya her iki yönlü tonik ve/veya klonik gerilme, sürüklenme ve toplanma yapmaları

Bu ağrıya verilen yanıtların hepsinin veya birinin rastlanması bir '+' kıvrınma şeklinde kabul edilmiştir. Kıvrınma sayısı üzerinde test moleküllerinin etkili olduğu kavram inhibitör etki % antinosiseptif veya % koruma aktivite olarak değerlendirilmiş ve bu yüzde değer aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

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

D (deney) : Madde ve p-BK uygulamasından sonra gözlenen ortalama kıvrınma sayısı.

K (kontrol) : SF ve p-BK uygulamasından sonra gözlenen ortalama kıvrınma sayısı.

3.4.4. Mortalite ve ülserojenik etkinlik ölçümü

Antiinflamatuvar etkinlik ölçümü deneylerinden sonra 48 saat zaman diliminde fareler mortalite ve akut toksik etki yönünden gözlenmişlerdir.

Analjezik etkinlik belirleme hedefiyle yapılan deneylerden 4 saat sonra ise fareler eter anestezisi yoluyla ötenaziye tabi tutulmuş, özefagus ve duodenumları birbirine bağlanarak mideleri çıkarılmıştır (1,5 ml ve %10 formalin ile fikse edilerek). Ardından ışık mikroskobu ile mide yüzeyleri taranmış ve peteşi var mı yok mu diye kontrol edilmiştir.

3.5. İstatistiksel Analiz

- a. Kontrol ve deney gruplarında ölçülen pençe ödemi miktarları ile kıvranma sayısı $\text{ortalama} \pm \text{ortalamaların standart hatası (SH)}$ şeklinde belirtilmiştir. Antiinflamatuvar aktivite (% inhibisyon) hesaplanmasında ve kıvranma sayılarının % antinosiseptif aktivite olarak hesaplanmasında her bir bireysel hayvan değeri, ortalama kontrol değerine bölünerek hesaplanmıştır. Sonuç olarak % koruma değeri dağılımın yaygınlık ölçüsü olarak, ortalamaların standart hatası cinsinden belirtilmiştir.
- b. Antiinflamatuvar aktivite değerinin istatistiksel anlamlılık testleri için çift yönlü ANOVA ve post-hoc karşılaştırmalarında Bonferroni'nin çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. $P < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.
- c. Kıvranma sayıları ve % antinosiseptif aktivite değerinin istatistiksel anlamlılık testleri için tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. Gruplar arası farklılık olduğunda (% antinosiseptif aktivitelerin karşılaştırılması) ve Barlett testi sonucu varyanslar homojen olduğunda, grupların post-hoc karşılaştırmalarında Student's Newman Keuls testi kullanılmıştır. $P < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tek ve çift yönlü varyans analizleri ve post-hoc testler, GraphPad PRISM Version 7.03 (1992-2017) paket programı yardımı ile çözümlenmiştir.

4. BULGULAR

Deneyde değerlendirilen izoksazol türevi iki bileşiğin (BRP-187 ve BRP-292) sentez şeması Şekil 3.1’de gösterilmiştir [107]. Yapılan farmakolojik testlerde sentezlenen maddelerin ve referans madde İBU’nun analjezik ve antiinflamatuvar aktiviteleri, ülserojenik etki gösterme durumları ve akut toksisiteleri (mortalite açısından) değerlendirilmiştir.

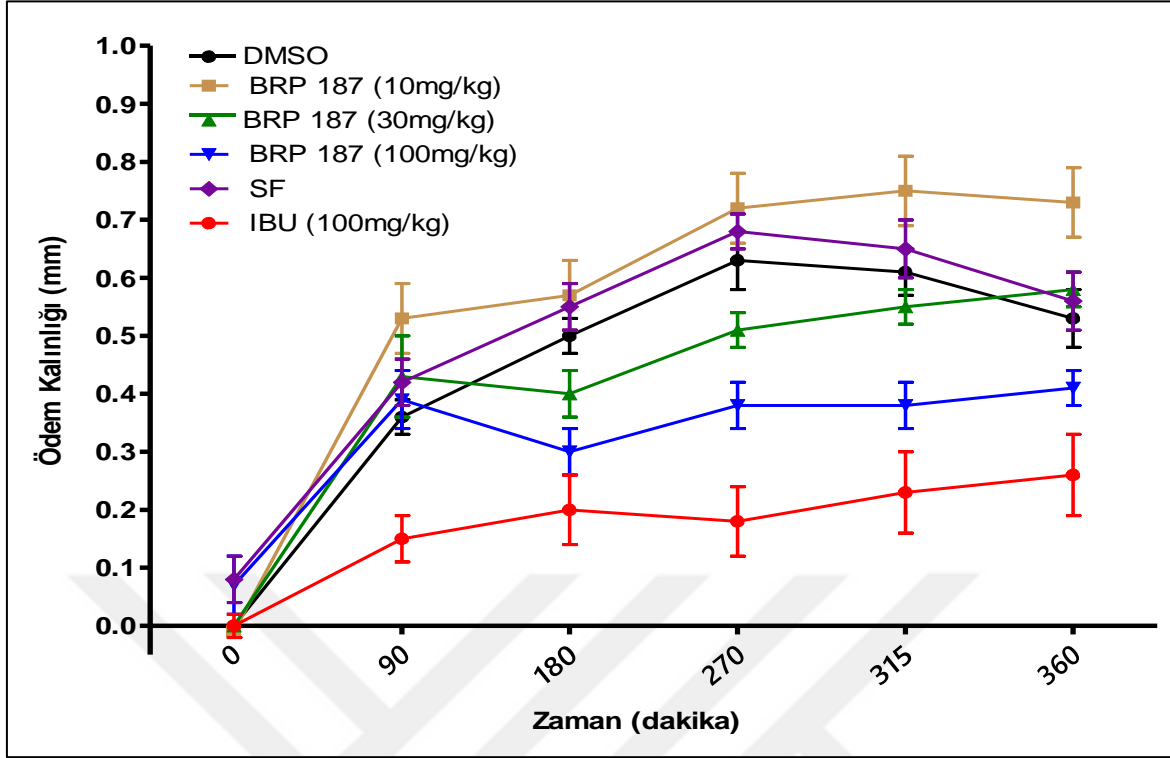
4.1. Deney Gruplarında Ortaya Çıkan Antiinflamatuvar Etkiler

Öncelikle deneylerde test maddelerinin çözücüsü olarak kullanılan DMSO’nun CG ile oluşturulan pençe ödemindeki olası etkisi incelenmiş ve kontrol (SF) grubu sonuçları arasında fark olup olmadığı incelenmiştir. CG’den yarım saat önce verilen DMSO ile yine aynı şekilde ve aynı hacimde enjekte edilen SF arasında pençe ödemi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu yüzden test maddeleri ve referans madde İBU için kontrol grubu olarak DMSO’nun kullanılmasının daha uygun olacağına karar verilmiştir.

4.1.1. BRP-187’nin pençe ödemi üzerine etkisinin zamanla değişimi

Kontrol (SF), DMSO, BRP-187 (10, 30, 100 mg/kg) ve İBU (100mg/kg) gruplarında elde edilen pençe ödem kalınlıkları 0, 90, 180, 270, 315 ve 360. dakikalarda ölçülerek ödem/zaman grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.1).

Pençe ödemi/zaman grafiğinde kontrol SF grubu verileri ile DMSO grubu verilerinin benzer profil oluşturması dikkat çekmiştir. Bu gruplar arasında tüm zaman dilimlerinde yapılan karşılaştırmalarda ödem volümleri arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Pençe ödemi/zaman grafiğinde CG ile oluşturulan maksimum ödemin 270. dakikada ortaya çıktığı gözlenmiştir. İnflamasyon sürecinin gösterilmesi özellikle CG ile elde edilen ödemin plato düzeyinin belirlenmesi açısından önemlidir. Elde edilen zaman grafiğinde plato düzeyinin LOX ve COX yolaklarının rol oynadığı faz olarak kabul edilen inflamasyonun II. Fazında (270 ve 315. Dakikalar) ortaya çıktığı gözlenmiştir. Ödem/zaman grafiği, test maddelerin antiödematöz etkilerinin karşılaştırılmasında hangi zaman diliminin kullanılabileceğini göstermiştir.

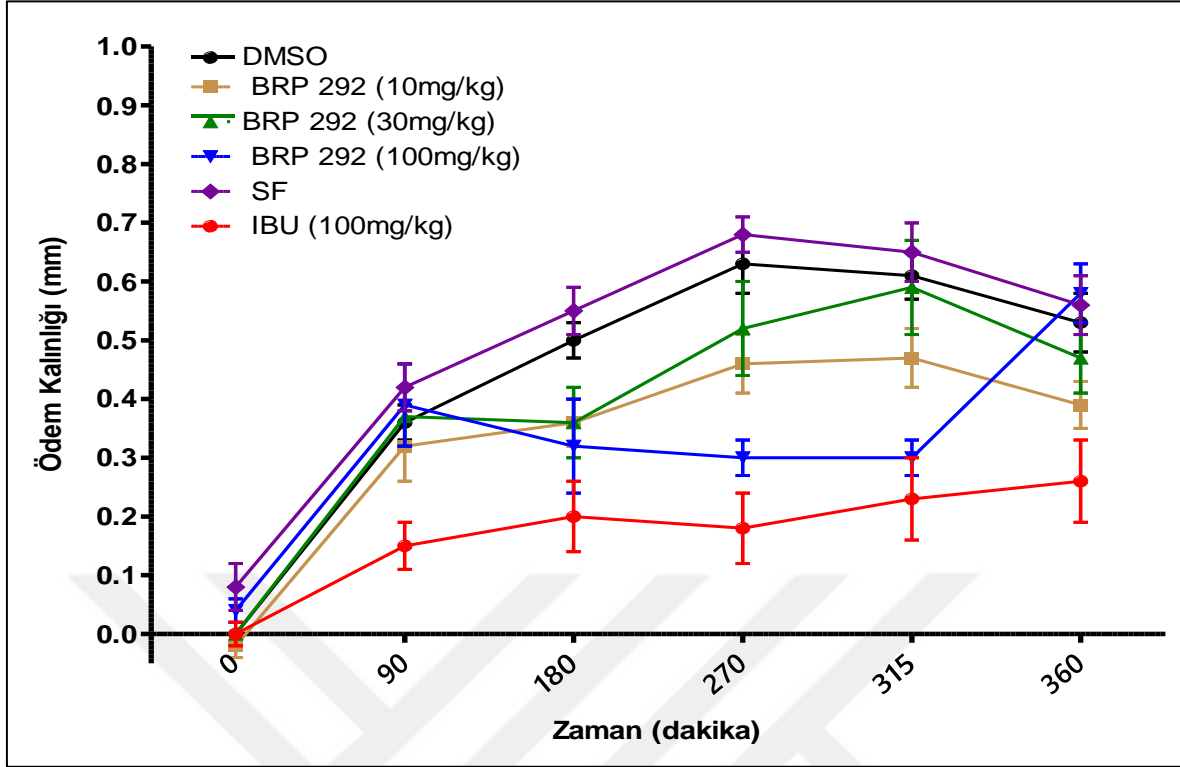


Şekil 4.1. Farede CG (Tip IV λ , 24 μ l/pençe, %2 a/h) ile oluşturulan pençe ödeminin BRP-187 ve İBU etkisine bağlı zamansal değişimi. Sonuçlar pençe kalınlıkları arasındaki farkların ortalamaları ve ortalamaların standart hatası şeklinde verilmiştir (Ortalama \pm SH, n=6). İBU (100 mg/kg), BRP-187 (10, 30 ve 100 mg/kg) ve aynı volümde saf DMSO (0,15 ml/30g) s.c. olarak CG'den 30 dakika önce verilmiştir.

4.1.2. BRP-292'nin pençe ödemi üzerine etkisinin zamanla değişimi

Kontrol (SF), DMSO, BRP-292 (10, 30, 100 mg/kg) ve İBU (100mg/kg) gruplarında elde edilen pençe ödem kalınlıkları 0, 90, 180, 270, 315 ve 360. dakikalarda ölçülerek ödem/zaman grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.2).

Elde edilen zaman grafiğinde özellikle inflamasyonun II. Fazında (270 ve 315. Dakikalar) BRP-292 100mg/kg ve İBU 100mg/kg ile elde edilen etki profili benzer olarak bulunmuştur.



Şekil 4.2. Farede CG (Tip IV λ , 24 μ l/pençe, %2 a/h) ile oluşturulan pençe ödeminin BRP-292 ve İBU etkisine bağlı zamansal değişimi. Sonuçlar pençe kalınlıkları arasındaki farkların ortalamaları ve ortalamaların standart hatası şeklinde verilmiştir (Ortalama \pm SH, n=6). İBU (100 mg/kg), BRP-292 (10, 30 ve 100 mg/kg) ve aynı volümde saf DMSO (0,15 ml/30g) s.c. olarak CG'den 30 dakika önce verilmiştir.

4.1.3. Test ve referans maddelerinin pençe ödemi üzerine antiinflamatuvar % inhibisyon değerleri

Her iki test maddesi için de CG enjeksiyonunun ardından 0, 90, 180, 270, 315 ve 360. dakikalarda meydana gelen ödemi ne derecede inhibe ettikleri (% inhibisyon değeri) ortalama ödem hacmi üzerinden hesaplanmıştır.

BRP-187'nin (100 mg/kg, s.c.) 180 ve 270. dakikalar arasında sırası ile % 40.4, 39.5 olarak en güçlü antiinflamatuvar etkinliğe sahip olduğunu fakat yine de bu aktivitenin % inhibisyon olarak İBU'dan az olduğunu (sırası ile % 60.3, 70.1) görmekteyiz (Bkz. Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. BRP-187 için antiinflamatuvar etkinlik (% inhibisyon)

	CG Enjeksiyonundan Sonra Geçen Zaman (Dakika)														
	90			180			270			315			360		
MADDE	Ort.	SH	%Inh	Ort.	SH	%Inh	Ort.	SH	%Inh	Ort.	SH	%Inh	Ort.	SH	%Inh
DMSO	0,36	0,03		0,50	0,03		0,63	0,05		0,61	0,04		0,53	0,05	
BRP 187 (10mg/kg)	0,53	0,06	-48,37	0,57	0,06	-13,25	0,72	0,06	-13,16	0,75	0,06	-24,52	0,73	0,06	-36,56
BRP 187 (30mg/kg)	0,43	0,07	-19,53	0,40	0,04	21,19	0,51	0,03	19,47	0,55	0,03	9,64	0,58	0,03	-8,44
BRP 187 (100mg/kg)	0,39	0,05	-9,30	0,30	0,04	40,40	0,38	0,04	39,47	0,38	0,04	36,64	0,41	0,03	24,06
IBU (100mg/kg)	0,15	0,04	58,14	0,20	0,06	60,26	0,18	0,06	71,05	0,23	0,06	61,43	0,26	0,07	51,56

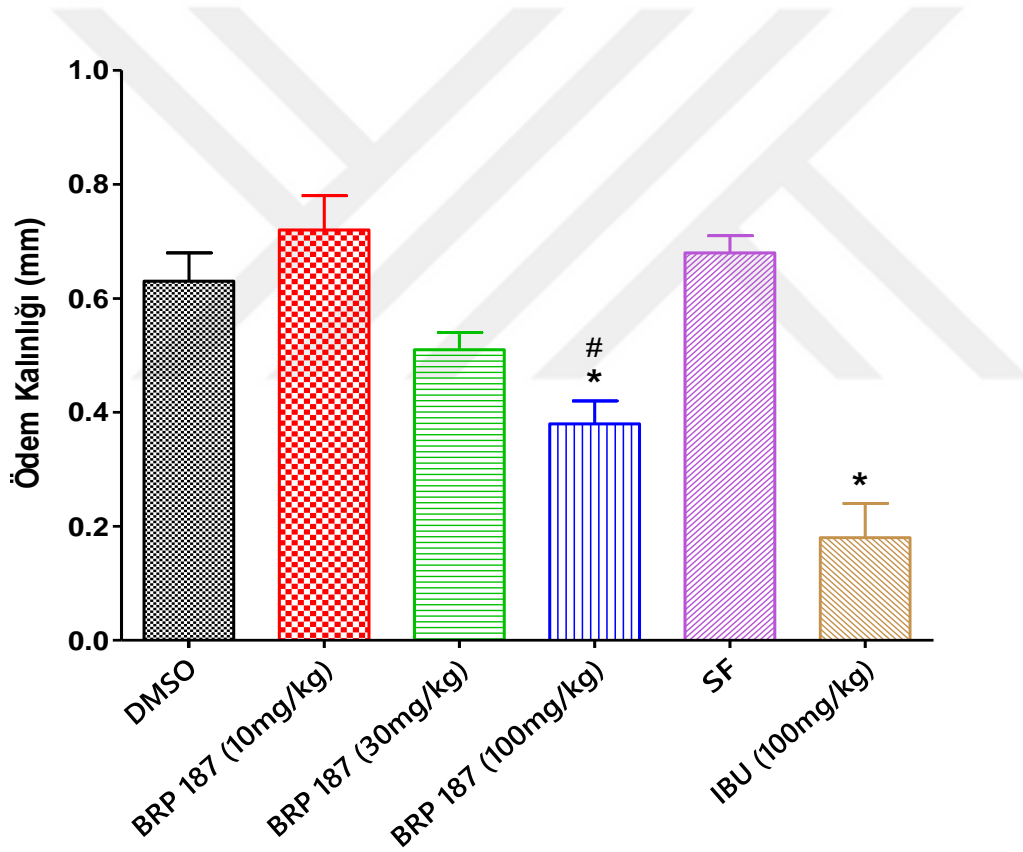
BRP-292'nin de (100 mg/kg, s.c.) 270. ve 315. dakikalar arasında en güçlü antiinflamatuvar etkinliğe sahip olduğunu fakat bu aktivitesinin % inhibisyon olarak İBU'dan az olduğunu görmekteyiz (Bkz. Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. BRP-292 için antiinflamatuvar etkinlik (% inhibisyon)

	CG Enjeksiyonundan Sonra Geçen Zaman (Dakika)														
	90			180			270			315			360		
MADDE	Ort.	SH	%Inh	Ort.	SH	%Inh	Ort.	SH	%Inh	Ort.	SH	%Inh	Ort.	SH	%Inh
DMSO	0,36	0,03		0,50	0,03		0,63	0,05		0,61	0,04		0,53	0,05	
BRP 292 (10mg/kg)	0,32	0,06	12,09	0,36	0,04	29,14	0,46	0,05	27,63	0,47	0,05	23,14	0,39	0,04	27,50
BRP 292 (30mg/kg)	0,37	0,05	-2,79	0,36	0,06	29,47	0,52	0,08	18,16	0,59	0,08	2,75	0,47	0,06	11,88
BRP 292 (100mg/kg)	0,39	0,07	-9,30	0,32	0,08	37,09	0,30	0,03	52,89	0,30	0,03	50,69	0,58	0,05	-9,37
IBU (100mg/kg)	0,15	0,04	58,14	0,20	0,06	60,26	0,18	0,06	71,05	0,23	0,06	61,43	0,26	0,07	51,56

4.1.4. Test ve referans maddelerinin CG uygulamasından 270 dakika sonra ortaya çıkan antiinflamatuvar etkileri

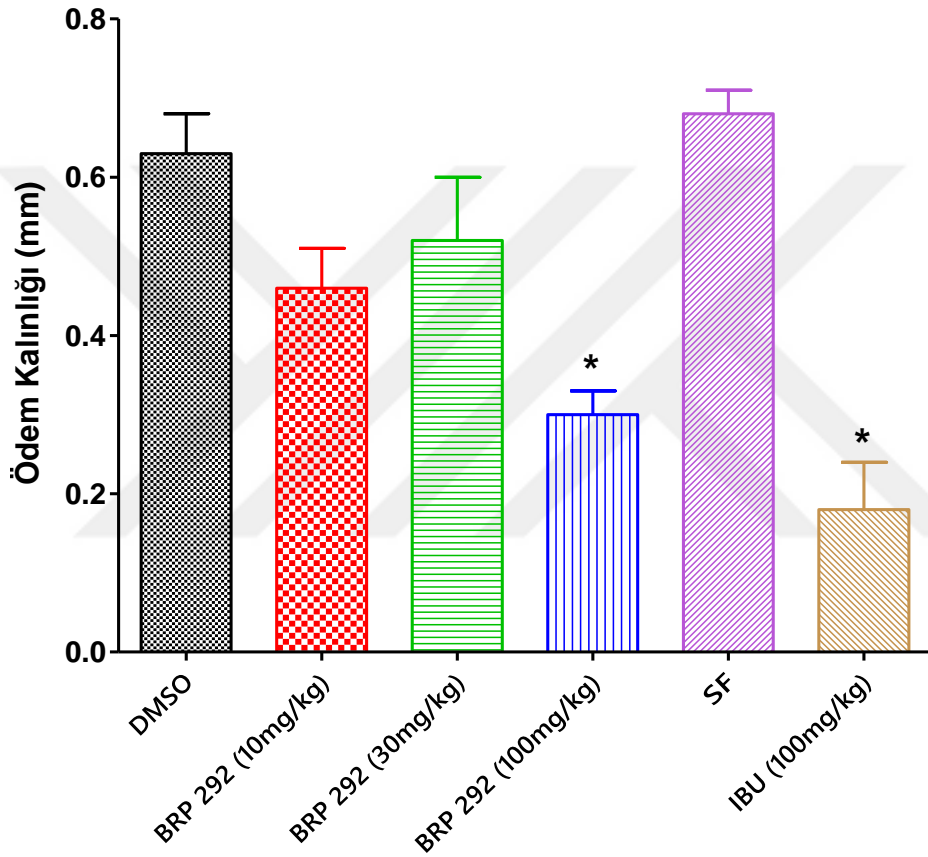
CG ile elde edilen ödemin plato yaptığı, COX ve LOX yolaklarının rol oynadığı faz olarak kabul edilen inflamasyonun II. fazında (270. Dakika); kontrol (SF), DMSO, BRP-187 (10, 30, 100mg/kg) ve İBU (100mg/kg) gruplarından elde edilen pençe ödem kalınlıkları Şekil 4.3'de verilmiştir. SF ve DMSO grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. BRP-187 100mg/kg ve İBU gruplarındaki ödem kalınlığı kontrol ve çözücü gruplarından anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Ayrıca BRP-187 100mg/kg fare pençe ödemi 270. dakikada istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe etmiştir.



Şekil 4.3. CG uygulamasından sonra 270. dakikada elde edilen pençe ödem kalınlıkları. Farelerde CG ile oluşturulan pençe ödemi testinde elde edilen pençe ödem kalınlıkları (Ortalama±SH, n=6). *Kontrol (DMSO) grubu ile farklı (İBU için $p<0,0001$; BRP-187 için $p<0,05$), #İBU'dan farklı ($p<0,05$).

CG ile elde edilen ödemin II. fazında (270. Dakika); kontrol (SF), DMSO, BRP-292 (10, 30, 100mg/kg) ve İBU (100mg/kg) gruplarından elde edilen pençe ödem kalınlıkları Şekil 4.4'de verilmiştir.

SF ve DMSO grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. BRP-292 100mg/kg ve İBU gruplarındaki ödem kalınlığı kontrol ve çözücü gruplarından anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Ayrıca BRP-292 100mg/kg fare pençe ödemi 270. dakikada istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe etmiştir. BRP-292'nin 100mg/kg dozda gösterdiği antiinflamatuvar aktivite ile İBU'nun antiinflamatuvar etkisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.



Şekil 4.4. CG uygulamasından sonra 270. dakikada elde edilen pençe ödem kalınlıkları. Farelerde CG ile oluşturulan pençe ödemi testinde elde edilen pençe ödem kalınlıkları (Ortalama±SH, n=6). *Kontrol (DMSO) grubu ile farklı (p<0.05).

4.2. Deneyde Kullanılan Maddelerin Farelerde Kıvrınma Sayıları Üzerine Etkisi

4.2.1. SF, DMSO ve İBU gruplarında elde edilen kıvrınma sayıları

p-BK verilmeden 30 dakika önce, kontrol grubu olarak SF 0.15 ml/30 g fare olacak şekilde s.c. uygulanmıştır. SF grubundaki farelere p-BK (2.5 mg/kg, i.p.) verildikten 3 dakika sonra

başlayarak 15 dakika boyunca gözlem yapıldığında kıvranma sayıları 19.3 ± 1.8 ($n=6$) olarak kaydedilmiştir (Bkz. Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2).

Test maddelerinin çözücüsünün DMSO olması nedeniyle DMSO'nun anlamlı bir antinosiseptif aktivitesinin olup olmadığı incelenmiştir. Aynı test maddeleri gibi p-BK (2.5 mg/kg, i.p.) uygulanmadan 30 dakika önce 0.15 ml/30g fare şeklinde DMSO subkutan yoldan enjekte edilmiş ve 15 dakika süresince ortalama kıvranma sayısı 18.00 ± 1.7 ($n=6$) olarak bulunmuştur. DMSO ile SF arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu nedenle BRP-187 ve BRP-292'nin antinosiseptif aktivite gözlemlenmesinde kontrol grubu olarak ele alınmıştır (Bkz. Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2).

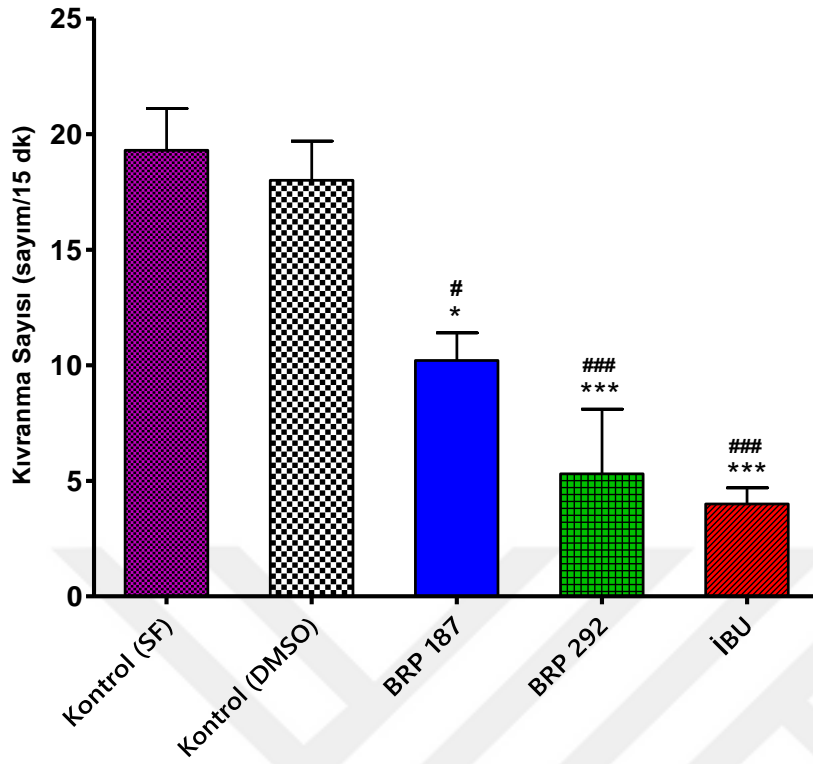
İBU, referans madde olarak p-BK enjeksiyonundan yarım saat önce 0,15 ml/30g fare şeklinde subkutan yolla 100mg/kg olarak verilmiştir. 15 dakika boyunca kıvranma sayıları gözlenmiş olup tüm deneylerdeki en düşük sayı olan 4.00 ± 0.7 ($n=6$) değeri bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2).

4.2.2. BRP-187'nin antinosiseptif etkinliği

BRP-187 p-BK enjeksiyonundan yarım saat önce 0,15 ml/30g fare şeklinde subkutan yolla aynı referans madde İBU gibi 100mg/kg olarak enjekte edilmiştir. 15 dakika boyunca gözlemlenen kıvranma sayıları 10.2 ± 1.2 ($n=6$) olarak bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.2, Çizelge 4.2).

4.2.3. BRP-292'nin antinosiseptif etkinliği

BRP-292 p-BK enjeksiyonundan yarım saat önce 0,15 ml/30g fare şeklinde subkutan yolla aynı referans madde İBU gibi 100mg/kg olarak enjekte edilmiştir. 15 dakika boyunca gözlemlendiğinde kıvranma sayıları 5.3 ± 2.8 ($n=6$) olarak bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.2, Çizelge 4.2).



Şekil 4.5. Farelerde p-BK ile oluşturulan abdominal kıvrınma aljezi yönteminde elde edilen kıvrınma sayıları (Ortalama±SH, n=6), *Kontrol (SF) grubu ile farklı, #Kontrol (DMSO) ile farklı (p<0,05).

BRP-187 ve BRP-292 enjekte edilen gruplarda kıvrınma sayıları kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az bulunmuştur (p<0,05). BRP-187 için antinosiseptif aktivite %44,4±9,1 (n=6) ve BRP-292 için antinosiseptif aktivite %70,4±15,4 (n=6) olarak hesaplanmıştır (Bkz. Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Farelerde p-BK ile oluşturulan abdominal kıvranma aljezi yöntemi ile kontrol, test maddeleri ve referans madde gruplarında elde edilen kıvranma sayıları (Ortalama±SH, n=6) ve antinosiseptif aktivite (% inhibisyon)

Madde	Kıvranma sayıları			% İnhibisyon		
	Ort.	SH	N	Ort.	SH	N
Kontrol (SF)	19,3	1,8	6	-	-	6
Kontrol (DMSO)	18,0	1,7	6	-	-	6
BRP-187	10,2	1,2	6	44,4	9,1	6
BRP-292	5,3	2,8	6	70,4	15,4	6
İBU	4,0	0,7	6	77,8	3,8	6

4.3. Deneyde Kullanılan Maddelerin Fareler Üzerine Akut Toksisitesinin Değerlendirmesi

Antiinflamatuvar aktivite tayin deneylerine giren tüm farelerde 48 saat içerisinde mortalite olup olmadığı incelenmiştir. BRP-187, BRP-292, DMSO ve İBU enjekte edilen hiçbir farede ölüm gözlenmemiştir. Dolayısıyla bu maddelerin herhangi birinin ölüme sebebiyet verecek akut bir tesirinin olmadığı yargısına varılmıştır.

4.4. Deneyde Kullanılan Maddelerin Ülserojenik Aktivite Değerlendirmesi

Analjezi deneylerinin tamamlanmasının ardından 4 saat sonra eter anestezisi yöntemiyle fareler ötenaziye tabi tutulmuştur. Ötenazi işlemi sonrası farelerin özefagus ve duodenumları bağlanarak, mideleri 1,5 ml % 10 formalin ile fikse edilerek çıkartılmıştır. Farelerin mideleri ışık mikroskobu altında kanama odağı (peteşi) oluşumu açısından incelenmiştir. İBU'nun uygulandığı gruplardaki farelerde ülserojenik faaliyet gözlenmiş, fakat BRP-187 ve BRP-292 için herhangi bir ülserojenik etki görülmemiştir. Ülserojenik etki ise BRP-187 ve BRP-292 için 0, İBU için +2 olarak tespit edilmiştir.



5. TARTIŞMA

Romotoid artirit gibi kronik inflamatuvar hastalıkların tüm dünyada milyonlarca kişiyi etkilediği ve yaşam kalitelerini düşürdüğü bilinmektedir. Etkili ve güvenli bir tedavisinin henüz tam olarak sağlanamaması iş gücü kaybı ve farmakoekonomik boyutu inflamatuvar hastalıkların önemini artırmaktadır. Bu hastalıkların en önemli semptomlarından biri de ağrıdır. Ağrı önemli bir patoloji belirtisi olmasının yanında son derece rahatsız edici bir semptomdur ve tedavisi zorunludur. Ancak henüz optimum ağrı ve inflamasyon tedavisi mevcut farmakolojik ajanlarla sağlanamamıştır. NSAİİ'ler en sık kullanılan antiinflamatuvar analjezikleridir. Oldukça yararlı etkilerinin yanında istenmeyen etkileri ve mide kanaması gibi komplikasyonları da söz konusudur. Özellikle kronik hastalıklarda çok uzun süre NSAİİ'ler kullanılması, yarı ömürlerinin kısa olması analjezik gastroenteropatilerine neden olmaktadır. Hastaların bu ilaçları endikasyon dışı, bilinçsiz ve aşırı kullanmaları sorunların artmasına neden olmaktadır [103]. Daha etkili ve daha az yan etki profiline sahip güvenliliği kanıtlanmış yeni ilaçlara ihtiyaç olması bu konu üzerinde yapılan araştırmaların hızla devam etmelerinin nedenlerindedir. Bu tez kapsamında yaptığımız araştırmanın temeli de buna dayanmaktadır.

NSAİİ'lerin pekçoğunda bulunan serbest karboksilik grubun neden olduğu lokal iritasyonla birlikte mide ve barsaklarda mukoza koruyucu etkileri olan prostaglandin (PG) sentezini bloke etmelerine bağlıdır. İnflamatuvar süreçte lökositlerin aktive olması ile membran fosfolipitlerinden fosfolipaz A₂ enzimi aracılığıyla arakidonik asit (AA) oluşur. AA'dan COX ve özellikle 5-LOX enzimleri ile proinflamatuvar PG ve LT'ler sentezlenir. İnflamasyon sürecinde 5-LOX'un aktivasyonu için nükleer zarın içindeki bütünleyici bir protein olan 5-Lipoxygenase-activating protein (FLAP) ile 5-LOX kompleks oluşturur. FLAP solunum ve kardiyovasküler hastalıklarda yer alan inflamasyonun lipid mediatörleri olan LT sentezinde gereklidir. FLAP, 5-LOX için bir membran ankrajı ve bir amin asit bağlama proteini olarak işlev görür. FLAP'ın 5-lipoksijenazı nasıl aktive ettiği tam olarak anlaşılamamıştır [104].

Bizim çalışmamızda; inflamatuvar LT sentezini engellemek amacı ile 5-LOX ile FLAP etkileşimini bozan ve antiinflamatuvar analjezik etkili olması muhtemel bileşiklerin sentezi Farmasötik Kimya Anabilim dalımızda sentezlenmiş izoksazol türevi olan BRP-187 ve BRP-292 kodlu maddeler kullanılmıştır. İzoksazol halkası insektisidal, antibakteriyel,

antibiyotik, anti-tümör, antifungal, antikanser etkileri gösterilmiş heterosiklik gruptur. İzoksazol türevleri COX-2 inhibitörü olarak kullanılan ilaç hammaddeleri arasındadır.

Ulrike Garscha ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; farmasötik kimya öğretim üyelerimiz tarafından sentezlenen izoksazol türevi BRP-187 kodlu bileşiğinin *in-vitro* etkileri araştırılmış ve BRP-187'nin LT biyosentez inhibitörü olduğu ve 5-LO nükleer yeniden dağılımını bloke etmeden insan lökositlerinin nükleer zarında 5-LO/FLAP etkileşimini önlediği gösterilmiştir. *In vivo* olarak, BRP-187 (10 mg / kg), zimosan ile indüklenen murin peritonitinde, peritoneal eksüdalardaki LT seviyelerini, ayrıca vasküler geçirgenliği ve nötrofil infiltrasyonunu baskılayarak, önemli bir etkinlik sergilemiştir. Ayrıca BRP-187'nin insan monositlerinde ve polimorfonükleer lökositlerde 5-LO ürün oluşumunu inhibe ettiği de gösterilmiştir [105].

Bu tez kapsamında *in-vitro* aktiviteleri bilinen izoksazol türevi BRP-187 ve BRP-292 kodlu iki bileşiğin fareler üzerinde antiinflamatuvar ve analjezik özellikleri incelenmiştir. Deneyleerde kullanılan farelerde mortalite görülüp görülmediği ve maddelerin ülserojenik eğilim gösterip göstermediği de araştırılmıştır.

Test maddelerimiz BRP-187 ve BRP-292'nin sudaki çözünürlüklerinin fazla olmaması nedeni ile deneylerimizde solvent madde olarak DMSO kullanılmasına karar verilmiştir. DMSO'nun olası analjezik veya antiinflamatuvar etkisini değerlendirmek amacı ile kontrol (SF) grubu ile karşılaştırılmıştır. DMSO'nun abdominal kıvrınma testinde ortaya çıkan etki ve pençe ödemi testinde oluşturduğu ödem kalınlığı SF (%0,9) ile karşılaştırıldığında DMSO ile SF grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Her iki maddenin de benzer etki profiline sahip olduğu gözlenmiştir.

Test maddelerinin antiinflamatuvar ve analjezik etkinlik belirleme yöntemlerinde ise referans madde olarak İBU seçilmiştir. İBU selektif olmayan COX inhibisyonu yoluyla antiinflamatuvar aktivitesi olduğu bilinen bir maddedir. Dünyada da ibuprofen en fazla reçetelendirilen NSAİİ'lerden biridir. Fakat sık görülen gastrointestinal sistem etkileri, bulantı ve istifra etme gibi yan etkileri olan bir moleküldür.

Deneylelerimizde BALB/c fareler ilk olarak antiinflamatuvar etkinliklerinin tespiti için 9 gruba ayrılarak deneye alınmışlardır. Antiinflamatuvar etkinlik tayini için en bilinen

yöntemlerden biri olan pençe/ödem testi kullanılmıştır. Pençelerde ödem oluşturması için kullanılan madde CG'dir. Fare pençelerine CG verilmeden yarım saat önce BRP-187 ve BRP-292'nin üç farklı dozu (10 mg/kg, 30 mg/kg ve 100 mg/kg) subkutan yoldan enjekte edilmiştir. İBU'nun ise 100 mg/kg'lık dozu subkutan kullanılmıştır. Deneydeki farelerin sağ pençelerine %2'lik CG solüsyonu verilmiş, CG'nin solventi olan SF'in ödem yapıp yapmadığını anlamak için eş miktardaki SF farelerin sol pençesine enjekte edilmiştir. Sağ ve sol pençeler arasındaki hacim mikrometre ile ölçülmüştür.

Antiinflamatuvar aktivite tayininde kullanılan CG ile oluşturulan pençe ödemi yönteminde ortaya çıkan inflamasyonun iki fazı bulunur. Erken fazda (90-180. dakika) histamin, serotonin gibi otokoidler rol alır. İnflamasyonun geç fazı (270-360. dakika) ise prostaglandinler, proteazlar ve lizozomlar gibi kinin benzeri maddeler ile ilişkilidir [106]. NSAİİ'ler inflamasyonun geç fazında etkili olurlar. İnflamasyon sürecinin erken ve geç fazını gözlemlemek ve CG'nin maksimum ödem miktarını belirlemek için CG enjeksiyonundan sonra 0, 90, 180, 270, 315, 360. Dakikalarda pençeler ölçülmüş değerler kaydedilmiştir. İBU ve izoksazol türevi bileşiklerimizin 270. dakikada en etkin olduğu gözlenmiştir. Test ve referans maddelerinin pençe ödemi üzerine 270. dakikada % inhibisyon değerleri; İBU: %71.05, BRP-187: 100 mg/kg doz için 39.47, 30 mg/kg doz için 19.47 ve 10 mg/kg doz içinse -13.16'dir. BRP-187'nin hem 10mg hem de 30 mg'lık dozları için antiinflamatuvar etkinlik düşük çıkmış ve üstelik hem bu iki doz arasındaki fark hem de 10 mg'lık dozun etkinliği anlamlı olarak değerlendirilmemiştir. 100 mg'lık doz içinse aktivite değeri İBU'ya biraz daha yakın olarak gözlenmiştir. BRP-292 için % inhibisyon değerleri 100 mg/kg doz için (53.89), 30 mg/kg doz için (18.16) ve 10 mg/kg doz içinse (27.63) olarak bulunmuştur. BRP-187'ye nazaran BRP-292'nin antiinflamatuvar aktivitesi İBU'ya daha yakın bulunmuştur. Her iki maddenin 30 mg/kg'lık dozlarının aktivite profilleri benzer olmasa da antiinflamatuvar etkinlik değerleri birbirine çok yakın bulunmuştur.

Analjezi deneyi yapılırken ise abdominal kıvrınma metodu seçilmiştir. İritan ve ağrı oluşturucu özelliğe sahip p-BK intraperitoneal yoldan uygulanmıştır. İBU, BRP-187 ve BRP-292'nin 100mg/kg'lık dozları en fazla antiinflamatuvar etkinlik gösterdikleri doz olduğu için analjezi deneylerinde tercih edilmiştir. Test maddeleri p-BK enjeksiyonundan yarım saat önce farelere subkutan yoldan verilmiştir. BRP-187 için antinosiseptif etkinlik değeri %inhibisyon: 44.4, BRP-292 için: %70.4 ve İBU için ise %77.8 bulunmuştur.

Analjezik etki bakımından İBU'ya çok yakın etki gösteren BRP-292'nin BRP-187'ye kıyasla daha güçlü bir ağrı kesici karakteristiğine sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Tüm deneyler bittikten sonra eter anestezisi metoduyla ötenazi yapılan farelerin midelerinde peteşi kontrolü yapılmıştır. Her iki test maddesinin uygulandığı farelerde herhangi bir ülserli durum izlenmemiş fakat İBU enjekte edilen 6 farenin 2'sinde ülserojenik etkinlik görülmüştür. Bu bakımdan her iki maddenin de İBU'ya nazaran gastrik ülserojenik etki oluşturmaması açısından daha yararlı olabileceği tespit edilmiştir.

Akut toksisite bakımından incelendiğinde ise BRP-187, BRP-292 ya da İBU'nun uygulandığı hiçbir farede mortalite izlenmemiştir.

Çalışmamızda hem BRP-187 hem de BRP-292'nin İBU ile karşılaştırıldığında kabul edilebilir düzeyde antiinflamatuvar etkinliğinin olduğu tespit edilmiştir. Özellikle BRP-292 bu açıdan çok daha yakın ve anlamlı bir sonuç vermiştir. Advers tesir açısından ise ülserojenik etkinlik olmaması nedeniyle yine BRP-292'nin işlenilmeye, geliştirilmeye degecek bir molekül olduğunu işaret etmiştir. BRP-187 ve BRP-292'nin daha yüksek dozlardaki aktivitesinin gösterilmesi için başka deneylerin yapılması da ön görülmektedir. Ek olarak akut, kronik toksisite testlerinin yapılması, BRP-187 ve BRP-292'nin karakteristiğinin aydınlığa kavuşturulması açısından kaynaklara destek verecektir diye düşünülmektedir.

BRP-292, referans madde ile kıyaslanabilir ve istatistiksel olarak anlamlı analjezik/antiinflamatuvar aktiviteye sahip olması ve ülserojenik aktivite göstermemesi bu madde ile ilgili ileri araştırmalar yapılmaya ve geliştirilmeye değer olduğu anlaşılmaktadır. Yapılacak yeni çalışmalarla BRP-187 ve BRP-292'nin; NSAİİ'ler ile gözlenen yan etkiler ve daha yüksek dozlarda farmakolojik aktivite bakımından araştırılması ayrıca akut, kronik ve bazı özel (teratojenite, karsinojenite, mutajenite vb.) toksisite testlerinin yürütülmesi planlanmaktadır. İleri araştırmalarla birlikte ilaç adayı olabileceği düşünülen BRP-187 ve BRP-292'nin farmakolojik ve toksikolojik profilinin kapsamlı bir şekilde ortaya konması, düşük yan etkiye ve yüksek farmakolojik aktiviteye sahip yeni kimyasal bileşikler sentezlenmesi için bir model olması bakımından önemlidir.

6. SONUÇ

NSAİİ'lerin advers tesirlerinin çokluğu nedeni ile tesir gücü yüksek ve daha az yan etkili ilaç geliştirme çabaları halen sürmektedir. Antiinflamatuvar ve analjezik özelliği bilinen izoksazol molekülünden hareketle, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı tarafından sentezlenen BRP-187 ve BRP-292 kodlu iki izoksazol türevi bileşiğin etki mekanizmaları/etkinlikleri *in-vitro* olarak araştırılmıştır.

Bu tez kapsamında, BRP-187 ve BRP-292 kodlu iki izoksazol türevi bileşiğinin analjezik ve antiinflamatuvar etkileri ile akut toksisiteleri, midede ülserojenik aktivitelerinin olup olmadığı farelerde araştırılmıştır. Bunun için antiinflamatuvar aktivite CG ile indüklenen pençe ödemi testi ve analjezik aktivitesi p-benzokinon ile oluşturulan kıvrınma testi ile incelenmiştir. Ülserojenik etkinlik testi eter anestezisi ile öldürülen farelerin midelerinin çıkarılıp mikroskopla peteşi sayarak yapılmıştır. Referans madde olarak tüm dünyada çok yaygın şekilde kullanılan ibuprofen alınmış ve izoksazol türevi bu iki maddenin analjezik ve antiinflamatuvar etkinlikleri kıyaslanmıştır.

Çalışma sonuçlarına göre BRP-187'nin daha az olmak üzere her iki test maddesinin de hem antiinflamatuvar hem de analjezik aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur. Referans madde İBU'ya göre bu etkinlikler karşılaştırıldığında BRP-292'nin p-BK ile yapılan kıvrınma testinde İBU kadar güçlü analjezik karaktere sahip olduğu izlenmiştir. Aynı zamanda her iki test maddesinin herhangi bir mortaliteye neden olacak akut toksisitesinin olmadığı ve midede kanama odağı oluşturmadığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak özellikle farelerde yapılan pençe ödem testinde antiinflamatuvar etkinliği daha fazla olan BRP-292'nin İBU kadar güçlü analjezik karakteristiğiyle iyi bir ilaç adayı olarak düşünülebileği anlaşılmıştır.



KAYNAKLAR

1. Fish, R., Danneman, P. J., Brown, M., & Karas, A. (Editörler). (2011). *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. London: Academic press.
2. Kuru, T., Yeldan, İ., Zengin, A., Kostanoğlu, A., Tekeoğlu, A., Akbaba, Y. A., & Tarakçı, D. (2011). Erişkinlerde ağrı ve farklı ağrı tedavilerinin prevalansı. *Ağrı*, 23(1), 22-7.
3. Özveren, H. (2011). Ağrı kontrolünde farmakolojik olmayan yöntemler. *Hacettepe Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi*, 18(1), 83-92.
4. Şahin, Y. N., Demircan, B., Süleyman, H., Aksoy, H., & Gül, H. İ. (2010). The effects of 3-benzoyl-1-methyl-4-phenyl-4 piperidinolhydrochloride (C1), indomethacin, nimesulide and rofecoxib on cyclooxygenase activities in carrageenan-induced paw edema model. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 40(5), 723-728.
5. Rao, P., & Knaus, E. E. (2008). Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 81-110.
6. Moore, R. A., Derry, S., Phillips, C. J., & McQuay, H. J. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), cyclooxygenase-2 selective inhibitors (coxibs) and gastrointestinal harm: review of clinical trials and clinical practice. *BMC musculoskeletal disorders*, 7(1), 79.
7. Merskey, H. (1979). Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain*, 6, 249-252.
8. Aydın, O. N. (2002). Ağrı ve ağrı mekanizmalarına güncel bakış. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 3(2), 37 – 48.
9. Türkan, E. (2013). *Kronik Ağrı Hastalarında Mizaç Özelliklerinin Ağrı Tedavisi Yanıtına Etkisi*. Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Gaziantep, 1-11.
10. Alkan İ., Baydaş, B. (2001). Ağrı ve Postoperatif Analjezi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 14(1), 87-90.
11. Serpell, M. (Editörler). (2008). *Handbook of pain management*. London: Springer Healthcare Limited, 3.
12. Dinçer, S., Erdine, S. (2013). Ağrı. M. Emre (Editör). *Nöroloji Temel Kitabı*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri.
13. Thienhaus, O., Cole, R. K. (2001). The classification of pain. *Pain management: A Practical Guide for Clinicians*. United States of America: CRC Press, 27-36.
14. Velioğlu S. (2017). Ağrı Anatomisi: Ağrı Yolakları, Beyin Sapı ve Beyin. *Türkiye Klinikleri Nöroloji Özel Dergisi*; 10(4),329-34.

15. Akçal Zengin, Z. (2008). *Ratlarda tramadol ve nitrik Oksitin akut inflamatuvar ağrı üzerine etkileri*, Uzmanlık Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aydın, 8.
16. Erdine, S. (2000). *Ağrı mekanizmaları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 20-29.
17. Kettner, N. W. (2008). The functional neuroanatomy of pain perception. *Integrative Pain Medicine: The Science and Practice of Complementary and Alternative Medicine in Pain Management*. Totowa, NJ: Humana Press, 63-84.
18. Schaible, H. G. (2007). Peripheral and central mechanisms of pain generation. In C. Stein (Editörler.), *Analgesia*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 3-28.
19. Yağcı, Ü., & Saygı n, M. (2019). Ağrı Fizyopatolojisi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(2), 209-220.
20. Attal, N. (2000). Chronic neuropathic pain: Mechanisms and treatment. *The Clinical Journal of Pain*, 16(3 Suppl), S118-30.
21. Beydoun, A., & Backonja, M. M. (2003). Mechanistic stratification of antineuralgic agents. *Journal of Pain and Symptom Management*, 25(5), S18-S30.
22. Siddall, P. J., & Cousins, M. J. (1997). Spinal pain mechanisms. *Spine*, 22(1), 98-104.
23. Xiao, W. H., & Bennett, G. J. (1995). Synthetic omega-conopeptides applied to the site of nerve injury suppress neuropathic pains in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 274(2), 666-672.
24. Nicholson, B. (2000). Gabapentin use in neuropathic pain syndromes. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 5(4), 245-245.
25. Bridges, D., Thompson, S. W. N., & Rice, A. S. C. (2001). Mechanisms of neuropathic pain. *British Journal of Anaesthesia*, 87(1), 12-26.
26. Pasero, C. (2004). Pathophysiology of neuropathic pain. *Pain Management Nursing*, 5, 3-8.
27. Woolf, C. J. (1994). A new strategy for the treatment of inflammatory pain. *Drugs*, 47(5), 1-9.
28. Thompson, S. W. N., King, A. E., & Woolf, C. J. (1990). Activity-dependent changes in rat ventral horn neurons in vitro; summation of prolonged afferent evoked postsynaptic depolarizations produce a d-2-amino-5-phosphonovaleric acid sensitive windup. *European Journal of Neuroscience*, 2(7), 638-649.
29. Schwartzman, R. J., Grothusen, J., Kiefer, T. R., & Rohr, P. (2001). Neuropathic central pain: epidemiology, etiology, and treatment options. *Archives of Neurology*, 58(10), 1547-1550.
30. Willis, W. D., & Westlund, K. N. (1997). Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 14(1), 2-31.

31. Andrew, D., & Craig, A. D. (2001). Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nature Neuroscience*, 4(1), 72.
32. Andrew, D., & Craig, A. D. (2001). Spinothalamic lamina I neurones selectively responsive to cutaneous warming in cats. *The Journal of Physiology*, 537(2), 489-495.
33. Craig, A. D., Krout, K., & Andrew, D. (2001). Quantitative response characteristics of thermoreceptive and nociceptive lamina I spinothalamic neurons in the cat. *Journal of Neurophysiology*, 86(3), 1459-1480.
34. Lynn, R. B. (1992). Mechanisms of esophageal pain. *The American Journal of Medicine*, 92(5), S11-S19.
35. Mense, S. (1983). Basic neurobiologic mechanisms of pain and analgesia. *The American Journal of Medicine*, 75(5), 4-14.
36. Willis Jr, W. D., Zhang, X., Honda, C. N., & Giesler Jr, G. J. (2001). Projections from the marginal zone and deep dorsal horn to the ventrobasal nuclei of the primate thalamus. *Pain*, 92(1-2), 267-276.
37. Beissner, F., Brandau, A., Henke, C., Felden, L., Baumgärtner, U., Treede, R. D., Oertel, B. G. and Lötsch, J. (2010). Quick discrimination of a delta and c fiber mediated pain based on three verbal descriptors. *PLoS ONE*, 5(9), e12944.
38. Gürel, S. (2011). Ağrının fizyolojisi. *Türkiye Klinikleri Aile Hekimliği Özel Dergisi*, 2(2), 10-4.
39. S. B. McMahon and M. Koltzenburg (Editörler). (2006). *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. Çin: Elsevier/Churchill Livingstone, 187-203.
40. Kettner, N. W. (2008). The functional neuroanatomy of pain perception. *Integrative Pain Medicine: The Science and Practice of Complementary and Alternative Medicine in Pain Management*. Totowa, NJ: Humana Press, 63-84.
41. Solomon DH. (2009) Overview of selective COX-2 inhibitors. *UpToDate*, 17(2).
42. Melcangic, M., & Bowery, N. G. (1996). GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends in Pharmacological Sciences*, 17(12), 457-462.
43. Barakat, L., & Bordey, A. (2002). GAT-1 and reversible GABA transport in Bergmann glia in slices. *Journal of Neurophysiology*, 88(3), 1407-1419.
44. Jensen, M. L., Timmermann, D. B., Johansen, T. H., Schousboe, A., Varming, T., & Ahring, P. K. (2002). The β subunit determines the ion selectivity of the GABAA receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41438-41447.
45. Sieghart, W., & Sperk, G. (2002). Subunit composition, distribution and function of GABA-A receptor subtypes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(8), 795-816.

46. Albrecht, J., Pearce, B., & Murphy, S. E. A. N. (1986). Evidence for an interaction between GABAB and glutamate receptors in astrocytes as revealed by changes in Ca²⁺ flux. *European Journal of Pharmacology*, *125*(3), 463-464.
47. Bowery, N. G., Hill, D. R., Hudson, A., Doble, A., Middlemiss, D. N., Shaw, J., & Turnbull, M. (1980). (–) Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*, *283*(5742), 92.
48. Charles, K. J., Deuchars, J., Davies, C. H., & Pangalos, M. N. (2003). GABAB receptor subunit expression in glia. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *24*(1), 214-223.
49. Charles, K. J., Calver, A. R., Jourdain, S., & Pangalos, M. N. (2003). Distribution of a GABAB-like receptor protein in the rat central nervous system. *Brain Research*, *989*(2), 135-146.
50. Bowery, N. G., Hill, D. R., Hudson, A., Doble, A., Middlemiss, D. N., Shaw, J., & Turnbull, M. (1980). (–) Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*, *283*(5742), 92.
51. Johnston, G. A. (1996). GABA_A receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, *17*(9), 319-323.
52. Shimada, S., Cutting, G., & Uhl, G. R. (1992). gamma-Aminobutyric acid A or C receptor? gamma-Aminobutyric acid rho 1 receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive gamma-aminobutyric acid responses in *Xenopus* oocytes. *Molecular Pharmacology*, *41*(4), 683-687.
53. Johnston, G. A. (1996). GABA_A receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels?. *Trends in Pharmacological Sciences*, *17*(9), 319-323.
54. Lukasiewicz, P. D., Maple, B. R., & Werblin, F. S. (1994). A novel GABA receptor on bipolar cell terminals in the tiger salamander retina. *Journal of Neuroscience*, *14*(3), 1202-1212.
55. Gwak, Y. S., & Hulsebosch, C. E. (2011). GABA and central neuropathic pain following spinal cord injury. *Neuropharmacology*, *60*(5), 799-808.
56. Woolf, C. J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, *306*(5944), 686.
57. Huang, J., Chang, J. Y., Woodward, D. J., Baccalá, L. A., Han, J. S., Wang, J. Y., & Luo, F. (2006). Dynamic neuronal responses in cortical and thalamic areas during different phases of formalin test in rats. *Experimental Neurology*, *200*(1), 124-134.
58. Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A., & Woolf, C. J. (2003). Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms?. *Trends in Neurosciences*, *26*(12), 696-705.
59. Borsook, D., Becerra, L., Carlezon Jr, W. A., Shaw, M., Renshaw, P., Elman, I., & Levine, J. (2007). Reward-aversion circuitry in analgesia and pain: implications for psychiatric disorders. *European Journal of Pain*, *11*(1), 7-20.

60. Fields HL, Liebeskind (Editörler) (1994). *Pharmacological Approaches to the Treatment of Pain*. Seattle: IASP Press, 61-84.
61. Amir, R., & Devor, M. (1996). Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia. *Journal of Neuroscience*, 16(15), 4733-4741.
62. J.D. Loeser, S.H. Butler, R.C. Chapman, D.C. Turk (Editörler). (2001). *Bonica's management of pain*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011-2022
63. Byers, M. R., & Bonica, J. J. (2001). Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. *Bonica's management of pain*, 3, 26-72.
64. Woolf, C. J., & Chong, M. S. (1993). Preemptive analgesia—treating postoperative pain by preventing the establishment of central sensitization. *Anesthesia & Analgesia*, 77(2), 362-379.
65. Rowbotham, M. C., & Petersen, K. L. (2001). Anticonvulsants and local anesthetic drugs. *Bonica's Management of Pain, ed, 3*, 1727-35.
66. Dubin, A. E., Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760–3772.
67. Pasero, C., Paice, J. A., & McCaffery, M. (1999). Basic mechanisms underlying the causes and effects of pain. *Pain: Clinical Manual*, 15-34.
68. M.A. Ashburn, L.J. Rice (Editörler), 1998. *The Management of Pain*, Churchill Livingstone, New York, 1-16
69. Fine, P. G., & Ashburn, M. A. (1998). Functional neuroanatomy and nociception. *The Management of Pain*, 1-16.
70. Portenoy, R. K., & Kanner, R. M. (1996). Definition and assessment of pain. *Contemporary Neurology Series*, 48, 3-18.
71. Koleva, D., Krulichova, I., Bertolini, G., Caimi, V., Garattini, L. (2005). Pain in primary care: an Italian survey. *The European Journal of Public Health*, 15(5), 475-479.
72. Kayaalp, SO. (Editör). 2012. *Akılcıl Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, Ankara: Pelikan Yayıncılık, 651-1344.
73. Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211, 39-50.
74. Göker, S. (2018). *5-sübstitüe-benzimidazol türevi bileşiğin farelerde analjezik ve antiinflamatuvar aktivite tarama çalışması*. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 21-30.
75. Abelson, K., Roughan, J. V. (2011). *Handbook of Laboratory Animal Science*, Boca Raton: CRC Press LLC, 123-147.

76. J. A. Trevor, B. G. Katzung, S. B. Masters (2010). *Farmakoloji* (Çev. Melih Altan). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 301.
77. Kumar, R., Clermont, G., Vodovotz, Y., & Chow, C. C. (2004). The dynamics of acute inflammation. *Journal of Theoretical Biology*, 230(2), 145-155.
78. Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy*, 8(2), S3.
79. Pearce, F. L. (1991). Biological effects of histamine: an overview. *Agents and Actions*. 33(1-2).
80. Uvnäs, B., Aborg, C. H., & Bergendorff, A. (1970). Storage of histamine in mast cells. Evidence for an ionic binding of histamine to protein carboxyls in the granule heparin-protein complex. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum*, 336, 1.
81. CR Ganellin, JC Schwartz (Editörler). (1985). *Frontiers in histamine research*. Histamine H1 -agonist stimulated breakdown on inositol phospholipids, Oxford: Pergamon, 27-38
82. Kuralay, F., & Çavdar, Z. (2006). İnflamatuar medyatörlere toplu bir bakış. *Genel Tıp Dergisi*, 16(3), 143-152.
83. L. Goodman, A. Gilman, L. Brunton, J. Lazo and K. Parker (Editörler). (2011). *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 959-1004.
84. Williams, C. S., Mann, M., DuBois, RN. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, 18(55), 7908-7916.
85. Buttar, N. S., & Wang, K. K. (2000). The “aspirin” of the new millennium: cyclooxygenase-2 inhibitors. *Mayo Clinic Proceedings*, 75(10) 10, 1027-1038
86. E. Fosslie. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in *Neoplasia Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 37 (2000), 431-502
87. Tilley, S. L., Coffman, T. M., & Koller, B. H. (2001). Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of clinical investigation*, 108(1), 15-23.
88. Hu, K. Q. (2003). Cyclooxygenase 2 (COX-2)-prostanoid pathway and liver diseases. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 69(5), 329-337.
89. Ricciotti, E., FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(5), 986-1000.
90. Chan, C. C., & Rodger, I. W. (1997). Selective cyclooxygenase-2 inhibitors as potential therapeutic agents for inflammatory diseases. *Eicosanoids and other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Radiation Injury*, 3, 157-161. Boston, MA.: Springer,

91. Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M. J., & Willoughby, D. A. (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature Medicine*, 5(6), 698.
92. Reuter, B. K., Asfaha, S., Buret, A., Sharkey, K. A., & Wallace, J. L. (1996). Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(9), 2076-2085.
93. Morteau, O. (2000). Prostaglandins and inflammation: the cyclooxygenase controversy. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 48(6), 473-80.
94. Bennett, M., & Gilroy, D. W. (2016). Lipid Mediators in Inflammation. *Microbiology Spectrum*, 4(6).
95. White, M. (1999). Mediators of inflammation and the inflammatory process. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(3 Pt 2), 378-381.
96. Murphy, H. S. (2015). İnflammation. D. S. Strayer, E. Rubin, J. E. Saffitz and A. L. Schiller (Editörler), *Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 55-94.
97. B. G. Katzung, S. B. Masters and A. J. Trevor (Editörler). (2012). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, disease-modifying antirheumatic drugs, nonopioid analgesics & drugs used in gout. *Basic & Clinical Pharmacology*. New York: McGraw-Hill Medical, 635-657.
98. C. E. Argoff ve G. McCleane (Editörler). (2009) *Pain Management Secrets*. New York : Elsevier, 274-286.
99. Knotkova, H., Pappagallo, M. (2007). Adjuvant analgesics. *Anesthesiology Clinics*, 25(4), 775-786.
100. Vane, J. R., & Botting, R. M. (1998). Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The American Journal of Medicine*, 104(3S1), 2S-8S.
101. Pearce, F. L. (1991). Biological effects of histamine: an overview. *Agents and Actions*. 33(1-2).
102. Şentürk, T. (2014). Non-Steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ). *İç Hastalıkları Dergisi*, 2, 490-5.
103. Goldberg, D. S., McGee, S. J. (2011). Pain as a global public health priority. *BMC Public Health*, 11, 770.
104. Robert S., Byrum, Jennifer L., Goulet, Richard J., Griffiths, and Beverly H. Koller. (1997). Role of the 5-Lipoxygenase-activating Protein (FLAP) in Murine Acute Inflammatory Responses. *Journal of Experimental Medicine* 185 (6): 1065–1076.
105. Ulrike G., Susanna V., Simona P., Jana G., Besa E., Stefanie L., Antonietta R., Christina W., Silke R., Ulrich S. S., Gerhard K.E. S., Erşan Ç., Burcu Ç., Erden B., Lidia S., Oliver W. (2016). BRP-187: A potent inhibitor of leukotriene biosynthesis

that acts through impeding the dynamic 5-lipoxygenase/5-lipoxygenaseactivating protein (FLAP) complex assembly. *Biochemical Pharmacology* 119; 17–26.

106. Orhan, N., Akkol, E. and Ergün, F. (2012). Evaluation of antiinflammatory and antinociceptive effects of some Juniperus species growing in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 36, 719-726.
107. Erden Banoglu, Erşan Çelikoğlu, Susanna Völker, Abdurrahman Olgaç, Jana Gerstmeier, Ulrike Garscha, Burcu Çalışkan, Ulrich S. Schubert, Andrea Carotti, Antonio Macchiarulo, Oliver Werz (2016). 4,5-Diarylisoaxazol-3-carboxylic acids: A new class of leukotriene biosynthesis inhibitors potentially targeting 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 113(1-10).





EK-1 Etik Kurul İzin Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 15/11/2016-E.137450



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Orhan Mecit ULUDAĞ
Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Mecit Orhan ULUDAĞ, Erden BANOĞLU, Burcu ÇALIŞKAN, Sevtap HAN, Gökür KARABULUT, Özgür ÖRNEK ve Sezgi GÖKER'den oluşan, G.Ü.ET-16.071 kod numaralı ve "*Diarilpirazol karboksamid, 5-sübstitüe-benzimidazol ve İzoksazol türevi bileşiklerin analjezik ve antiinflamatuvar aktiviteleri üzerinde çalışmalar*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-16.071 and entitled "*Studies on the analgesic, anti-inflammatory activity of diarylpyrazol carboxamide, 5-substitute-benzimidazol and isoxazol derivatives compounds*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-izahdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 Faks:0 (312) 202 20 63
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Nurvel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57

EK-1 (devam) Etik Kurul İzin Belgesi



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Örnek, Özgür

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri :

Medeni hali

Telefon

e-mail

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi, Farmakoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	İ.T.Ü. Kimya Bölümü	2006
Lise	Ataköy Cumhuriyet Lisesi	1998

İş Deneyimi

2013- devam ediyor Kimyager – Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu

2006-2013 Kimyager – Örnek Matbaacılık/Basım

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Halk Bilimi ve müziği

İnkılap Tarihi



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

