

**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI  
TIBBİ FARMAKOLOJİ**



**SİYATİK SİNİR LİGASYONU İLE OLUŞTURULAN  
NÖROPATİK AĞRI MODELİNDE ASİYATİK ASİTİN  
ETKİSİNİN ERKEK SIÇANLARDA ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

**Mustafa Nusret ÇİÇEKLİ**

Danışman

**Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE**

Bu tez çalışması, PYO.TIP.1904.19.014 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

SAMSUN  
2022

## TEZ KABUL VE ONAYI

Mustafa Nusret ÇİÇEKLİ tarafından, Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE danışmanlığında hazırlanan “Siyatik Sinir Ligasyonu İle Oluşturulan Nöropatik Ağrı Modelinde Asiatik Asitin Etkisinin Erkek Sıçanlarda Araştırılması ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 23.2.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı	Üniversitesi	Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr.	Üniversitesi	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul
					<input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul
					<input type="checkbox"/> Ret
Üye	Doç. Dr. XXXX XXXX	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	..... Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul
					<input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. XXXX XXXX	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	..... Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul
					<input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. XXXX XXXX	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	..... Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul
					<input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT  
Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet  (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır

İmza

23 /02 / 2022

Mustafa Nusret ÇİÇEKLİ

## TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

**Tez Başlığı :** Siyatik Sinir Ligasyonu ile Oluşturulan Nöropatik Ağrı Modelinde Asiyatik Asitin Etkisinin Erkek Sıçanlarda Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 14/ 01/ 2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 3

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

İmza

14 / 01 / 2022

Prof. Dr. Süleyman Sırrı BİLGE

## ÖZET

### SIYATİK SİNİR LİGASYONU İLE OLUŞTURULAN NÖROPATİK AĞRI MODELİNDE ASİYATİK ASİTİN ETKİSİNİN ERKEK SIÇANLARDA

#### ARAŞTIRILMASI

Mustafa Nusret ÇİÇEKLİ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı

Doktora, Şubat/2022

Danışman: Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE

Nöropatik ağrı, somatosensoriyel sinir sistemini etkileyen bir hasar veya hastalıktan kaynaklanan ağrıdır. Nöropatik ağrı tedavisi zor, kullanılan ilaçların yan etkileri fazla, mevcut tedavilerin başarı oranı düşüktür ve yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç vardır. Çalışmamızda antiinflamatuvar, analjezik ve antioksidan etkisi bilinen bir triterpen olan asiatic asit siyatik sinir ligasyonu ile oluşturulan nöropatik ağrıdaki etkisi araştırılmıştır. Siyatik sinir konstriksiyonu cerrahi yöntemle oluşturulduktan sonra 14 gün boyunca asiatic asit uygulanmış (3, 10 ve 30 mg/kg) sıçanlar 0., 7. ve 14. günde pençe ve hot plate testlerine tabi tutulmuştur. Mekanik allodini ve termal hiperaljezinin değerlendirilmesinden sonra deney hayvanları biyokimyasal ve moleküler olarak incelenmiştir. Ayrıca asiatic asit nöropatik ağrı patolojisinde rol oynayan mikrogliozis ve nöron hasarı üzerindeki etkisi in vitro olarak BV2 ve SH-SY5Y hücre hatlarında araştırılmıştır. Asiatic asit kronik tedavide ağrı yanıtını azalttığı ve spinal kord ve beyin düzeyinde antiinflamatuvar etikiler ortaya çıkardığı görülmüştür. Ayrıca asiatic asit siyatik sinir konstriksiyonu sonucu azalan BDNF seviyelerindeki azalmayı engelleyip normal seviyelere getirdiği, LPS ile indüklenen mikrogliya hücreleri üzerinde toksik etkileri antioksidan enzim seviyelerini artırarak engellediği görülmüştür. Çalışmamızın sonuçları asiatic asit siyatik sinir konstriksiyonu sonucu oluşan hasarı engelleyerek nöroprotektif etkisi olabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Asiatic Asit, Siyatik Sinir, Nöropatik Ağrı, Oksidatif Stres, BDNF, BV-2, SH-SY5Y.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ASIATIC ACID IN MALE RATS IN NEUROPATHIC PAIN MODEL CREATED BY SCIATIC NERVE LIGATION

Mustafa Nusret ÇİÇEKLİ

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Pharmacology

Ph.D., February/2022

Supervisor: Prof.Dr. S. SİRRI BİLGE

Neuropathic pain is caused by damage or disease affecting the somatosensory nervous system. Neuropathic pain treatment is difficult, the side effects of the drugs are high, the success rate of existing treatments is low, and new treatment approaches are needed in neuropathic pain. In our study, the effect of asiatic acid, a triterpene with known anti-inflammatory, analgesic and antioxidant effects, on neuropathic pain caused by sciatic nerve ligation was investigated. After the experimental model was created, the rats were treated with asiatic acid (3, 10 and 30 mg / kg) for 14 days and subjected to paw pressure and hot plate tests on days 0., 7. and 14. After the behavioral tests, the experimental animals were sacrificed with high dose anesthetic and biochemical molecular analyzes were performed. In addition, the effect of asiatic acid on microgliosis and neurondamage, which plays a role in neuropathic pain pathology, was investigated in vitro in BV2 and SH-SY5Y cell lines. It has been observed that asiatic acid reduces pain response in chronic treatment and produces anti-inflammatory effects at the spinal cord and brain level. In addition, asiatic acid normalized the decreased BDNF levels as a result of sciatic nerve construction and prevented the toxic effects of LPS-induced microglia cells on neurons by increasing the levels of antioxidant enzymes. The results of our study show that asiatic acid may have a neuroprotective effect by protecting it from damage caused by sciatic nerve construction.

**Keywords:** Asiatic Acid, Sciatic Nerve, Neuropathic Pain, Oxidative Stress, BDNF, BV-2, SH-SY5Y.

## ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Dünyaya geldiğim andan doktora eğitimimi bitirdiğim bu zamana kadar beni sevgi, merhamet ve şefkat ile büyüten, yetiştiren, hayatımın her alanında bana destek olan, her zaman arkamda oldukları duygusunu bana hissettirerek sınırsız güç ve kuvvet veren, doğruyu ve yanlışı bana bilgece öğreten, ilk tanıştığımızda kendileri de birer çocuk olan, beraber büyüdüğümüz, şimdilerin nene ve dedesi olmakla beraber duygu ve düşünce olarak her daim genç olan ANNEME ve BABAMA sonsuz saygı ve sevgilerimle teşekkür ederim. Yaptığım bu tez çalışmam ve bundan sonra yapacağım işlerle insanlığa en ufak bir faydam dokunabilirse bunları da anne ve babama ithaf ederim.

Bu çalışmayı, PYO.TIP.1904.19.014 proje numarası ile destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı 'na da teşekkür ederim.

Mustafa Nusret ÇİÇEKLİ

# İÇİNDEKİLER

<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Ağrı ve Nöropatik Ağrı</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Ağrıya Genel Bakış.....	3
2.1.2. Ağrının İşlenmesi.....	6
2.1.3. Ağrının Hücresel Mekanizmaları .....	7
2.1.4. Ağrının Sınıflandırılması .....	9
<b>2.2. Nöropatik ağrı</b> .....	<b>10</b>
2.2.1. Nöropatik Ağrının Tanımı ve Tarihçesi .....	11
2.2.2. Nöropatik Ağrının Epidemiyolojisi .....	11
2.2.3. Nöropatik Ağrının Patofizyolojisi .....	12
2.2.4. Periferik Sinir Hasarı ve Nöropatik Ağrı İlişkisi .....	14
2.2.5. Nöropatik Ağrı Tedavisinde Kullanılan İlaçlar .....	16
2.2.6. Nöropatik Ağrı ve Oksidatif Stres .....	18
2.2.7. Nöropatik Ağrının Araştırılmasında Kullanılan Deneysel Modeller .....	19
2.2.8. Nöropatik Ağrı Testleri.....	21
<b>2.3. Asiatik Asit</b> .....	<b>21</b>
<b>3. MATERYAL ve METOT</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1. Gereçler</b> .....	<b>23</b>
3.1.1. Kimyasallar .....	23
<b>3.2. Yöntemler</b> .....	<b>25</b>
3.2.1. İn Vivo deneyler .....	25
3.2.2. İn Vitro Deneyler .....	28
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1. İn-Vivo Deney Sonuçları</b> .....	<b>31</b>
4.1.1. Asiatik Asitin Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi .....	31
4.1.2. Asiatik Asitin Hot Plate Testinde Etkisi .....	31
4.1.3. Peççe Testi Sonuçları .....	32
4.1.4. Beyin ve Spinal Kord TNF- $\alpha$ ve IL-1 $\beta$ Düzeyleri .....	33
4.1.5. Beyin ve Spinal Kord BDNF Ekspresyonunun Ölçülmesi.....	34
<b>4.2. İn-vitro Deney Sonuçları</b> .....	<b>35</b>
4.2.1. Asiatik asitin BV-2 ve SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi .....	35
4.2.2. Asiatik asitin LPS ile İndüklenen BV-2 Hücreleri Üzerine Etkisi .	36
4.2.3. Asiatik Asit ve LPS uygulanan BV-2 Hücrelerinin Mediumlarının SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi .....	37
4.2.4. LPS ile İndüklenen BV-2 Hücre Mediumlarının SH-SY5Y Hücrelerine Uygulandıktan Sonra Asiatik Asit Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	38

4.2.5. LPS ile İndüklenen BV-2 Hücre Mediumunun SH-SY5Y Hücrelerine Uygulandıktan Sonra Asiatik Asit Uygulamasının SOD, MDA ve GSH Üzerine Etkileri .....	38
<b>5. Tartışma .....</b>	<b>40</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>48</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>49</b>
<b>ETİK KURUL KARARI .....</b>	<b>59</b>
<b>ÖZ GEÇMİŞ.....</b>	<b>60</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AMPA</b>	: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionik asit
<b>ANOVA</b>	: Tek yönlü varyans analizi
<b>ATP</b>	: Adenozintrifosfat
<b>A<math>\beta</math></b>	: Amiloid beta
<b>B2</b>	: Bradikinin 2 reseptörleri
<b>BDNF</b>	: Beyin türevli nötrofik faktör
<b>cAMP</b>	: Siklik adenozinmonofosfat
<b>CGRP</b>	: Kalsitonin geni ilişkili peptid
<b>DMEM/F12</b>	: Dulbecco's modified eagle medium/Ham's F12 medium
<b>DMSO</b>	: Dimetilsülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dPBS</b>	: Dulbecco's phosphate buffered saline
<b>DRG</b>	: Dorsal boynuz ganliyonu
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetra asetik asit
<b>ELISA</b>	: Enzim bağılı immünosorbent assay
<b>ERK</b>	: Ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu
<b>GABA</b>	: Gama aminobütirik asit
<b>GLUT-2</b>	: Glutamat taşıyıcısı-2
<b>GSH</b>	: Glutasyon-S-hidroksilaz
<b>IASP</b>	: Uluslararası Ağrı Çalışmaları Birliği
<b>IL-1</b>	: İnterlökin 1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	: İnterlökin 1 beta
<b>IL-6</b>	: İnterlökin 6
<b>LiNaCO<sub>3</sub></b>	: Lityum karbonat
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>MAP</b>	: Mitojen ilişkili protein
<b>MCP-1</b>	: Monositkemoatardan protein-1
<b>MDA</b>	: Malonildialdehid
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	: Makrofaj inflamatuvar protein-1 alfa
<b>miRNA</b>	: Mikro RNA
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA

<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür
<b>NGF</b>	: Sinir büyüme faktörü
<b>NMDA</b>	: N-metil-D-aspartik asit
<b>P2X4</b>	: P2X purino reseptör 4
<b>PBN</b>	: Fenil-N-tersiyer-bütilnitron
<b>PEG</b>	: Polietilen glikol
<b>PVDF</b>	: Polivinilidinflorür
<b>RIPA</b>	: Radyo immünoassaypresipitasyonassay tamponu
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SCN9A</b>	: Sodyum voltaj kapılı kanalı alfa altünitesi 9
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodyum dodesilsülfatpoliakrilamidelektroforez jeli
<b>SOD</b>	: Superoksitdismutaz
<b>TBS-T</b>	: Trisbufferedsaline-Tween
<b>TEMPOL</b>	: 4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekroz faktör alfa
<b>TrkB</b>	: Tropomiyozin reseptör kinaz B

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Santral sensitizasyon .....	4
Şekil 2.2. Ağrının iletilmesi.....	7
Şekil 2.3. Deneysel siyatik sinir konstriksiyonu modelleri .....	21
Şekil 3.1. Siyatik sinir ligasyonu .....	25
Şekil 3.2. Hot plate cihazı.....	27
Şekil 3.3. Hücre hatlarına ilaç uygulaması .....	29
Şekil 4.1. Asiatik asit 3, 10 ve 30 mg/kg kronik uygulandığında lokomotor aktivite üzerine etkisi.....	31
Şekil 4.2. Asiatik asit 3, 10 ve 30 mg/kg kronik uygulandığında hot plate latensi üzerine etkisi.....	32
Şekil 4.3. Asiatik asit 3, 10 ve 30 mg/kg kronik uygulandığında mekanik allodini üzerine etkisi.....	33
Şekil 4.4. Asiatik asit (3,10, 30 mg/kg) ve pregabalin (10 mg/kg) un beyin ve spinal kord TNF alfa ve IL-1B düzeyine etkisi .....	34
Şekil 4.5. Asiatik asit ve pregabalinin beyin ve spinal kordda BDNF ekspresyonuna etkisi.....	35
Şekil 4.6. Asiatik asitin BV-2 ve SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkisi .....	36
Şekil 4.7. BV-2 hücrelerin asiatik asit ve LPS uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.8. LPS ile indüklenen BV-2 hücrelerine farklı doz asiatik uygulamasını takiben vasatlarının SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.9. LPS ile İndüklenen BV-2 Hücre Mediumlarının SH-SY5Y Hücrelerine Uygulandıktan Sonra Asiatik Asit Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi .....	38
Şekil 4.10. LPS ile İndüklenen BV-2 Hücre Mediumunun SH-SY5Y Hücrelerine Uygulandıktan Sonra Asiatik Asit Uygulamasının SOD, MDA ve GSH Üzerine Etkileri .....	39

## TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Nöropatik ağrı tedavisinde kullanılan ilaçlar.....	17
Tablo 3.1. Deney grupları .....	26



# 1. GİRİŞ

Nöropatik ağrı fiziksel hasar veya hastalığa bağlı bir sebeple ortaya çıkan periferik ya da santral sinir sistemini etkileyen, dünya genelinde %7-10 sıklıkla görülen bir patolojidir. Nöropatik ağrının birçok nedeni ve olası mekanizmaları aydınlatılmış olmasına rağmen dünya genelinde yaşlanan popülasyon ve diyabet, kanser gibi giderek artan kronik hastalıklar sonucu insidansı günden güne artmaktadır. Nöropatik ağrı mekanizmaları arasında uyarıcı ve inhibe edici sinyal yollarında bozukluklar, iyon kanallarındaki değişimler, oksidatif stres, periferik sinir uçlarında ve santral sinir sisteminde artmış inflamatuvar yanıt öne çıkmaktadır. Kronik nöropatik ağrı hastaların yaşam kalitesini kısıtlaması nedeniyle sosyal ve ekonomik zorluklara neden olmakta, bu durum yeni tedavi alternatiflerinin ortaya çıkartılmasını önemli hale getirmektedir. Hastalığın kompleks olması ve birçok etkenle değişebilen doğası nedeniyle mevcut tedavi olanakları kısıtlıdır.

Asiatik asit bir pentasiklik triterpenoiddir. Özellikle tüketilebilir tıbbi bitkilerden biri olan centella asiatica bitkisinde bulunan asiatik asit günümüzde dermal preparatların içerisinde bulunan ve yara tedavisinde kullanılan bir bileşiktir (J. Lv, Sharma, Zhang, Wu, and Ding, 2018). Asiatik asit'in antioksidan ve antiinflamatuvar etkileriyle birçok hastalığın tedavisinde rol alabileceği ileri sürülmektedir (H. Lv et al., 2017). Asiatik asitin birçok prelinik çalışmada nöroprotektif, nootropik, antimikrobial ve antimitojen etkisi araştırılmıştır. Bu etkilerinden yola çıkarak asiatik asitin sinir hasarının önlenmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir (X. Wang et al., 2017). Ayrıca asiatik asitin oral yolla kullanımının yüksek biyoyararlanıma sahip olması teropötik potansiyele sahip olduğu hastalıklarda kullanılmasının önünü açmıştır. Deneysel hayvan çalışmalarında asiatik asitin nöroprotektif etkisini, hücrel antioksidan etkiyi artırarak nöronlar ve mikroglialar üzerinde gösterdiği düşünülmektedir. Asiatik asitin öğrenme ve belleği hipokampal nörojenezini indükleyerek artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca hidrojen peroksit, rotenon, glutamat ve  $\beta$ -amiloid ile indüklenen nörotoksositeye karşı koruyucu etkisi olduğu ileri sürülmüştür. Bunun yanı sıra asiatik asitin antiinflamatuvar ve antinosiseptif etkisinin gösterilmesi inflamasyonun ve oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı siyatik sinir hasarına bağlı nöropatik ağrıda araştırılması fikrini doğurmuştur.

Bu çalışmanın amacı siyatik sinir konstriksiyonu ile oluşturulan nöropatik ağrı modelinde asiatik asitin olası etkilerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla nöropatik ağrı

modeli oluşturulan sıçanlarda termal hiperaljezi ve mekanik allodini testleri yapılmış, etkinin mekanizmasının değerlendirilmesi için beyin ve spinal kord dokusunda tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ve beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) seviyeleri ölçülmüştür. Bunun yanı sıra asitik asitin sinir hasarı üzerindeki etkisini hücre düzeyinde incelemek için, sinir hasarı sonucu oluşan nöroinflamasyon taklit edilerek mikroglia ve nöron benzeri hücre hatları üzerinde asetik asitin etkisi araştırılmıştır. Bu hücre hatlarında inflamasyon modeli oluşturulmuş ardından hücre canlılığı ve inflamasyonunun neden olduğu oksidatif stres taklit edilmiş ve SOD, GSH ve MDA düzeylerinin belirlenmesi için biyokimyasal analizler yapılmıştır. Böylelikle asitik asitin nöronlar ve nöropatik ağrıdan sorumlu mekanizmalarda önemli rol oynayan mikroglialar üzerindeki etkilerinin de araştırılarak asitik asitin hücre spesifik etkilerinin de ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

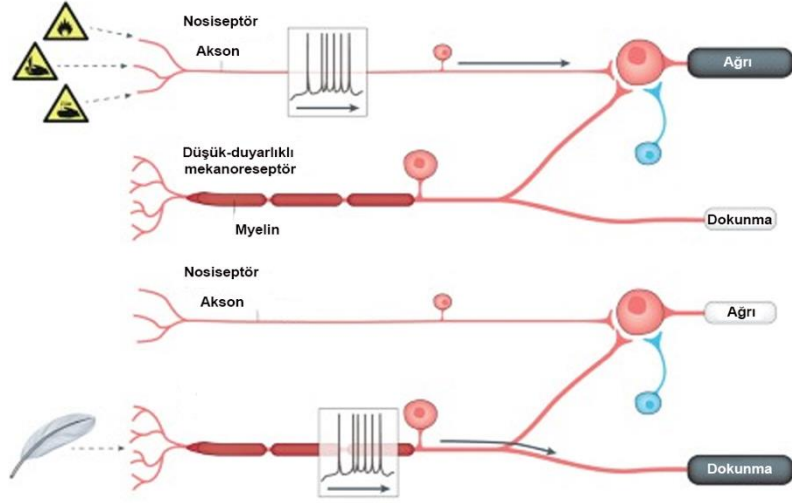
### 2.1. Ağrı ve Nöropatik Ağrı

#### 2.1.1 Ağrıya Genel Bakış

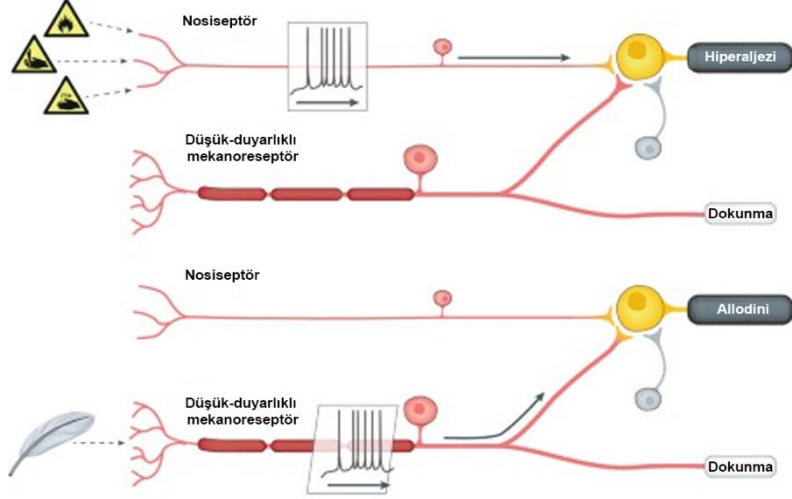
Uluslararası Ağrı Çalışmaları Birliği (IASP) ağrıyı hoş olmayan, duygusal tecrübeyle ilişkili doku hasarı veya ilişkili mekanizmalarla ortaya çıkan bir his olarak tanımlamaktadır (Treede, 2018). Ağrı duyusu ağrılı bir uyarana karşı vücudun etkilendiği kısmın bu durumdan kaçınması için bir korunma mekanizmasıdır.

Somatosensöryel sistem özelleşmiş primer duysal nöronları içeren ve düşük şiddetli uyarılara karşı herhangi bir cevap oluşturmayan fakat şiddetli uyarılara karşı nosiseptörlerin aktivasyonu ile santral yolları uyararak ağrıya neden olan bir yapıya sahiptir. Santral sensitizasyon; somatosensöryel uyarının artması, sinaptik iletinin hızlanması ve iletim süresinin uzaması ile normalde etkisiz olan sistemlerin aktivasyonu ile ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.1.). Santral sensitizasyon santral sinir sistemindeki nosiseptif nöronların normal veya eşik değerin altındaki uyarılara karşı artmış cevabı ve bunun sonucunda normalde ağrı oluşturmayan uyarana ağrı cevabının verilmesi olarak tanımlanmaktadır. Santral sensitizasyon oluşurken primer sensöryel nöronlarda ve spinal kordun dorsal boynuzunda geri dönüşlü veya dönüşsüz birçok değişiklik olmaktadır. İnflamatuvar ağrı ve nöropatik ağrıda dokunmaya karşı artmış hassasiyet duysal sinir uçlarındaki A $\beta$  liflerinden kaynaklanmaktadır.

### A. Normal sensitizasyon



### B. Santral sensitizasyon



Şekil 2.1. Santral sensitizasyon (Reynolds, Dmochowski, Wein, and Bruehl, 2016)

P maddesi ve kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) gibi birçok peptit ve glutamat primer aferentlerdeki nosiseptif nöronlarda bulunmaktadır. Bu nöronların projeksiyonları da dorsal boynuzun yüzeyel kısmına kadar uzanmaktadır. Uyarana karşı nosiseptif aferentlerin santral terminallerinden salıverilen bu hızlı transmitterler spinal kordun dorsal boynuzunda postsinaptik nöronlarda bulunan iyonotropik ve metabotropik birçok reseptöre bağlanır. Dorsal boynuzda bulunan 3 temel iyonotropik glutamat reseptörü NMDA, AMPA ve kainattır. AMPA reseptörleri 4 alt ünitelerden oluşan heteromerik ve homomerik yapıda olan ve çoğunlukla GLUT-2 alt ünitesi içeren ve bu sayede kalsiyum iyonlarına geçirgen olmayan yapıda bulunmaktadır. İyonotropik NMDA reseptörleri AMPA reseptörlerinden farklı olarak heteromerik

yapıyla oluşan fonksiyonel tetramer yapıda reseptörlerdir. Fizyolojik koşullarda 2 tane NR1 iki tane NR2 alt ünitesinden oluşmaktadır.

Dorsal boynuzun yüzeyel laminasında AMPA ve NMDA reseptörleri neredeyse tüm eksitator sinapslarda mozaik benzeri yapıda bulunurken metabotropik glutamat reseptörleri yalnızca postsinaptik bölgede bulunmaktadır. Yapıları gereği kalsiyuma geçirgen ve magnezyumla bloke olan NMDA reseptörleri patolojik ağrıda anahtar rol oynamaktadır. NMDA reseptörleri aktive olduktan sonra daima kalsiyum girişine izin verirken AMPA reseptörleri glutamatla uyarılmış kalsiyumun nöronlara girişini regüle eder (Youn, Gerber, and Sather, 2013). Deney hayvanlarının arka pençelerine uygulanan ağırlı uyaran AMPA reseptörlerinde GluA1 fosforilasyonuna, NMDA reseptörlerinde NR1 fosforilasyonuna neden olmaktadır (Wigerblad et al., 2017). Bu plastik değişiklikler dorsal boynuz nöronlarının santral sensitizasyonunda ve farklı ağrı yanıtlarında görev almaktadır. Hücre içi kalsiyum miktarının eşik seviyelerin üzerine çıkması aktivite bağımlı santral sensitizasyonu ortaya çıkarmaktadır (Tuchman, Barrett, Donevan, Hedberg, and Taylor, 2010). NMDA reseptörleri sayesinde kalsiyum konsantrasyonunun artması voltaj kapılı kalsiyum kapılarını ve kalsiyum geçirgen AMPA reseptörlerini uyarmaktadır. Nöropatik ağrı esnasında inhibitör transmitterlerin sentezi, saliverilmesi veya aktivitelerinin disinhibisyonu eksitator sinapsların ve membran uyarılabilirliğinin güçlenmesine neden olmaktadır.

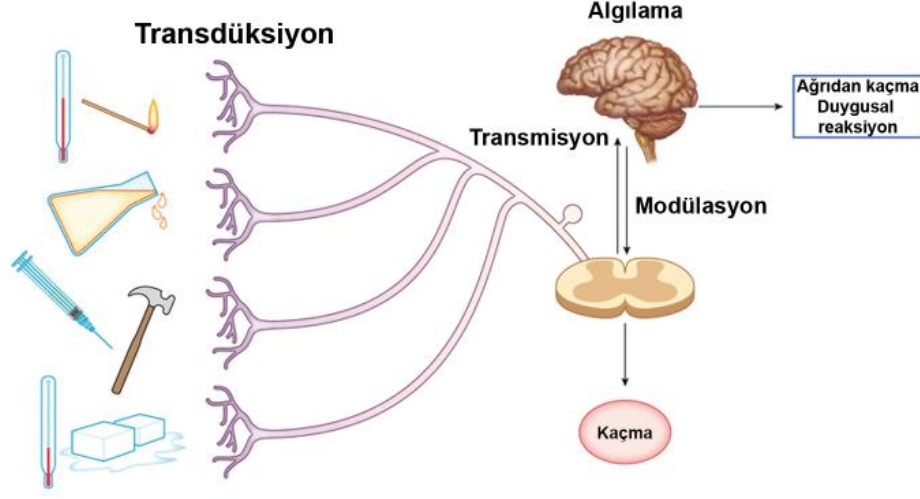
Kronik ağrı kalsiyum kanallarında gen ekspresyonunun uzun süreli değişimi ile ilişkilidir (J. Park and Luo, 2010). Kalsiyumun hücre içine alınmasından sorumlu olan L-tipi voltaj bağımlı kanalları da nöropatik ağrıda rol oynamaktadır (Perret and Luo, 2009). Daha önce yapılan çalışmalarda dorsal boynuzun derin yüzeylerinde bulunan nöronlarda intrinsek biyoelektriksel değişimler sonucu nöronal uyarının aşırı arttığı gösterilmiştir (Ardell, 2020). Bu özellikler genel olarak uzun süreli kanal aktivasyonu ile ilişkilidir.  $Ca_{v1.2}$  ve  $Ca_{v1.3}$  başta olmak üzere kalsiyum kanallarının santral sinir sisteminde duyuşal proseslerde, özellikle de uzun süreli sinir hasarından sonra ortaya çıkan plastik değişikliklerde rol oynadığı gösterilmiştir (Roca-Lapirot et al., 2018).  $Ca_{v1.2}$ 'nin gen regülasyonunda ve nöropatik ağrının gelişmesinde rolü olduğu bilinmektedir. Genetik yöntemlerle deney hayvanlarından  $Ca_{v1.2}$ 'yi kodlayan genin silinmesiyle mekanik hipersensitivite ve hipereksitabilitenin ortadan kalktığı görülmüştür. (Fossat et al., 2010). Ayrıca bu kanalların genetik regülasyonunda miRNA'lar gibi birçok genetik elementin rol oynadığı gösterilmiştir (Favereaux et al.,

2011). Bu değişikliklerin sadece fonksiyonel ve moleküler düzeyde kalmadığı ve uzun süre devam ettiğinde patolojik ağrı durumlarına neden olduğu gösterilmiştir (H. Li, Shen, Ma, and Huang, 2013). Nöropatik ağrı şiddeti ve süresine bağlı olarak santral sinir sisteminde çeşitli etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. (Gustin, Wrigley, Siddall, and Henderson, 2010). Hayalet ağrı, kronik ağrı, fibromiyalji ve baş ağrısında beyinde görülen birçok lokal morfolojik değişikliğin gri maddede oluştugu gösterilmiştir (Rodriguez-Raecke, Niemeier, Ihle, Ruether, and May, 2009). Bu bağlantılardaki aktivite değişiklikleri sinirlerde denervasyon, reneervasyon ve hipertrofiye neden olmaktadır. Periferel aksonal hasarlar duysal nöronlarda rejenerasyon ile ilgili gen ekspresyonunu anlamlı derecede artırarak hasar görmüş aksonların hedefleri ile yeniden bağlantı kurmasını sağlar. İntrensek kapasitedeki bu artış ayrıca spinal kordda hasar görmüş nöronların akson terminallerinin yeni yolaklar oluşturmaya neden olur. Periferel sinir hasarı sonrası A $\beta$  sinir lifleri normalde sonlandığı lamina 3-5 yerine lamina 2 de sonlanır. Siniri hasarı sonrası oluşan bu yapısal değişiklikler A $\beta$  liflerinin nosiseptif yanıtlarında artışa neden olmaktadır.

### **2.1.2. Ağrının İşlenmesi**

Ağrı sinyali periferel nosiseptörlerden başlayarak genellikle talamusta somatosensöriyel bölgelere projekte olan yolaklarla iletilmektedir (McEntire et al., 2016). Nosiseptif afferentler glutamaterjik sinapların periferel inputları spinal dorsal boynuzun yüzeysel laminasında bulunan ikinci derecede nöronlara taşınır. Ayrıca nosiseptif olmayan liflerden ortaya çıkan inputlar daha derin katmanlara projekte olmaktadır. Bu yolakların birçok seviyede etkileşerek ortaya çıkardığı output, beyinde farklı projeksiyon bölgelerine iletmektedir. Ağrının duysal işlenmesi ve ayırıcılığı lateral spinotalamik yolaktan çıkan multimodal duysal inputların spinal geniş dinamik seviyeli nöronlarla lateral talamusa iletilmesiyle gerçekleşmektedir (Yang et al., 2014). Diğer taraftan spinotalamik ve spinoparabrakiyal yolağın medial kısmı medial talamusa ve limbik yapılara ulaşarak ağrının duygusal komponentini oluşturmaktadır. Ağrı tecrübesi kortekste algılanarak spinal korda iletilir ve bu sayede uyarıcıdan

kaçınma davranışı oluşur (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Ağrının iletilmesi

### 2.1.3. Ağrının Hücresel Mekanizmaları

Ağrı transdüksiyonu ve algısı kompleks temel biyolojik olayları içeren ve santral sinir sisteminin birçok basamağında gerçekleşen bir olaydır. Birçok reseptör ve iyon kanalı ağrı tedavilerinin temel hedeflerini oluşturmaktadır.

Ağrı ile ilgili en karışık mekanizmalardan birisi santral sensitizasyondur. Santral sensitizasyonu tanımlamak için tek bir mekanizma yetersiz kalmakta ve genel olarak somatosensöryel bir iletimden çok membran uyarılabilirliğinin artması, sinaptik iletimin güçlenmesi, dorsal boynuzdaki inhibitör iletimin azalması gibi birçok olay etrafında şekillendiği düşünülmektedir. (Latremoliere and Woolf, 2009). Santral sensitizasyon büyük oranda NMDA ve AMPA reseptörlerinin membran trafiği, iyon geçirgenliği, GABA ve glisin aktivitesindeki değişimle düzenlenmektedir. (Bardoni, 2013). Kronik ağrıda spinaldorsal boynuzdaki nöronlar NMDA, AMPA ve kalsiyum iyonunu regüle ederek ağrının iletiminde rol oynamaktadır. Ayrıca kalsiyum iyonu birçok alt sinyal yolağını etkileyerek NMDA ve AMPA'nın bu regülatör rolünü modüle etmektedir. Sonuç olarak kalsiyumun NMDA ve AMPA'yı regüle etmesi ile periferel nöronlardan spinal nöronlara sinaptik transmisyon artmakta ve bu yolak

santral sensitizasyonun temelini oluşturmaktadır (X.-H. Li, H.-H. Miao, and M. Zhuo, 2019).

P maddesi gibi glutamatla birlikte salıverilen nöropeptitler de santral sensitizasyonda rol oynamaktadır (Seybold, 2009). P maddesi G-protein kenetli nörokinin 1 reseptörlerine bağlanarak uzun süreli membran depolarizasyonuna ve C lifleri ile uyarılan sinaptik potansiyeller oluşmasına neden olur. Nörokinin 1 içeren nöronların genetik yöntemlerle spinal kordtan silinmesi sonucu kapsaisin ile oluşturulan santral sensitizasyonun ortadan kalktığı gösterilmesi P maddesinin bu fenomendeki rolünü desteklemektedir (Adelson, Lao, Zhang, Kim, and Marvizón, 2009).

Küçük çaplı duyuşal nöronlardan sentezlenen CGRP, postsinaptik CGRP 1 reseptör aracılığı ile protein kinaz A ve protein kinaz B yi aktive ettiği ve bu aktivasyonun santral sensitizasyonda rol oynadığı gösterilmiştir (Z. Zhang, Winborn, Marquez de Prado, and Russo, 2007). CGRP ayrıca trigeminal nöreseptörlerden BDNF salıverilmesini artırarak migren ve diğere baş ağrılarında rol oynar (Fischer et al., 2012). BDNF nöreseptör nöronlardan spinal korda salıverilen nörotrofik bir faktör ve sinaptik bir modülatördür. Ayrıca BDNF'nin santral sensitizasyonda rol oynadığı gösterilmiştir (Nijs et al., 2015). BDNF yüksek afinite ile TrkB reseptörlerine bağlanır ve NMDA yoluyla C lifleri aracılı sinyal yollarını uyarır böylece spinotalamik nöronlarda ERK ve proteinkinaz C gibi ağrı mekanizmalarında rol oynayan birçok elementi regüle eder (X. Wang et al., 2017).

İnflamatuvar bir kinin olan bradikinin spinal kordda üretilmekte ve şiddetli fiziksel uyarana karşı dorsal boynuz nöronlarında bulunan Gq kenetli B2 reseptörleri uyararak ağrı cevabında rol oynamaktadır (Ferreira et al., 2005). Santral sensitizasyonda postsinaptik mekanizmaların rolü hakkında birçok çalışma bulunmaktadır. P maddesi tarafından indüklenen yavaş depolarizasyon ve diğere peptitlerle artmış NMDA-glutamat cevabının kalsiyum girişini artırarak santral sensitizasyonu potansiyalize ettiği gösterilmiştir. Ayrıca GluA2 alt ünitesi içermeyen AMPA reseptörleri aracılığıyla dorsal boynuzun uzun süreli potansiyalizasyonda rol oynamaktadır (Tao, 2012). Buna ek olarak NMDA alt ünitelerinden biri olan NR1'in genetik olarak silinmesinin formalinle ortaya çıkan hiperalejiyi ortadan kaldırdığı fakat normal ağrı hissini etkilemediği gösterilmiştir (Da Silva, Walder, Davidson, Wilson, and Sluka, 2010). Yapılan çalışmalar kalsiyumun hücre içine girmesiyle

birçok hücrenel mekanizmayı tetikleyerek santral sensitizasyonda rol oynadığını göstermiş ve kalsiyumla ilişkili olan protein kinaz A ve C nin bu yollarda temel rol oynadığı ortaya koymuştur (Velázquez, Mohammad, and Sweitzer, 2007)

#### **2.1.4. Ağrının Sınıflandırılması**

Ağrı; süresi, kaynaklandığı bölgeye ve mekanizmasına göre 3 temel sınıfa ayrılmıştır (Kennedy and Abd-Elsayed, 2019).

Akut ağrı, uyarıcı etkenin uzaklaştırılması ile kısa süre içerisinde şiddeti değişen ağrı olarak tanımlanmaktadır. Akut ağrı sinir sisteminin olası yaralanmaya karşı kaçma cevabını tetikleyen fizyolojik bir durumdur (Johnson, Borsheski, and Reeves-Viets, 2013). Kütanoz ağrı ise motor geri çekilme ve kaçma reaksiyonu oluşturarak ağrının hissedilmesini engeller. Doku hasarının ortadan kaldırılması için avantajlı bir mekanizmadır (J. S. Chen, Kandle, Murray, Fitzgerald, and Sehdev, 2020).

Subkronik ağrı saatlerden günlere kadar süren, kronik ağrı ise aylardan yıllara kadar süren ağrı olarak tanımlanmaktadır (Chanda, Alvin, Schnitzer, and Apkarian, 2011). Bu iki ağrı tipi spontan ağrı, hiperaljezi (uyarana karşı artmış cevap) ve allodini (normalde uyarıcı olmayan bir etkene karşı ağrı hissi) ile karakterizedir. Ağrı; somatik, viseral ve sempatik ağrı olarak kaynaklandığı bölgeye göre ayrılmaktadır (A. V. Apkarian, 2008). Somatik ağrı genellikle yüzeysel ve derin kaynaklı cilt altı dokulardan ve membranlardan iletilen uyarılarla ortaya çıkar. İyi lokalize edilebilen, keskin, zonklayıcı veya yanıcı özellikte olup genellikle kas, tendon, eklem veya kemik kaynaklıdır. Viseral ağrı ise internal organlardan afferent yollarla otonom sinir sistemine taşınan ağrıdır. Kolon, rektum ve mesaneden ortaya çıkan uyarılar parasempatik sinirlerle taşınırken, farenks, trakea, özefagustan ortaya çıkan uyarılar vagus veya glossofaringeal sinirlerle medulla spinalise taşınır. Fiziksel hasar organ çevresinde oluşan gerilim ve kan akımındaki değişiklikler viseral ağrıya neden olabilir (Cervero, 2009). Bu nedenle ağrı yaygın, zor lokalize edilen ve yansıyan tipte ortaya çıkmaktadır. Sempatik ağrı ise sempatik sinir sisteminin aktivasyonu nedeniyle damarsal kökenli olup nadir olarak görülmektedir. Genellikle ağrıyan bölgede hissedilen soğukluk ve üşüme hissi zamanla distrofik değişikliklere neden olabilir (S. S. Chen and Zhang, 2015).

Her ne kadar bu tanımlamalar ağrı sınıflandırmasında geçerliliğini korusa da günümüzde ağrının nörobiyolojik perspektifte nedeni 3 temel mekanizmayla

aydınlatılmaya çalışılmıştır.

#### **2.1.4.1. Nosisseptif Ağrı**

Nosisepsiyon; vücutta oluşan doku hasarında uyarının özelleşmiş sinir uçlarıyla alınıp santral sinir sistemine iletilmesi buna karşı fizyolojik, biyolojik ve psikolojik önlemlerin harekete geçirilmesidir. Çok sıcak, çok soğuk ve keskin cisimlerle temasta ortaya çıkan ağrı hissi veya şiddetli uyararla (yüksek bası) oluşan ağrı tipidir. Nosisseptif ağrıyı algılayan sinir sistemi primitif canlılarda bile bulunmaktadır (Dubin and Patapoutian, 2010).

#### **2.1.4.2. İnflamatuvar Ağrı**

Cildin veya herhangi bir dokunun inflamasyona bağlı olarak sıcak, şişmiş ve kızarmış olmasıyla karakterize spontan olarak gelişen ağrıdır. Nosisseptif ağrının tersine uyarıcı etken uzaklaştırılsa da inflamasyon saatler, aylar veya yıllar sürebilir.

Düşme ve kırılma sonucu ortaya çıkan yaralanmalar, yanıklar, minör enfeksiyonlar, kas ve eklem ağrıları bunlara örnektir. Adaptif ve protektif olarak tanımlanan inflamatuvar ağrı hasar olan dokunun duysal etkenini artırarak bölgenin fiziksel etkileşim ve hareketle daha çok hasar görmesini engeller. Ağrı hipersensitivitesi veya hissizliği, olası hasarı azaltarak iyileşmeyi sağlar (Xu and Yaksh, 2011).

#### **2.1.4.3. Patolojik Ağrı**

Koruyucu olmayan ve sinir sisteminin anormal fonksiyonu sonrası ortaya çıkan ağrıdır (Kuner, 2010). Herhangi bir hastalığın semptomu olarak değil santral sisteminin bir hastalık durumu olarak (nöropatik ağrı) ve hasar inflamasyon veya herhangi bir etken olmadan (disfonksiyonel ağrı) ortaya çıkmaktadır. Disfonksiyonel ağrıya fibromiyalji, gerilim tipi baş ağrısı örnek verilebilir. Bu ağrılardan biri olan kronik ağrı sendromu bilinen en şiddetli patolojik ağrı çeşidi olup santral sinir sisteminin düşük uyarınlı etkenlere karşı artmış cevap olarak ortaya çıkmasıyla oluşur. Patolojik ağrı hasar sonrası oluşmakta, periferik sinir sistemi ve santral sinir sisteminde değişikliklere neden olarak şiddeti artmaktadır (Schug, Daly, and Stannard, 2011). Nöropatik ağrı da patolojik ağrının bir çeşididir.

#### **2.2. Nöropatik ağrı**

Periferik ve santral sinir sisteminde ortaya çıkan kronik ağrı çeşididir. Yanma,

batma, elektrik çarpması benzeri hislerle ortaya çıkar (Colloca et al., 2017). İnflamatuvar ve nöropatik ağrının farkı inflamatuvar komponentlerin nöropatik ağrıda olmaması, nöropatik komponentlerin ise inflamatuvar ağrıda olmamasıdır. Nöropatik ağrı karpal tünel sendromu gibi mekanik, diyabetik polinöropati gibi metabolik, zona gibi viral, kanser kemoterapisindeki gibi görülen nörotoksik, multipl sklerozdaki gibi inflamatuvar veya immünolojik olarak sınıflandırılmaktadır (Campbell and Meyer, 2006).

### **2.2.1. Nöropatik Ağrının Tanımı ve Tarihçesi**

Nöraljinin sinir uçlarında ortaya çıkan ağrı olarak adlandırılması nöropatik ağrı tanımının uzun süre kullanılmamasına neden olmuştur. Son yıllarda nöropatik ağrı periferel ve santral mekanizmaları içeren, sinir sisteminin disfonksiyonu olarak tanımlanmıştır.

Santral sinir sistemi patolojisindeki ağrı, vasküler lezyonlar sonucu ortaya çıkan nöralji olarak tanımlanmaktadır.(Nomura, Ikezaki, Matsushima, and Fukui, 1994). Fother Gill trigeminal nöraljinin ilk tanımlarını ortaya çıkarmış fakat nöralji terimini kullanmaktan kaçınmıştır (Greenwood, 1975). Fakat Dejerine ve Vaussy 1906 yılında talamik sendromu tanımlamış ve bu tanım Head ve Holmes tarafından ‘farklı bölgelerdeki serebral lezyonlar sonucu ortaya çıkan duysal sonuç’ olarak adlandırılmıştır (Alves and Asfora, 2011), (Kenshalo and Willis, 1991). Holmes ve Behan daha sonra spinal kord lezyonları sonucu ortaya çıkan ağrıyı önceki tanımlara benzeterak santral ağrı terimini ortaya atmıştır (Scadding, 2004). Periferel sinir ve sinir kökü lezyonları sonucunda ortaya çıkan ağrı 19. yüzyılların ortasında gösterilmiştir. Silas Weir Mitchell periferel sinir travması sonucu oluşan kozaljiyi tanımlamış ve bu kozalji periferel nöropatik ağrının patofizyolojisi için temel oluşturmuştur (Finnerup, Kuner, and Jensen, 2021). Ancak Denmark daha öncelerinde İspanya sivil savaşında ortaya çıkan kozaljiyi radyal sinir hasarından dolayı olduğunu göstererek bilinen ilk tanımı ortaya atmıştır (Iolascon, de Sire, Moretti, and Gimigliano, 2015).

### **2.2.2. Nöropatik Ağrının Epidemiyolojisi**

Nöropatik ağrının insidans ve prevalansı tanı kriterlerinin eksikliğinden kaynaklı olarak tam olarak hesaplanamamaktadır. Nöropatik ağrı tanısının kronik ağrı çeken popülasyonda genellikle spesifik durumlara uyularak konulması temsili prevalansı belirlemek için kullanılmaktadır (Yawn et al., 2009). Bu spesifik durumlar

postherpetik nöralji, ağrılı diyabetik polinöropati, cerrahi sonrası nöropatik ağrı, multipl skleroz, spinal kord hasarı, felç ve kanser olarak sıralanmaktadır (DiBonaventura et al., 2017). Yakın zamanda geliştirilen izleme teknolojileri birçok farklı ülkede (İngiltere, Amerika, Fransa, Brezilya) epidemiyolojik araştırmalara olanak sağlamış ve nöropatik ağrının prevalansı hakkında değerli bilgileri ortaya çıkarmıştır (Mulvey, Bennett, Liwowsky, and Freynhagen, 2014)]. Bu gelişmiş yöntemler aracılığı ile yapılan testlerde nöropatik karakterdeki kronik ağrının görülme sıklığı %7-10 olarak belirlenmiştir (Yawn et al., 2009). Kronik nöropatik ağrı kadınlarda daha sık (%8 kadın, %5,7 erkek) 50 yaş sonrasında anlamlı derecede artan, bacakları sırtı boynu ve üst ekstremiteleri etkilemekte olan bir ağrıdır (VanDenKerkhof et al., 2016)]. Araştırmalara göre lomber ve servikal ağrılı radikülopatiler kronik nöropatik ağrının en sık karşılaşılan sebepleridir (Iyer and Kim, 2016). Bu bilgilerden hareketle 12000'den fazla hastayla yapılan çalışmada hastaların %40'ının nöropatik ağrıyı çağrıştıran semptomları gösterdiğini ve kronik ağrı ile radikülopatinin çoğunlukta eşlik ettiğini göstermiştir (Edwards et al., 2016)

### **2.2.3. Nöropatik Ağrının Patofizyolojisi**

Ağrı alanında yapılan son çalışmalar santral sinir sisteminde sinir hasarı sonrasında ortaya çıkan plastik değişiklikler üzerinde odaklanmıştır (Mansour, Farmer, Baliki, and Apkarian, 2014). Santral nöropatik ağrı spinal kord ve beyinde oluşan lezyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Somatosensöriyel yolları etkileyen inme ve özellikle Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda nöropatik ağrı görülmektedir. (Tsuda, Koga, Chen, and Zhuo, 2017). Demiyelinizan hastalıklarda ve spinal kord yaralanmalarında ortaya çıkan nöronal hasar nöropatik ağrıya neden olmaktadır (de Tommaso et al., 2016). Periferik hastalıklarda ortaya çıkan nöropatik ağrı ise bunların tersine farklı modülasyonları içermektedir. Periferik nöropatik ağrı yaşlanan popülasyonda sıklıkla görülmekte ve sensöriyel iletideki artış sonucu ortaya çıkmaktadır (Baron et al., 2017). Periferik nöropatik ağrı jeneralize ve fokal olarak alt gruplara ayrılabilir. Jeneralize periferik nöropatik ağrı diyabette, metabolik disfonksiyonda, enfeksiyon hastalıklarında, kalıtsal nöropatilerde görülmektedir. Bu hastalıklarda görülen ağrı tipik olarak distal ekstremitelerde görülmektedir, fakat bazı durumlarda ağrı gövde, kasıklar ve omuzlar gibi proksimal dağılım da göstermektedir. Genellikle bu durum duysal gangliyonlarda görülen patolojiler sonucu ortaya çıkmaktadır. Ağrılı fokal periferik hastalıklarda bir veya birden fazla periferik sinir ve

sinir kökü rol oynamaktadır. Bu hastalıklardan bazıları ise postherpetik nöralji, post travmatik nöropati, ve cerrahi sonrası nöropati,sevikal ve lumbar poliradikülopatidir (Attal et al., 2008), (Szok, Tajti, Nyari, and Vecsei, 2019).

Son olarak nadir görülen iyon kanalı kaynaklı karakteristik ağrılar ise eritromelalji gibi SCN9A (Sodyum voltaj kapılı kanalı alfa altünitesi 9) genindeki mutasyonlar nedeni ile ortaya çıkmaktadır (Reimann et al., 2010). Periferel nöropati duysal nöronların elektriksel aktivitesini değiştirdiğinden internöronal ve inen yolaktaki kontrol sistemlerini bozmaktadır (Tobaldini, Sardi, Guilhen, and Fischer, 2019). Bu nedenle bu dengesizlik spinal kordun dorsal boynuzunda ortaya çıkarak ağrı şiddetinde değişikliğe neden olmaktadır (Meacham, Shepherd, Mohapatra, and Haroutounian, 2017; Shiao and Lee-Kubli, 2018). Primer afferent liflerde ortaya çıkan ektojik aktivite periferel sinir hasarı sonucu ortaya çıkan nöropatik ağrının patofizyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır (Parada, Tambeli, Green, and Cairns, 2012). Ağrılı diyabetik polinöropati ve travmatik sinir hasarı geçirmiş hastalarda periferel sinirin bloklanması ile ağrı hissinin tamamen ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (Abram, 2000). Buna benzer olarak lidokainin epidural uygulanmasının fantom ağrıyı giderdiği gösterilmiştir (H. Wang et al., 2018). Daha sonra mikronörografi yöntemi ile yapılan çalışmalar C liflerindeki spontan aktiviteyi göstermiş ve bu aktivitenin ağrıya direk olarak ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır (Namer et al., 2009).

İyon kanallarındaki (sodyum, kalsiyum ve potasyum) değişiklikler spinal kord ve beyin iletim yollarını etkileyerek nöropatiye neden olmaktadır (Vicario et al., 2020). Örneğin spinal kord terminallerinde sodyum kanallarının ekspresyonu veya fonksiyonlarının değişmesinin daha çok uyarılmaya dolayısıyla sinyal transdüksiyonunda artmaya neden olduğu gösterilmiştir (Vysokov, McMahon, and Raouf, 2019), (Boadas-Vaello et al., 2016). Ayrıca normalde nöronal aktiviteyi modüle eden potasyum kanallarının ekspresyonunun azaldığı da bilinmektedir (Abd-Elseyed, Jackson, Gu, Fiala, and Gu, 2019). Her ne kadar periferde bulunan afferent lifler yaralanma veya lezyon sonucu kopsa da geri kalan liflerin hasar bölgesindeki ektojik aktivitesi hissiz bölgede ağrıya neden olabilir. Geri kalan liflerin fazla uyarılarak ağrıya neden olması onların irritabl nosiseptör olarak adlandırılmasına neden olmuştur.

Periferel afferent liflerden gelen uyarı ile eksitatör aminoasitlerin

saliverilmesiyle postsinaptik değişiklikler meydana gelir, özellikle de NMDA ve AMPA reseptörlerinin fosforilasyonu ile sekonder değişiklikler oluşur, sonucunda da ağrı hissinde artma yani allodini meydana gelir (Y. Wang et al., 2010), (X. H. Li, H. H. Miao, and M. Zhuo, 2019). Ayrıca inhibitör internöronlarda bulunan GABA saliverilmesinin azalması bu mekanizmada rol oynadığı düşünölen başka bir etkidir (C. Li et al., 2019). Bunlara ek olarak spinal kordda bulunan mikroglia ve astrosit gibi nöron dışı hücrelerde ortaya çıkan fonksiyonel değişikliklerin hipersensitiviteye neden olduğu gösterilmiştir (Dubový, Klusáková, Hradilová-Svíženská, Joukal, and Boadas-Vaello, 2018), (Ji, Donnelly, and Nedergaard, 2019).

Ağrı transmisyonundaki uyarıcı değişimlerin yanı sıra internöronal disfonksiyonun rolü son yıllarda nöropatinin mekanizmasında önem kazanmıştır (Yin, Yi, and Kim, 2018). Talamus ve kortekse çıkan yolaklardaki değişiklikler artmış ağrı hissi, anksiyete, depresyon ve uyku problemine neden olarak limbik fonksiyonu baskılamaktadır (Ab Aziz and Ahmad, 2006). Singulat korteks ve amigdalada ağrı hissini uyarılması komorbidite ile ilişkilendirilmiştir (Juarez-Salinas et al., 2019). Özellikle bu bölgeden çıkan projeksiyonlar inen kontrol yolaklarını periakuaduktal seviyede etkileyerek sinyali modöle etmektedir. Birçok çalışma beyin kökündeki eksitator yolakların ağrı durumunun devamlılığında rol oynadığını göstermiştir. Noradrenerjik inhibisyonlar spinal kordta  $\alpha$ -2 adrenerjik reseptörleri üzerinden gerçekleşmekte ve nöropatik ağrıda azaldığı bilinmektedir (Di Cesare Mannelli et al., 2017). Serotonerjik sinyalin 5HT<sub>2</sub> ve 5HT<sub>3</sub> aracılığıyla güçlendiği ve nöropatik ağrıyı şiddetlendirdiği bilinmektedir (Cortes-Altamirano et al., 2018).

#### **2.2.4. Periferik Sinir Hasarı ve Nöropatik Ağrı İlişkisi**

Periferik sinir hasarı, immün hücrelerin hasar gören sinirde ani aktivasyonu ile inflamatuvar ve oksidatif stresin eşlik ettiği kaskatla başlar (A. Areti, V. G. Yerra, V. Naidu, and A. Kumar, 2014a). İlk olarak mast hücreleri sinir hücrelerinden histamin ve TNF- $\alpha$  saliverilmesine dolayısıyla da nötrofil ve makrofaj yanıtına neden olurlar. Periferik affarent liflerde mast hücresi aktivasyonunun mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olsa da hasarlı bölgeden salgılanan adenosin ve bradikininin konsantrasyonunun artmasıyla ilişkili olduğu düşünölmektedir. Ayrıca bu hücrelerden salınan kemokinler nötrofillerin migrasyonuna ve hasar gören sinir etrafında invazyonuna neden olurlar. Yapılan çalışmalar nötrofillerin nöropatik ağrıda görölen hiperaljeziye sitokin salınımıyla ve makrofajların aktivasyonu ile neden olduğunu

göstermiştir (Cunha et al., 2008).

Periferal sinir hasarı sonrasında makrofajların mikro çevrede MCP-1, MIP-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  salıverilmesini arttırmasıyla periferal affarent lifleri uyaran birçok sinyal yolağında değişikliğe neden olurlar. Schwann hücreleri sinir hasarı gören bölgede aksonları sararak aktive olurlar. Yukarıda bahsettiğimiz gibi makrofajlardan salınan sinir büyüme faktörü (NGF) schwann hücrelerinde aktivasyonu kuvvetlendirir. Ayrıca periferik glial hücreleri TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, ATP gibi birçok değişik aljezik mediatörü sentezleyerek patolojinin hasarı ve tamirinde rol oynar. İmmün ve inflamatuvar hücreler tarafından salınan bradikinin, serotonin, serbest oksijen radikalleri ve nörotrofinler nöropatiye ve periferal liflerin sensitizasyonu sonucu hiperaljeziye neden olurlar.

Periferal sinir hasarı spinal kord seviyesinde duysal nöronların modülatör etkilerinde değişikliğe neden olur. Bu değişikliğin nöroinflamasyon kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bu inflamatuvar olayda iki çeşit immün hücrenin etkili olduğu gösterilmiştir (J.-M. Zhang and An, 2007). Spinal seviyede glial hücrelerin ve lökositlerin varlığı, makrofaj ve T hücrelerinin periferal sinir hasarından sonra spinal korda migrasyonu gösterilmiş fakat bu değişimin nöroinflamasyonla olan ilişkisi hala tam olarak aydınlatılmamıştır. Mikroglia, oligodentrosit ve astroglia santral sinir sisteminin glial hücreleri olarak adlandırılmakta fakat nöroinflamasyonun başlangıç fazında mikroglial hücreler öne çıkmaktadır. Mikroglial hücreler içerisinde her ne kadar hangi hücrenin sorumlu olduğu tam olarak aydınlatılmamış olsa da P2X4 reseptörüne sahip olanların bu rolü üstlendiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Tsuda, Masuda, Tozaki-Saitoh, and Inoue, 2013). Periferal sinir hasarı ortaya çıkan nöroinflamasyonun nöronlardan ATP salıverilmesine ATP'nin ise mikroglialarda bulunan P2X4 reseptörlerine bağlanarak sitokin ve diğer inflamatuvar maddeleri sentezleyerek periferal sinir hasarında rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca bu hücrelerin kendilerini indükleyici mekanizmalara sahip olması var olan yanıtın inflamasyonun şiddetlenmesi durumunda sürekliliğine neden olur. Mikroglial aktivasyon sonrasında p38 MAP kinaz forforilasyonu ile birçok mekanizmayı harekete geçirmesi DRG nöronlarında inflamasyonun ve mikroglial sentezin artmasına neden olur (Jin, Zhuang, Woolf, and Ji, 2003). Ayrıca bu mekanizmada ortaya çıkan mediatörlerin spinal kord DRG ve santral sinir sisteminde birçok farklı mekanizmayı tetiklediği ve bu mekanizmalarında nöroinflamasyonun sürekliliğinde rol oynadığı

düşünülmektedir (Bates et al., 2019).

### **2.2.5. Nöropatik Ağrı Tedavisinde Kullanılan İlaçlar**

Nöropatik ağrının tedavisi günümüzde büyük çoğunlukta ortaya çıkan semptomların giderilmesine odaklanır ve genellikle diabetes mellitus gibi etkenlerin tedavisi ile dolaylı yoldan sağlanmaya çalışılmıştır. Nöropatik ağrıda hastalar genellikle nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlara, asetaminofene, zayıf opioidlere cevap vermezler. Geleneksel tedavi, koruyucu farmakolojik terapiler ve nöromodülasyonla sinir iletimi üzerine olası invaziv yöntemleri içermektedir. Fakat ilaçların kısıtlı etkileri, popülasyonun yaşlanması, yaşlılarda polifarmasi, opioid ilişkili yan etkilerin ortaya çıkması fiziksel tedavilerin (spinal kord stimülasyonu, derin beyin stimülasyonu, intratekal terapiler, psikolojik terapi, epidural ve transkraniyal nörostimülasyon) kullanımını artırmaktadır. Bu nedenle yeni tedavi alternatiflerine ve yan etki profili düşük mekanizmalar üzerine etki eden ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Teröpatik tedavilerde birçok farklı sınıftan ilaçlar kullanılmaktadır. 1966'dan günümüze yapılan meta analiz çalışmalarında pregabalin, gabapentin, duloksetin, trisiklik antidepresanlar öne çıkmaktadır. Her ne kadar bu ilaçlar belirli faydalar sağlasa da ilk basamak tedavi olarak adlandırılmaktadır. Yüksek doz kapsaisin, lidokain ve tramadol içeren transdermal preparatlar ikinci basamak tedavi olarak kabul edilmektedir. Üçüncü basamakta da potent opioidler ve botilinyum toksini kullanılmaktadır. Fakat tüm bu tedaviler sonucunda ancak %50 oranında ağrı azalma sağlamaktadır (Tablo 2.1.)

Tablo 2.1. Nöropatik ağrı tedavisinde kullanılan ilaçlar

İlaçlar	Terapötik doz	Süre	Yan etkiler
<b>İlk basamak</b>			
<b>Trisiklik antidepresanlar</b>			
Nortriptilin, Amitriptilin, İmipiramin	25-150 mg	6-8 hafta	Sedasyon, antikolinerjik etkiler (ağız kuruluğu, konstipasyon, üriner retansiyon), ortostatik hipotansiyon
<b>Serotonin ve noradrenalin geri alım inhibitörleri</b>			
Duloksetin	30-120 mg	4 hafta	Asteni, yorgunluk, mide bulantısı, kusma, ağız kuruluğu, sedasyon, tremor
Venlafaksin	37.5-225 mg	4-6 hafta	
<b>Antikonvülzanlar</b>			
Gabapentin	100-3600 mg	3-8 hafta	Sedasyon, sersemlik, periferik ödem, ataksi
Pregabalin	150-600 mg	4 hafta	
Karbamazepin	100-1200 mg	4 hafta	
<b>Topikal ajanlar</b>			
Lidokain	Günde 3 flaster	3 hafta	Cilt döküntüsü, eritem, kaşınma ve yanma hissi
<b>İkinci basamak</b>			
<b>Opioidler</b>			
Fentanil	25-100 mikrogram	4 hafta	Mide bulantısı, kusma, konstipasyon, sersemlik
Morfin	15-200 mg	4-6 hafta	
Tramadol	50-400 mg	4 hafta	
<b>Üçüncü basamak</b>			
<b>Diğer antikonvülzanlar</b>			
Lamotrijin	25-400 mg	4-6 hafta	Sersemlik, yorgunluk, ciltte döküntü, hiponatremi
Okskarbazepin	300-1800 mg	4 hafta	
<b>Diğer antidepresanlar</b>			
Sitalopram	10-40 mg	4 hafta	

<b>Paroksetin</b>			Mide bulantısı, kusma, sersemlik, ajitasyon, tremor
<b>Bupropion</b>	100-400 mg	3 hafta	Uykusuzluk, anoreksi, ajitasyon, tinnitus, baş ağrısı
<b>NMDA reseptör antagonistleri</b>			
<b>Mematin</b>	10-20 mg	4-6 hafta	Baş dönmesi, baş ağrısı, konstipasyon, sersemlik
<b>Topikal ajanlar</b>			
<b>Kapsaisin</b>	%0.025	4-6 hafta	Ciltte döküntü, eritem, yanma hissi
<b>GABA<sub>B</sub> reseptör agonistleri</b>			
<b>Baklofen</b>	40-80 mg	4 hafta	Sersemlik, ataksi, sedasyon

### 2.2.6. Nöropatik Ağrı ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri (ROS) özellikle santral sinir sistemi hastalıklarında temel rol oynadığı düşünülen hücrel mekanizmalardandır. Oksidatif stres; hücrelerde artmış oksidan bileşiklerin artması, antioksidan savunma yapan ürünlerin azalması ve oksidatif hasarın tamir mekanizmalarının bozulması olarak üç temel nedenden ortaya çıkar. Serbest radikaller veya ROS ile indüklenen hücre hasarı antioksidan mekanizmalarla nötralize edilir (Carrasco, Naziroğlu, Rodríguez, and Pariente, 2018). Bu mekanizmalar da endojen olarak bulunan antioksidan enzimler ve ürünlerdir. Reaktif oksijen türlerinin temel kaynağı aerobik solunum, peroksizomal  $\beta$  oksidasyonu, arjinin metabolizması ve doku spesifik enzimlerdir. Kontrol edilmediği durumda serbest oksijen türleri hücrenin yapısal enzimleri, lipit, DNA yapılarına ve membranlara saldırarak geri dönüşsüz hasara neden olur. Fizyolojik koşullarda reaktif oksijen türleri süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon, vitamin C ve E tarafından uzaklaştırılmaktadır (Yowtak et al., 2011). Bu dengenin bozulması oksidatif stresin zamanla artmasına neden olur. Her ne kadar oksidatif stresle ilgili yapılan çalışmalar çok olsa da serbest oksijen türleri ve oksidatif stresin ağrı, kronik ağrı ve ağrının hücrel mekanizmaları üzerindeki etkileri hakkındaki bilgiler kısıtlıdır.

Kronik konstrüksiyon hasarı modelinde ısıya bağlı hiperaljezinin sistemik antioksidan uygulaması ile azalması daha önceki yapılan çalışmalarda gösterilmiştir

(Yowtak et al., 2011). Ayrıca bir nöropatik ağrı modeli olan spinal sinir ligasyonunda güçlü bir serbest radikal temizleyici ajan olan fenil-N-tersiyer-bütülnitronun (PBN) mekanik allodiniyi azalttığı gösterilmiştir (Fidanboyu, Griffiths, and Flatters, 2011). Her ne kadar yapılan çalışmalar kısıtlı olsa da in vitro ortamda gerçekleştirilen araştırmalar antioksidanların çeşitli stimulanlarla indüklenen nöron hasarını azalttığını göstermiştir (Yowtak et al., 2011). Nörodegeneratif hastalıklarda ve nöronal hasarda oksidatif hasarın ayrıca fizyolojik olarak rejenerasyon mekanizmalarına etkileri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sinir dokusunun antioksidan defans açısından fakir olmasının antioksidan tedavinin faydalı etkileri hipoteziyle uyumaktadır (Jia, Wang, Han, Zhang, and Guo, 2019). N-asetilsistein ile yapılan çalışma sonucunda reaktif oksijen türlerinin azaltılmasının endonöronal sinir hasarını ve lipit peroksidasyonunu engelleyerek sinir rejenerasyonunu hızlandırdığı gösterilmiştir. Ayrıca N-asetilsisteinin kronik konstrüksiyona bağlı nöropatiyi sıçanlarda azalttığı gösterilmiştir (J. Li et al., 2016)

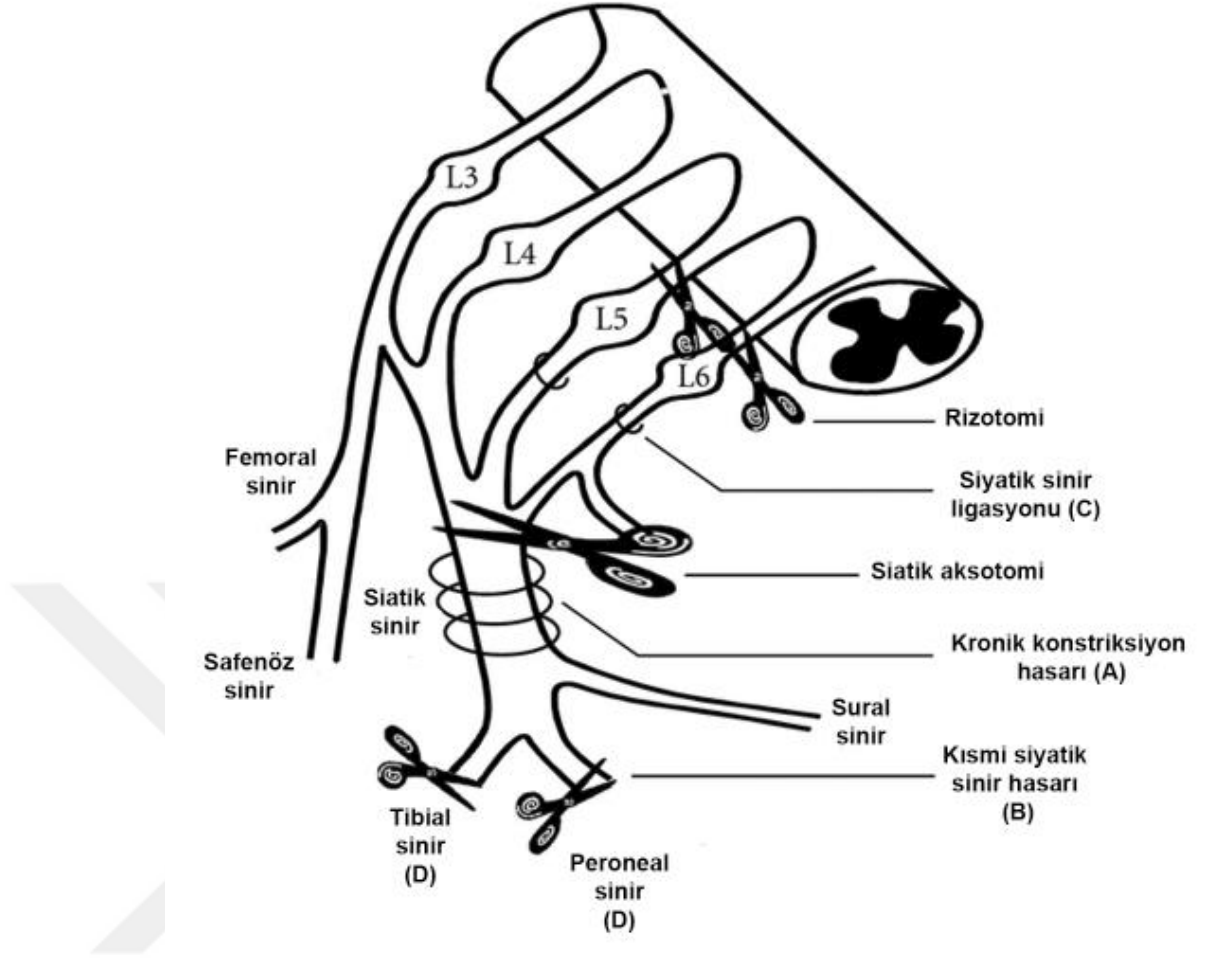
Nöropatik ağrıda hiperaljezinin antioksidan tedavi ile azaltılmasının endonöral lipit peroksidasyonunun azalması yoluyla düzenlendiği düşünülmektedir. Reaktif oksijen türlerinin artmış toksik hidroksi radikalleri sonucu sitoplazmada aşırı düzeyde biriken kalsiyum ve peroksinitrit bileşikler yolu ile nöron hasarı oluşturduğu gösterilmiştir (Salvemini, Little, Doyle, and Neumann, 2011). Bu hasarın primer afferentlerden ektopik deşarjları artırarak spinal kord düzeyinde nöropatik ağrıyı kötüleştirdiği gösterilmiştir. Buna ek olarak aşırı düzeydeki serbest oksijen radikallerinin spinal kord ve beyinde savunma mekanizmaları olarak çalışan glial hücreleri harekete geçirerek oksidan-inflamatuvar süreci hızlandırdığı bilinmektedir. Aşırı düzeyde serbest oksijen radikalleri spinal kordun dorsal boynuz hücrelerini sensitize ederek santral sensitizasyona neden olmaktadır (Bae et al., 2018). Bu kısır döngü oksidatif stres inflamasyon ve sinir hasarı arasında serbest oksijen radikallerinin varlığı süresince devam etmektedir.

### **2.2.7. Nöropatik Ağrının Araştırılmasında Kullanılan Deneysel Modeller**

İnsanlarda nöropatik ağrı araştırmalarında kullanılan deneysel modeller subjektif ve etik engellerle karşılaşılmamasından dolayı genellikle deney hayvanlarında gerçekleştirilmektedir. Klinik ağrı modelleri sinir hasarına bağlı olarak deney hayvanlarında insanda oluşan patolojiyi taklit ederek genellikle travmatik, metabolik veya kimyasal indüksiyon yoluyla oluşturulmaktadır. Diyabete bağlı nöropatik ağrının

oluşturulması için yapılan çalışmalar nöropatik ağrının kısmi sinir hasarı ve anormal nöronal aktiviteden oluştuğu hipotezini güçlendirmiştir. 1979 yılında Wall ve arkadaşları orta kasık seviyesinden deney hayvanlarının siyatik sinirini transekte ederek basit bir model oluşturmuştur (Woolf, 1987). Fakat sinir hasarına bağlı, ağrıyla beraber ortaya çıkan ilk model olan siyatik sinirin konstrüksiyonu ise Bennett ve Xie tarafından 1988’de oluşturulmuş ve mekanik ve termal uyarılara karşı hipersensitivite ile nöropatik ağrıyı başarıyla taklit etmektedir (Sommer, 2007). Fakat daha sonra yapılan çalışmalar nöropatik ağrı modellemesi için birçok farklı modeli ve sinir manipülasyonunu oluşturarak taklit etmeye çalışmıştır. Bu modeller aşağıda sıralanmıştır.

- 1- Kronik konstrüksiyon hasarı: Kemirgenlerde 3 veya 4 adet katgüt kullanılarak siyatik sinirin trifurkasyon seviyesinde bağlanmasıyla oluşturulur. Kimyasal, ısıyla indüklenen, soğuk ve mekanik allodiniyi taklit edebilen spontan ağrının oluşmasını sağlayarak 2 aydan fazla süreyle nöropatik ağrıyı taklit eder (Şekil 2.3.A).
- 2- Kısmi siyatik sinir ligasyonu: Siyatik sinirin 1/3 ü veya 2/3 ünü birleştirerek oluşturulan modeldir. Bu modelde mekanik allodini, ısı ile indüklenen hiperaljezi, spontan ağrı 7 ay boyunca taklit edilebilmektedir (Şekil 2.3.B).
- 3- Spinal sinir ligasyonu: 1 veya 2 spinal sinir (genellikle L5 ve L6) ligasyonu veya sinir gangliyonunun distal kısmının kesilmesi ile oluşturulur. Mekanik, ısı ile indüklenmiş hiperealjezi spontan ağrı ile en az 4 ay ortaya sürmektedir. (Şekil 2.3.C).
- 4- Tibial ve sural transeksiyon: Siyatik sinirin üç kolundan en ikisinin trifurkasyonun distal kısmında olacak şekilde kesilmesiyle oluşturulur (Şekil 2.3.D).



Şekil 2.3. Deneysel siyatik sinir konstriksiyonu modelleri

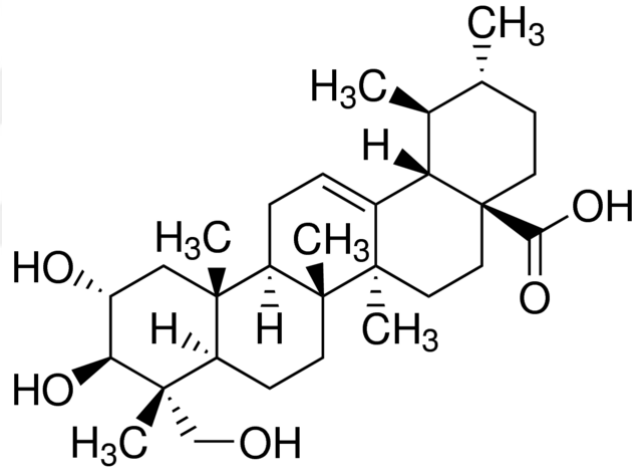
### 2.2.8. Nöropatik Ağrı Testleri

Ağrının birçok farklı boyutunu (nosiseptif, inflamatuvar, nöropatik) inceleyen birçok sayıda test bulunmaktadır. Fakat bu testler genellikle mekanik pençe çekme eşiği ve sıcak soğukla ortaya çıkan termal sensitiviteye karşı kaçma davranışı çerçevesinde yapılmaktadır. Mekanik pençe çekme testi genellikle değişen şiddetle bir kuvvetin deney hayvanının pençesine uygulanmasıyla oluşturulmaktadır. Eşik değeri sinir hasarından sonra anlamlı derecede düşerek hipersensitiviteyi taklit etmektedir. Ayrıca fiziksel kuvvetin yanı sıra tek bir kaynaktan ortaya çıkan termal uyarının deney hayvanına uygulanması ile termal sensitivitedeki değişiklikler gözlenerek nöropatik ağrının oluşumu test edilebilmektedir.

### 2.3. Asiatik Asit

Asiatik asit bir pentasiklik triterpenoiddir. (Şekil 2.4.). Özellikle tüketilebilir tıbbi bitkilerden biri olan centella asiatica bitkisinde bulunan asiatik asit günümüzde

dermal preparatların içerisinde bulunan ve yara tedavisinde kullanılan bir bileşiktir (J. Lv et al., 2018). Asiatik asit'in antioksidan ve antiinflamatuvar etkileriyle birçok hastalığın tedavisinde rol alabileceği ileri sürülmektedir (H. Lv et al., 2017). Asiatik asitin birçok prelinik çalışmada nöroprotektif, nootropik, antimikrobial ve antimitojen etkisi araştırılmıştır. Bu etkilerinden yola çıkarak asiatik asitin sinir hasarının önlenmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir (X. Wang et al., 2017). Ayrıca asiatik asitin oral yolla kullanımının yüksek biyoyararlanıma sahip olması teropötik potansiyele sahip olduğu hastalıklarda kullanılmasının önünü açmıştır. Deneysel hayvan çalışmalarında asiatik asitin nöroprotektif etkisini, hücrel antioksidan etkiyi artırarak nöronlar ve mikroglialar üzerinde gösterdiği düşünülmektedir. Asiatik asitin öğrenme ve belleği hipokampal nörojenezini indükleyerek artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca hidrojen peroksit, rotenon, glutamat ve  $\beta$ -amiloid ile indüklenen nörotoksositeye karşı koruyucu etkisi olduğu ileri sürülmüştür.



Şekil 2.4. Asiatik asitin kimyasal yapısı

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Kimyasallar

Asiatik asit (Sigma-546712), pregabalin (Sigma-1559618) Dulbecco's modified eagle medium/Ham's F12 medium (DMEM/F12, Gibco, 12-634-028), fetal sığır serumu (FBS, Gibco, 11550356), penisilin/streptomisin (10003927), tripsin-EDTA (Gibco, 25200072), dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma, D8418), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT, M5655), sigma steril enjektör filtresi 0.22 µm, metanol (Sigma, 34860), etanol (Sigma, 32205), (dPBS, Gibco, 14190144), rabbit BDNF polyclonal antibody (Cell Signaling, #47808), Goat anti-rabbit secondary antibody (ThermoScientific, #31460), TNF-α elisa kit (#201-11-0765, Sunred, China), interlökin-1β elisa kit (#201-11-0121, Sunred, China), SOD elisa kit (201-11-0169, Sunred, China), GSH elisa kit (#703002, Cayman Chemicals, USA),

MDA elisa kit (201-11-0157, Sunred, China).

### **3.1.2. Cihazlar**

Otoklav (Nüve OT 4060, Türkiye)

Isı bloğu (VWR, ABD)

Vorteks (Clifton Cyclone, İngiltere)

Santrifuj (Nüve NF048, Türkiye)

Hassas terazi (Shimadzu, Japonya)

CO<sub>2</sub>'li inkübatör (Thermoscientific, ABD)

Laminar akımlı sınıf II kabin (Nüve, Türkiye)

Sonikasyon cihazı (NÜVE, Türkiye)

Sıvı azot tankı (International cryogenics, ABD)

Ultrasoğutucu (NÜVE, Türkiye)

Hücre sayma cihazı (Bio-rad TC20, ABD)

Su banyosu (Mettler, ABD)

Mikroplaka çalkalayıcı (HeidolphTitramax 1000,Almanya)

Invert mikroskop (ZeissAxiovert, Almanya)

Mikroplaka okuyucu (TECAN, İsviçre)

Mikropipet seti (Eppendorf, Almanya)

Lokomotor aktivite kafesi (Ugo Basile, İtalya)

Hot plate test cihazı (Ugo Basile, İtalya)

Paw pressure test cihazı (Ugo Basile, İtalya)

## 3.2. Yöntemler

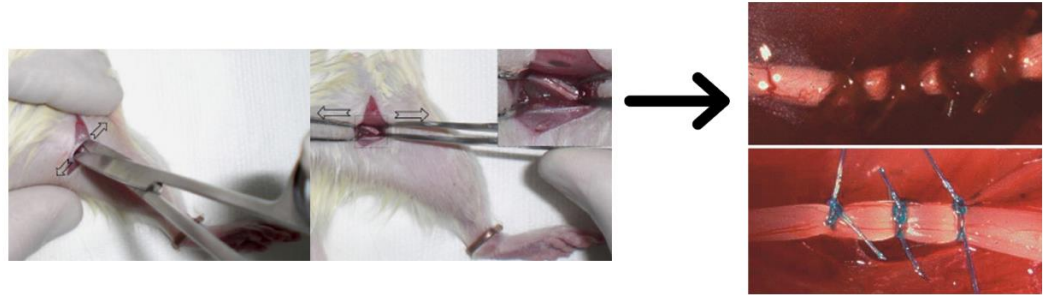
### 3.2.1. İn Vivo deneyler

#### 3.2.1.1. Deney Hayvanları

Deney hayvanları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden yerel etik kurul kararı alındıktan sonra (HADYEK\_2019/06) temin edildi. 42 Adet yetişkin wistar-albino cinsi erkek sıçan 12 saat aydınlık 12 saat karanlık,  $22\pm 0.5^\circ$  derece  $\%55\pm 5$  nem içeren ortamda, bir kafeste 3 deney hayvanını aşmayacak şekilde deneyler gerçekleştirilene kadar sınırsız yem ve su sağlanarak barındırıldı. Deney hayvanları deneylerden önce bir hafta süreyle motor fonksiyon açısından izlenerek motor bozukluk tespit edilenler deneyden çıkartıldı.

#### 3.2.1.2. Deney Modelinin Oluşturulması

Deney hayvanları ketamin/ksilazin (80/10 mg/kg, i.p.) uygulanarak anestezi altına alındı. Deney hayvanlarının sağ uyluk bölgeleri traşlanarak temizlendi. Temizlenen bölge etanol ile silinerek dezenfekte edildi. Steril koşullarda uyluk bölgeleri 3 cm'lik insizyon ile kaudal ve ventral kas gruplarıyla birlikte ayrıldı. Siyatik sinir steril cerrahi aletlerle başka dokulara zarar verilmeden görünür hale getirildi. Femura paralel olarak ayrılan siyatik sinir sham grubundaki deney hayvanları hariç 1 mm aralıklarla 4/0 kromik katgüt ile 3 yerden boğumlandı, sham grubundaki deney hayvanlarının siyatik sinirleri görünür hale getirildikten sonra bağlanmadı. Sonrasında siyatik sinir dikkatlice serbest bırakılarak üst tabakalarındaki kas ve deri katmanları ipek krome ile dikildi. Cerrahi sonrasında antiseptik solüsyon ile temizlendi, hacim kaybının önüne geçilmesi için yaklaşık olarak 5 ml fizyolojik tuzlu su deri altına uygulandı (Şekil 3.1.)



Şekil 3.1. Siyatik sinir ligasyonu

### 3.2.1.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Cerrahi işlem sonrasında deney hayvanları tartılarak gruplara ayrıldı. Gruplara uygulanan çözücü, asiyatik asit ve pregabalin dozları literatürde etkisi gösterilmiş doz ve uygulama şekli bilgilerinden hareketle belirlendi.

**Sham Grubu:** Bu grupta bulunan deney hayvanlarına yalnızca cerrahi işlem uygulandı. Siyatik sinir ağığa çıkarıldı, sinir ligasyonu yapılmadan dokular sütur ile kapatıldı, ilaç uygulanmadı.

**Kontrol Grubu:** Bu grupta bulunan deney hayvanlarına cerrahi işlem yapılarak siyatik sinir konstriksiyonu yapıldı. Ayrıca 14 gün boyunca asiyatik asit çözücüsü olan PEG400 (1ml/kg, p.o.) her gün aynı saatte uygulandı.

**Asiyatik Asit 3 mg/kg Grubu:** Bu grupta bulunan deney hayvanlarına cerrahi işlem yapılarak siyatik sinir konstriksiyonu yapıldı. Ayrıca 14 gün boyunca asiyatik asit (3 mg/kg, p.o.) her gün aynı saatte uygulandı.

**Asiyatik Asit 10 mg/kg Grubu:** Bu grupta bulunan deney hayvanlarına cerrahi işlem yapılarak siyatik sinir konstriksiyonu yapıldı. Ayrıca 14 gün boyunca asiyatik asit (10 mg/kg, p.o.) her gün aynı saatte uygulandı.

**Asiyatik Asit 30 mg/kg Grubu:** Bu grupta bulunan deney hayvanlarına cerrahi işlem yapılarak siyatik sinir konstriksiyonu yapıldı. Ayrıca 14 gün boyunca asiyatik asit (30 mg/kg, p.o.) her gün aynı saatte uygulandı.

**Pregabalin Grubu:** Bu grupta bulunan deney hayvanlarına cerrahi işlem yapılarak siyatik sinir konstriksiyonu yapıldı. Ayrıca 14 gün boyunca pregabalin (10 mg/kg, i.p.) her gün aynı saatte uygulandı (H. J. Park et al., 2010).

Tablo 3.1. Deney grupları

Grup adı	İlaç	Uygulama süresi	Hayvan sayısı
Sham	-	-	7
Kontrol	Çözücü (PEG 400, 1 ml/kg)	14 gün	7
AA3	Asiyatik asit 3 mg/kg, p.o.	14 gün	7
AA10	Asiyatik asit 10 mg/kg, p.o.	14 gün	7
AA30	Asiyatik asit 30 mg/kg, p.o.	14 gün	7
PGB	Pregabalin 10 mg/kg, i.p.	14 gün	7

#### 3.2.1.4. Lokomotor Aktivite Testi

Tüm gruplardaki deney hayvanları lokomotor aktivitenin ölçülmesi için vertikal ve horizontal hareketlerin otomatik olarak takip edildiği lokomotor aktivite kafesine (UgoBasile, İtalya) yerleştirildi. Deney hayvanlarının 0., 7., ve 14. günlerde 5 dk boyunca lokomotor aktivitesi kaydedildi

#### 3.2.1.5. Hot Plate Testi

Deney hayvanları özel olarak hazırlanmış olan sıcak tabaka ( $55\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) aparatına (UgoBasile, İtalya) yerleştirildi (Şekil 7). Deney hayvanlarının sıcak yüzeyden arka ayağını çekme ve/veya zıplamasına kadar geçen süre tespit edildi. Dokuda kalıcı hasarın meydana gelmemesi için cut-off süresi 20 sn olarak belirlendi. Testler deneyin 0., 7. ve 14. gününde tekrarlandı.



Şekil 3.2. Hot plate cihazı

#### 3.2.1.6. Paw Pressure Testi

Deney hayvanlarında mekanik hiperaljezinin değerlendirilmesi randall-selitto modeli analjezimetre (UgoBasile, İtalya) ile yapıldı. Cihazın mekanik uyarıcı kısmı deney hayvanlarının her iki arka pençesinin orta noktalarına gelecek şekilde yerleştirilerek artan kuvvetlerde basınç deney hayvanının tepki gösterdiği ana kadar uygulandı. Testler deneyin 7. ve 14. gününde tekrarlandı.

#### 3.2.1.7. Biyokimyasal ve Moleküler Analizler

Deney hayvanları davranış testlerinin sonlandırılmasının ardından mekanik giyotin yardımı ile sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen deney hayvanlarından spinal kord,

siyatik sinir ve beyin dokuları buzun üzerinde izole edildi.

Spinal kord ve beyin dokuları RIPA (Radio immuno precipitation assay buffer) ve PBS (fosfat tamponlu salin) çözeltisi ile cam homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. İzole edilen bu dokulardan Lowry yöntemiyle total protein miktarları tayin edildi. ELISA analizinde kullanılacak olan dokular piyasada ticari olarak satılmakta olan ELISA kitlerinin talimatları doğrultusunda işlemlere tabi tutuldu. ELISA yöntemi ile spinal kord ve total beyin dokusunda TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  tayin edildi. Western blot analizleri için spinal kord ve beyin örnekleri yükleme tamponu ile 95 derecede 5 dakika ısıtılarak protein denaturasyonu sağlandı. Eşit miktarda protein içeren örnekler %10 SDS-PAGE jeline yüklenerek elektroforez ile proteinler molekül ağırlıklarına göre ayrıştırıldı. Jelde bulunan proteinler PVDF membrana aktarılarak non spesifik antikor bağlanmasının bağlanmasını engellenmesi için bloklama solüsyonu (%5'lik yağsız süt tozu içeren TBS-T çözeltisi) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. 3 kez 5'er dakika TBS-T çözeltisinde yıkanan membranlar +4°C derecede gece boyunca anti-BDNF primer antikor ile inkübe edildi. Yıkama işleminin tekrarından sonra membranlar sekonder antikorla bir saat oda sıcaklığında muamele edildi. Daha sonra yıkama işlemine tabi tutulan membranlar peroksit-luminol çözeltisi yardımı ile kemilüminesan olarak görüntülendi. Bant yoğunlukları beta aktine göre normalize edilerek kantitatif olarak ImageJ<sup>®</sup> programı ile hesaplandı. Tüm deneyler en az üç tekrarlı yapıldı.

### **3.2.2. İn Vitro Deneyler**

#### **3.2.2.1. Hücre Kültürü**

Periferik nöropatide rolü olduğu daha önceden gösterilmiş olan nöron hasarı ve mikrogliozisin taklit edilmesi adına SH-SY5Y (insan nöroblastoma hücre hattı) ve BV-2 (fare mikrogliya hücre hattı) seçilmiştir. BV-2 ve SH-SY5Y hücreleri %5 karbondioksitli 37,5°C ortamda hücrelerin ekildiği flaskı kaplayana kadar inkübe edildi. Hücrelerin deneylerin yapılacağı plakalara ekilmesi için hücreler %0,25 tripsin/EDTA kullanılarak kaldırıldı. Kaldırılan hücreler hemositometre kullanarak sayıldıktan sonra uygun plakalara ekildi. Öncelikle her iki hücre hattının FBS'i uzaklaştırılarak asiyatik asit ve nöroinflamasyonu taklit etmek için LPS (1  $\mu$ g/ml) uygulandı. Etkili dozların tayin edilmesinden sonra canlılık ve antioksidan analizlere

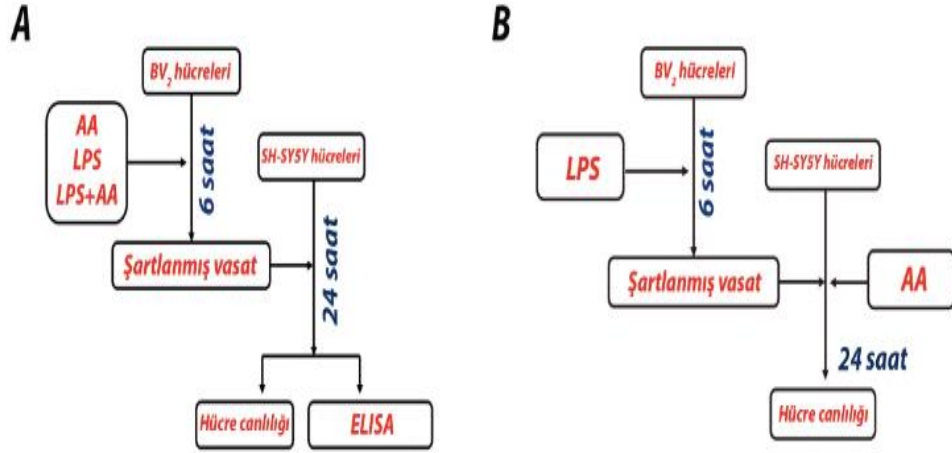
geçildi.

### 3.2.2.2. Sitotoksosite Testleri

Uygulanan ilaçların ve model için kullanılan LPS'nin hücre canlılığını azaltmadan mekanizmayı taklit etmek için kullanılmasını araştırmamız için hücre canlılığını değiştirmeyen konsantrasyonlar seçilmiştir. BV-2 ve SH-SY5Y hücrelerine asiatic asit ve LPS uygulandıktan sonra ortamdan hücre vasatı uzaklaştırılarak hücreler dPBS ile yıkandı. Ardından MTT çözeltisi (1mg/ml) her kuyucuğa eklenerek 37°C sıcaklıkta 4 saat boyunca karanlıkta inkübe edildi. Hücrelerin canlılığını gösteren formazan kristalleri DMSO kullanılarak çözüldü. Absorbanlar oluşan renk karışımının 570 nm'de okunmasıyla belirlendi.

### 3.2.2.3. Hücre Hatlarına İlaç Uygulanması

Nöropatik ağrının oluşması ve oluşan ağrının nöroinflamatuvar mekanizmalar ile ilişkisi invitro ortamda araştırıldı, bu mekanizmaların taklit edilmesi için asiatic asit ve LPS uygulaması aşağıdaki şekilde yapıldı



Şekil 3.3. Hücre hatlarına ilaç uygulaması

### 3.2.2.4. Antioksidan Etkinin Araştırılması

Hücre hatlarında ilaç uygulaması yapıldıktan sonra hücre vasatları izole edilerek oksidatif stres ve antioksidan parametreler araştırıldı. Lipit peroksidasyonu MDA, hücre içi antioksidan seviyeleri SOD ve GSH miktarları tayin edilerek hesaplandı. MDA, SOD ve GSH seviyeleri piyasada ticari olarak satılmakta olan ELISA kitleri

yardımla üreticinin talimatları eksiksiz olarak uygulanarak tayin edildi.

### **3.2.2.5. İstatistiksel Analiz**

Deneyler sonucunda elde edilen tüm veriler SPSS (v21.0 Illionis, US) programıyla analiz edildi. Normal dağılım gösteren veriler one-way ANOVA testi ile incelendi. Gruplar arası karşılaştırmalar Tukey ve Tamhane's T2 testleri ile yapıldı. Tüm veriler ortalama±standart sapma olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p<0.05$  olarak belirlendi.

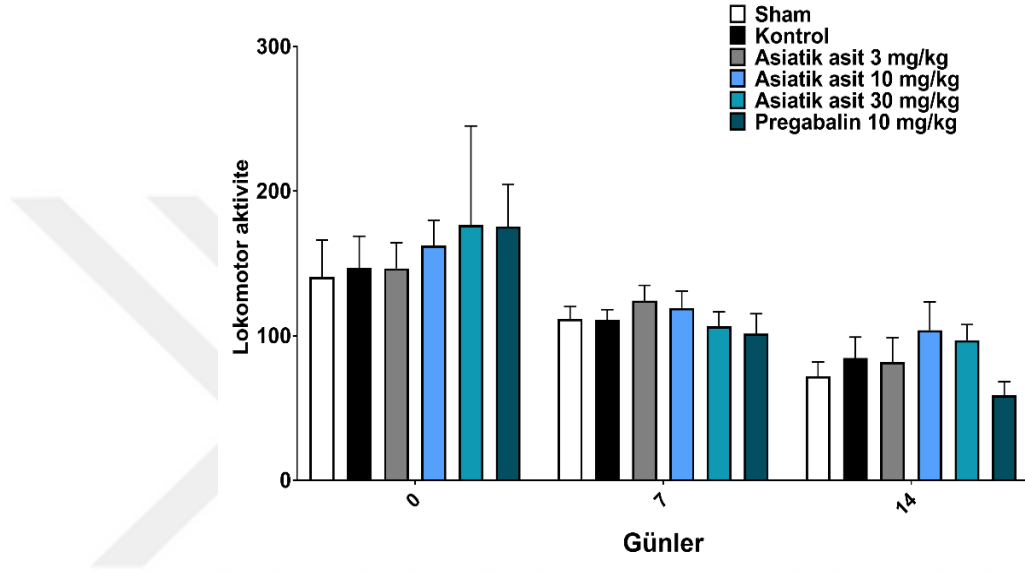


## 4. BULGULAR

### 4.1. İn-Vivo Deney Sonuçları

#### 4.1.1. Asiatik Asitin Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi

Asiatik asit 3, 10 ve 30 mg/kg dozlarında kronik uygulandığında 0., 7. ve 14. günde lokomotor aktivitede değişiklik yapmadı. Pregabalin (10 mg/kg) asiatik asite benzer olarak lokomotor aktivitede değişiklik yapmadı ( $p>0.05$ , Şekil 4.1.).



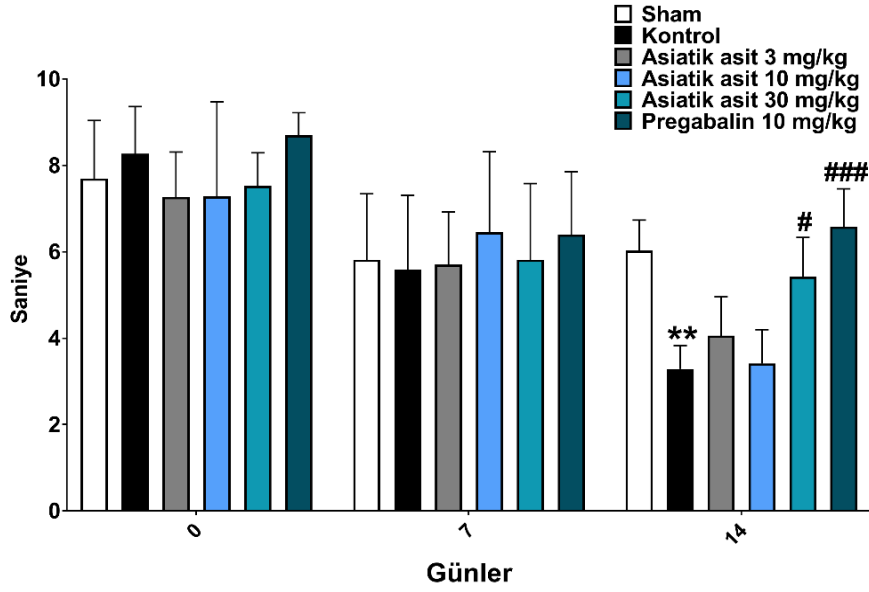
Şekil 4.1. Asiatik asitin (3, 10 ve 30 mg/kg) lokomotor aktivite üzerine etkisi

#### 4.1.2. Asiatik Asitin Hot Plate Testinde Etkisi

Hot plate testinde kronik ilaç uygulaması sonrası;

0. ve 7. günde asiatik asit (3,10,30 mg/kg) ve pregabalin (10 mg/kg) uygulanan gruplarda hot plate latensinde anlamlı bir değişiklik olmadı ( $p>0.05$ , Şekil 4.2.).

14. günde ise kontrol grubu sham grubu ile kıyaslandığında kontrol grubunda latens süresi anlamlı bir şekilde kısaldı ( $p<0.01$ ). İlaç verilen gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında ise asiatik asit 30 mg/kg verilen grupta latens süresi anlamlı bir şekilde uzadı ( $p<0.05$ , şekil 4.2.). Pregabalin 10 mg/kg dozunda da yine benzer şekilde hot plate latensi kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde uzadı ( $p<0.001$ , Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Asiatik asitin (3, 10 ve 30 mg/kg) hot plate latensi üzerine etkisi., (\*\* p<0.01, sham grubuna göre), (### p<0.001, # p<0.05 kontrol grubuna göre)

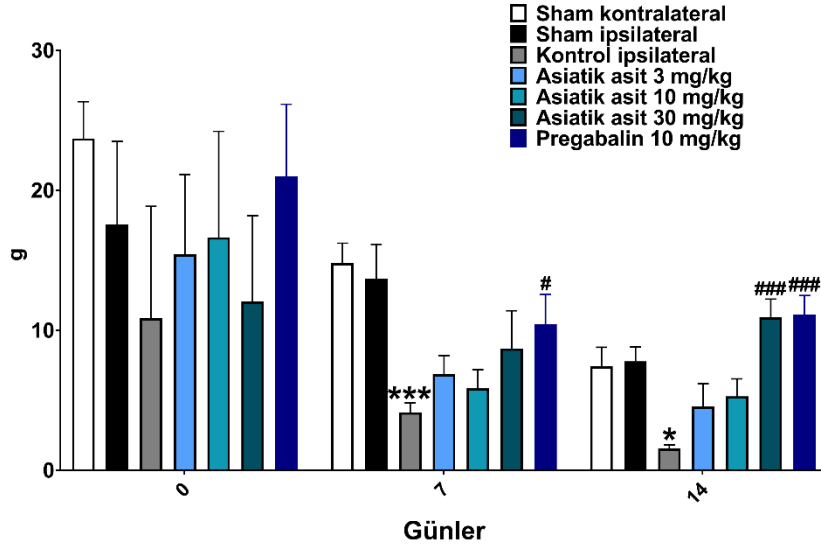
#### 4.1.3. Peñçe Testi Sonuçları

Kronik asiatik asit uygulamasının mekanik allodini üzerine etkileri;

0. günde deney grupları arasında anlamlı bir fark olmadı (p>0.05, Şekil 4.3.).

7. günde peñçe çekme süresi kontrol grubunda sham grubuyla kıyaslandığında anlamlı olarak kısaldı (p<0.001, Şekil 4.3.). Pregabalin 10 mg/kg uygulanan grup kontrol grubuyla kıyaslandığında peñçe çekme süresi anlamlı olarak uzadı (p=0.45, Şekil 4.3.).

14. günde kontrol grubu sham grubuyla kıyaslandığında yine peñçe çekme süresi anlamlı kısaldı (p=0.48, Şekil 4.3.). Asiatik asit 3 ve 10 mg/kg verilen gruplarda peñçe çekme süresinde anlamlı bir değişiklik olmazken, asiatik asit 30 mg/kg dozunda peñçe çekme süresini uzatdı, benzer şekilde pregabalin uygulanan grupta da peñçe çekme süresi uzadı. (p<0.01, Şekil 4.3.)



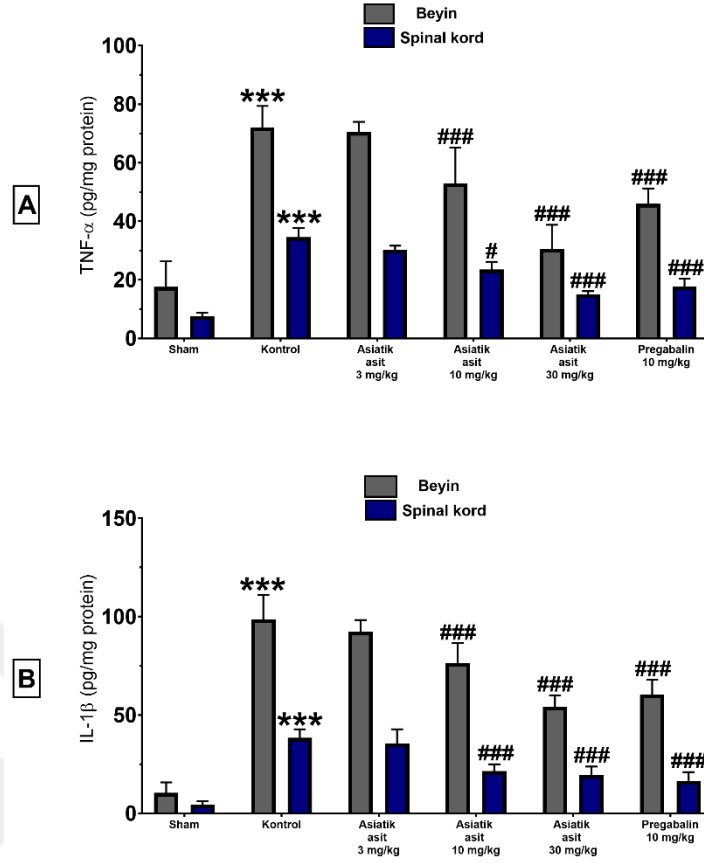
Şekil 4.3. Asiatik asitin (3, 10 ve 30 mg/kg) mekanik allodini üzerine etkisi. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$  sham grubuna göre), (###)  $p < 0.001$ , kontrol grubuna göre)

#### 4.1.4. Beyin ve Spinal Kord TNF- $\alpha$ ve IL-1 $\beta$ Düzeyleri

Yapılan ELİSA analizleri sonucunda siyatik sinir konstriksiyonu yapılan ratların beyin ve spinal kordlarında TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeyleri sham grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttı ( $p < 0.001$  ve  $p < 0.001$ , Şekil 4.4.A, B).

Asiatik asit 10mg/kg ve 30 mg/kg verilen gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında artmış olan TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeylerini anlamlı olarak azalttı. ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.28$ , Şekil 4.4.A, B)

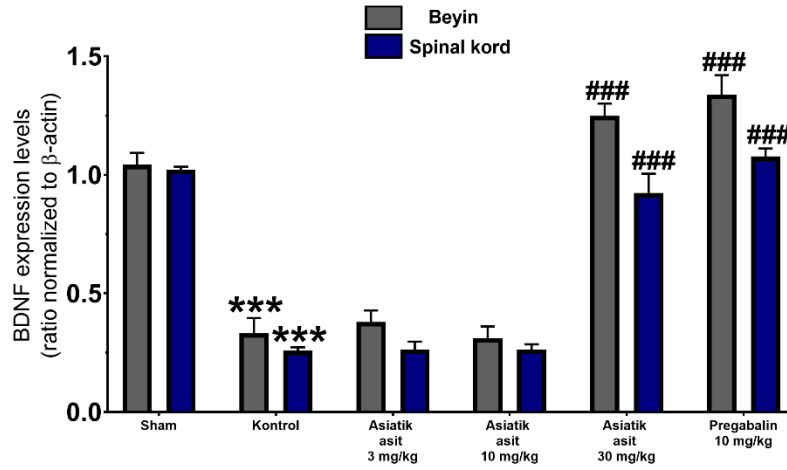
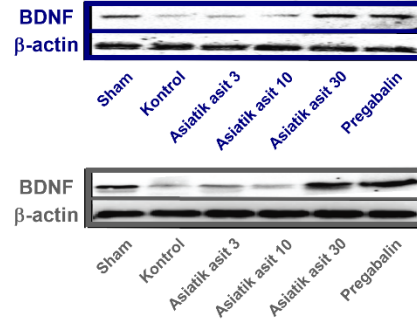
Pregabalin 10mg/kg uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında benzer olarak beyin ve spinal kordda artmış olan TNF alfa ve IL-1 $\beta$  düzeylerini anlamlı olarak azalttı ( $p < 0.001$ , Şekil 4.4.A, B)



Şekil 4.4. Asiatik asitin (3,10, 30 mg/kg) ve pregabalin (10 mg/kg) un beyin ve spinal kord TNF alfa ve IL-1B düzeyine etkisi (\*\*\*)  $p < 0.001$ , sham grubuna göre),  
(###  $p < 0.001$ , kontrol grubuna göre)

#### 4.1.5. Beyin ve Spinal Kord BDNF Ekspresyonunun Ölçülmesi

Western blot analizleri sonucunda beyin ve spinal kordda BDNF ekspresyon düzeyleri kontrol grubu sham grubuyla kıyaslandığında anlamlı olarak azaldı ( $p < 0.001$ , Şekil 15). Asiatik asit 30 mg/kg verilen grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında spinal kord ve beyin BDNF ekspresyonu anlamlı olarak arttı. ( $p < 0.001$ , Şekil 15). Pregabalin 10 mg/kg verilen grupta beyin ve spinal kordda BDNF ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla arttı ( $p < 0.01$ , Şekil 4.5.).



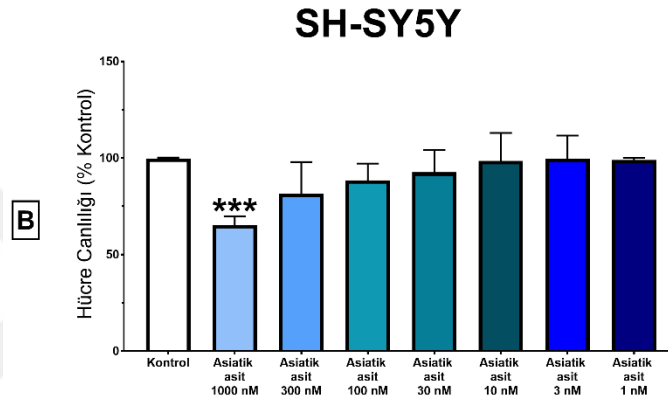
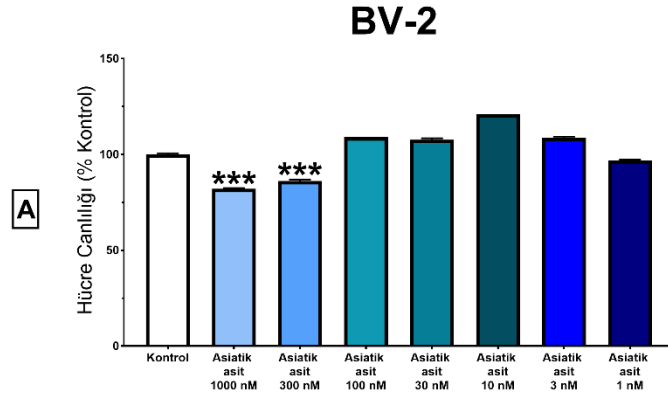
Şekil 4.5. Asiatik asitin ve pregabalinin beyin ve spinal kordda BDNF ekspresyonuna etkisi (\*\*\*)  $p < 0.001$ , sham grubuna göre), (###)  $p < 0.001$ , kontrol grubuna göre)

## 4.2. İn-vitro Deney Sonuçları

### 4.2.1. Asiatik asitin BV-2 ve SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

Asiatik asitin BV-2 Hücrelerine 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1 nM konsantrasyonlarında uygulandığında 1000 ve 300 nM hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı ( $p < 0.001$ , Şekil 4.6.A).

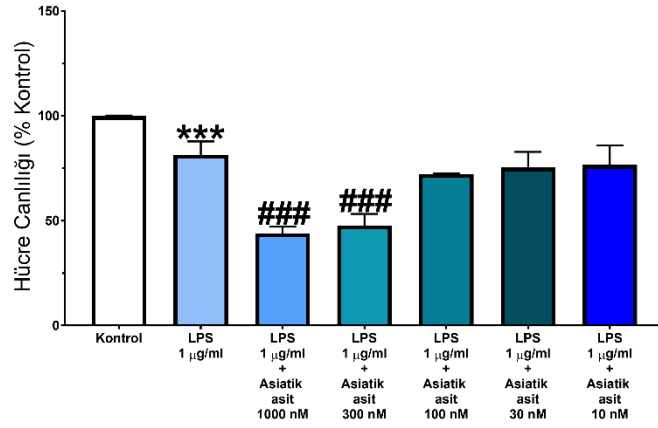
Asiatik asitin SH-SY5Y hücrelerine 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1 nM konsantrasyonlarında uygulandığında 1000 nM konsantrasyonunun hücre canlılığını azalttığı görülmüştür ( $p < 0.001$ , Şekil 4.6.B).



Şekil 4.6. Asiatic asitin BV-2 ve SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkisi (\*\*\*)  $p < 0.001$ , kontrol grubuna göre)

#### 4.2.2. Asiatic asitin LPS ile İndüklenen BV-2 Hücreleri Üzerine Etkisi

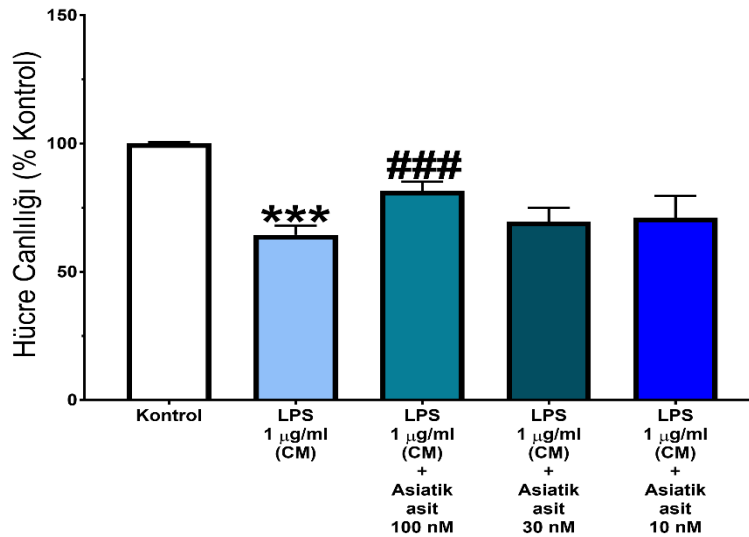
Asiatic asit 10, 30 ve 100 nM konsantrasyonda LPS ile indüklenen hücre canlılığındaki azalma üzerine etkisi olmadı ( $p > 0.05$ , Şekil 18). Ancak 300 ve 1000 nM konsantrasyonda LPS ile indüklenen hücre canlılığındaki azalmayı artırdı ( $p < 0.001$ , Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. BV-2 hücrelerin asiatic asit ve LPS uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi (\*\*\*)  $p < 0.001$ , kontrol grubuna göre), (###  $p < 0.001$ , LPS grubuna göre)

#### 4.2.3. Asiatic Asit ve LPS uygulanan BV-2 Hücrelerinin Mediumlarının SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

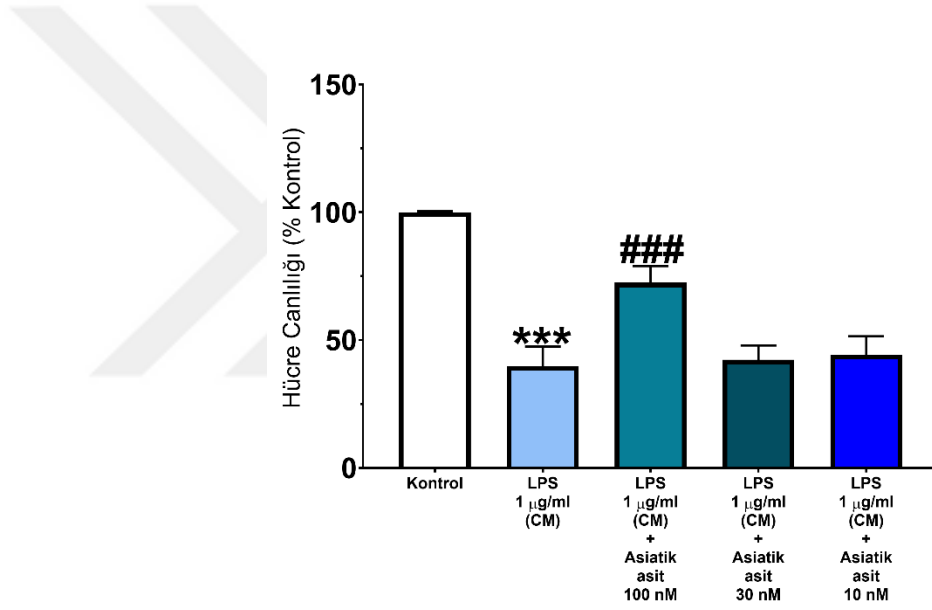
Canlılık testleri sonucundan elde edilen bulgular ile 100, 30, 10 nM asiatic asit ve LPS uygulanan BV-2 hücre vasatları izole edilerek SH-SY5Y hücrelerine uygulandı. LPS ve asiatic asit 100 nM uygulanan vasat yalnızca LPS uygulanan vasatla kıyaslandığında hücre canlılığında anlamlı bir artış oldu ( $p < 0.001$ , Şekil 4.8.)



Şekil 4.8. LPS ile indüklenen BV-2 hücrelerine farklı doz asiatic uygulamasını takiben vasatlarının SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkisi. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , kontrol grubuna göre), (###  $p < 0.001$ , LPS grubuna göre)

#### 4.2.4. LPS ile İndüklenen BV-2 Hücre Mediumlarının SH-SY5Y Hücrelerine Uygulandıktan Sonra Asiatik Asit Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

LPS uygulanan BV-2 hücrelerinin vasatlarının SH-SY5Y hücrelerine uygulandıktan sonra asiatik asitin farklı dozlarda (10, 30, 100 nM) verilmesiyle araştırılmıştır. LPS uygulanmış BV-2 vasatları hücre canlılığını kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir şekilde azalttı. ( $p < 0.001$ , Şekil 20). Asiatik asit 100 nM uygulanan grup LPS uygulanmış grup ile kıyaslandığında hücre canlılığında anlamlı bir artış oldu.



Şekil 4.9. LPS ile İndüklenen BV-2 Hücre Mediumlarının SH-SY5Y Hücrelerine Uygulandıktan Sonra Asiatik Asit Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi (\*\*\*)  $p < 0.001$ , kontrol grubuna göre), (###)  $p < 0.001$ , LPS grubuna göre)

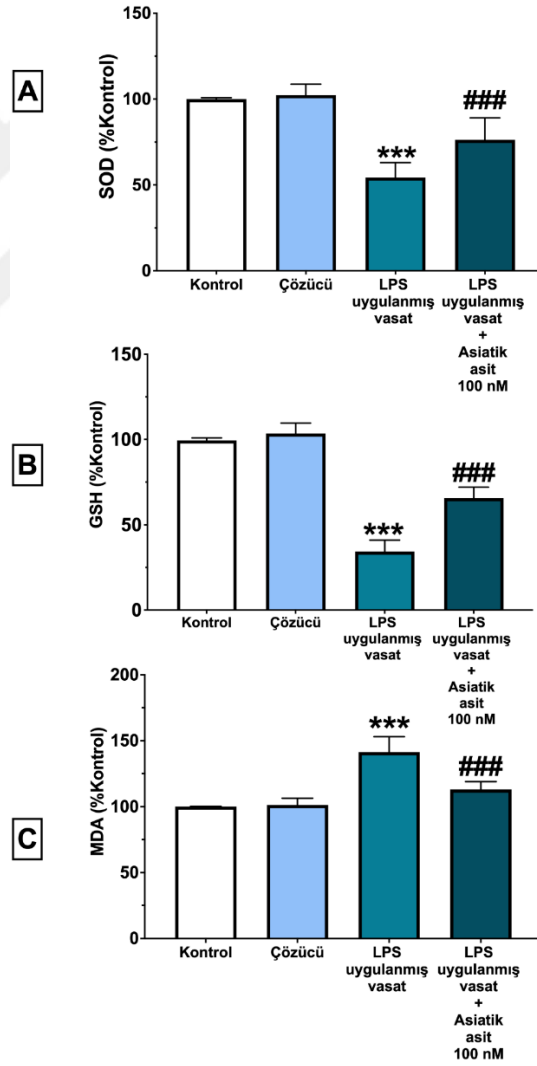
#### 4.2.5. LPS ile İndüklenen BV-2 Hücre Mediumunun SH-SY5Y Hücrelerine Uygulandıktan Sonra Asiatik Asit Uygulamasının SOD, MDA ve GSH Üzerine Etkileri

LPS li vasat uygulanan grup SH-SY5Y hücrelerinde SOD seviyelerini kontrol grubuna kıyaslandığında anlamlı bir şekilde azalttı ( $p < 0.001$ , Şekil 21A). Asiatik asit 100 nM uygulanan grup LPS uygulanan grup ile kıyaslandığında SOD miktarını

anlamli olarak artirdi ( $p < 0.001$ , Şekil 4.10.A).

LPS li vasat uygulanan grup kontrol grubu ile kiyaslandiginda SH-SY5Y hücrelerinde GSH seviyelerini anlamli olarak azaltti. 100 nM asiatic asit uygulanan grup LPS uygulanan grupla kiyaslandiginda GSH seviyesini anlamli olarak artirdi. ( $p < 0.001$ , Şekil 4.10.B).

LPS uygulanan vasatlar SH-SY5Y hücrelerinde MDA seviyesini kontrol grubu ile kiyaslandiginda anlamli olarak artirdi ( $p < 0.01$ , şekil 21C). Asiatic asit uygulanan grup LPS uygulanan grupla kiyaslandiginda MDA miktarini anlamli olarak azaltti ( $p < 0.001$ , Şekil 4.10.C).



Şekil 4.10. LPS ile İndüklenen BV-2 Hücre Mediumunun SH-SY5Y Hücrelerine Uygulandıktan Sonra Asiatic Asit Uygulamasının SOD, MDA ve GSH Üzerine Etkileri (\*\*\*)  $p < 0.001$ , kontrol grubuna göre), (###  $p < 0.001$ , LPS grubuna göre)

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda siyatik sinir konstriksiyonu ile oluşturulan nöropatik ağrı modelinde asiyatik asitin etkilerini davranışsal, biyokimyasal, moleküler yöntemlerle araştırdık. 14 gün boyunca uygulanan asiyatik asit siyatik sinir hasarıyla ortaya çıkan termal hiperaljezi ve mekanik allodininin şiddetini azalttı. Buna ek olarak asiyatik asit siyatik sinir konstriksiyonu sonucunda artan inflamatuvar sitokinleri beyin ve spinal kordda azalttı ve sinir yenilenmesinden sorumlu olan bir nörotrofik faktör olan BDNF yi arttırdı. Ayrıca invitro çalışmalarımız asiyatik asitin mikroglyal aktivasyon sonucu nöronlara verdiği hasarı azalttığı ve mikroglyozis nedeniyle nöronlarda oluşan oksidatif stresi engelledi. Çalışmamız asiyatik asitin siyatik sinir hasarı sonucu oluşan patolojide koruyucu etkiye sahip olduğunu ileri sürmektedir.

Periferik sinir hasarı modellerinde birçok deney modeli kullanılmasına rağmen fare ve sıçanlarda oluşturulan siyatik sinir konstriksiyonu patolojinin oluşturulması ve farmakolojik ajanların mekanizmaların aydınlatılmasında öne çıkmaktadır (Yalcin et al., 2014). Deneysel olarak siyatik sinir hasarının oluşturulması için ligasyon, konstriksiyon, travma, rezeksiyon gibi metodlar kullanılmaktadır (Sousa, Lages, Pereira, and Slullitel, 2016). Ancak bu metodların arasında hem metabolik hem de hücre içi mekanizmaları taklit etmesi açısından konstriksiyon modeli en sık kullanılan modeldir (Kim and Chung, 1997). Konstriksiyon sonucu oluşan sinir hasarı spinalkord ve beyin düzeyinde de metabolik ve hücrenel değişikliklere neden olmaktadır (Nishihara et al., 2020). Buna ek olarak sıçanlarda oluşturulan siyatik sinir hasarı motor ve sensoriyel değişiklikleri kapsadığı için nöropatik ağrının mekanizmalarını başarılı bir şekilde taklit etmekte ve bu nedenle de ağrı çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Siyatik sinir hasarının oluşturduğu değişikliklerin (sitokinler, oksidatif stres) sadece hasarın olduğu bölgede değil, spinalkord ve santral sinir sisteminde de çeşitli değişikliklere sebep olduğu ve bu etkilerin nöropatik ağrı gibi insan yaşamını zorlaştıran bir durumda santral sensitizasyon ile ağrı eşliğini düşürdüğü bilinmektedir. Literatürde siyatik sinir hasarı oluşturmak için forseps, hemostaz makasları, klempeler, anevrizma klipsleri kullanılsa da cerrahi işlemlerde sıklıkla kullanılan ve fizyolojik sürece bir etkisi olmadığı gösterilen kromik katgüt ile birden fazla noktadan bağlama yoluyla oluşturulan model en sık kullanılanıdır (Yamashita, Sakuma, Kato, and Kotani, 2004). Diğer deney modellerinde siyatik sinir liflerinde fonksiyonel bozukluk ve seçici olmayan hasar ortaya çıktığından dolayı standardize

edilmesinin daha zor olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle biz de tez çalışmamızda insanda oluşan nöropatik ağrı sürecini başarılı bir şekilde taklit eden kromik katgüt vasıtasıyla yapılan modeli tercih ettik. Yapılan alışmalar konstriksiyon sonrasında fonksiyonel, davranışsal, biyokimyasal, moleküler değişikliklerin 0., 7. ve 14. günlerde araştırılmasının tedavi hedefi olabilecek ajanların araştırılmasında önemli olabileceğini göstermiştir. Biz de tez çalışmamızda siyatik sinir hasarı oluşturulduktan sonra asiyatik asitin 14 gün boyunca uygulanmasının etkisini araştırdık.

Nöropatik ağrı sinir fonksiyonunda çeşitli etkenlerle ortaya çıkan hasar nedeniyle oluşan, günlük yaşamı kısıtlayan ve tam olarak tedavisi sağlanamayan bir patolojidir (Cavalli, Mammana, Nicoletti, Bramanti, and Mazzon, 2019). Nöropatik ağrıda oluşan ağrının patofizyolojisi kompleks bir yapıya sahip olup santral ve periferel mekanizmaları kapsamaktadır (Campbell and Meyer, 2006). Bu mekanizmalar arasında iyon kanalı ekspresyonundaki değişiklikler, nörotransmitter salıverilmesi ve ağrı yolaklarındaki değişiklikler sayılabilir. Nöropatik ağrı yanma, karıncalanma, iğnelenme, kaşınma ve uyaranlara karşı çabuk cevaba neden olan duysal etkenleri içermektedir (St. John Smith, 2018). Fizyolojik koşullarda doku hasarı sonrasında ortaya çıkan inflamasyonun ağrı yolaklarını harekete geçirdiği hiperaljezi ve alodiniye neden olabileceği bilindiğinden, nöropatik ağrı duysal ve inflamatuvar karaktere sahip olarak tanımlanmaktadır (Pinho-Ribeiro, Verri, and Chiu, 2017). Ayrıca antioksidan tedavi, oksidan stresin azaltılması, nöropatik ağrıyla ve oksidatif stres nedeniyle oluşan nöropatik ağrıyla yakından ilişkilendirilmiştir (Oyenihi, Ayeleso, Mukwevho, and Masola, 2015). Yakın zamanda yapılan çalışmalar periferel sinir hasarının cerrahi travmaların %3 nde görüldüğünü ve dzeltilemediğini göstermiştir (Martins, Bastos, Siqueira, Heise, and Teixeira, 2013). Siyatik sinir hasarında oluşan yaralanmaların cerrahi işlem sonrası tam olarak tedavi edilememesi günümüz araştırmalarının temel noktalarından birisini oluşurmaktadır. Yapılan çalışmalarda nöropatik ağrı tedavisinde başka endikasyonlarda kullanılan ilaçlar, hormonlar, çeşitli kimyasallar, elektriksel ve manyetik alanla yapılan müdahaleler denenmiştir (Oliveira Jnior, Corra, and Ferreira, 2016). Bunların yanı sıra hem antioksidan hem de antiinflamatuvar mekanizmaları etkileyebilen etken maddeler araştırılmaktadır (Lim and Kim, 2016). Bizde alışmamızda daha önce literatürde nöroprotektif etkisinin olduğu gösterilmiş asiyatik asiti kullandık (Welbat, Chaisawang, Pannangrong, and Wigmore, 2018). Sinir yapısının rejenerasyon kapasitesinin az

olması, inflamatuvar ve oksidatif ataklara karşı savunmasız olmasından dolayı farmakolojik ajan arayışları bu mekanizmalar üzerinde koruyucu etkiler oluşturma ihtimali olabilecek ajanlar üzerinde yoğunlaşmıştır (Krishnamurthy et al., 2009). Özellikle artmış inflamatuvar ve oksidan yanıtın asiatic asit gibi doğal bir bileşikle engellenebilmesi bu alanda yapılması planlanan birçok çalışmanın önünü açacaktır (Areti et al., 2014a).

Nöropatik ağrı sinir hasarından, nosiseptif ağrı ise doku hasarından kaynaklanmaktadır. En önemli fark nosiseptif ağrının doku hasarının düzelmesiyle ortadan kalkması fakat nöropatik ağrının hasar verici stimülanın ortadan kalkmasına rağmen sürmesidir. Nöropatik ağrı dizestezi, hiperaljezi, allodini ile karakterizedir (Jang, Lee, Kim, and Ryu, 2014). Günümüzde kliniklerde nöropatik ağrı tedavisi için gabapentin, pregabalin ve trisiklik antidepressanlar kullanılmakta olsa da bu ağrılı tablonun iyileştirilmesi için kesin bir tedavi bulunmamaktadır. Literatürde antioksidan ve antiinflamatuvar etkili bileşiklerin nöropatik ağrı üzerindeki olumlu etkileri bilindiğinden biz de çalışmamızda bu bileşiklerden biri olan asiatic asiti kullandık. Model olarak kullandığımız kronik konstriksiyon modelinde asiatic asitin nöropatik ağrıda ağrı hissini azaltıcı ve ağrı yollarında rol oynadığı düşünülen oksidatif stres ve inflamasyonun üzerinde pozitif etkiler gösterdiğini kanıtladık. Birçok çalışma deneysel kronik konstriksiyon sonucunda nöropatik ağrının oluştuğunu ve ağrının davranışsal parametrelerinin ölçülmesi için 0., 7., ve 14. Günlerin uygun olduğunu göstermiştir. Biz de bu nedenle yaptığımız çalışmada ağrının gözlemlenmesi için kullanılan hot plate ve paw pressure (pençe testi) testlerini 0., 7., ve 14. günlerde yaptık.

Oksidatif stres hasar sonrası nöronal iletimin bozulmasına neden olan ve periferik sinirin fonksiyonel olarak eski haline dönmesini engelleyen patolojik bir süreçtir (Sagalajev et al., 2018). Periferik sinir hasarı sonrasında oksidatif stresin tedavi edilmesinin, sinir yapısının düzelmesine ve fonksiyonunun normale dönmesine neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Periferik sinir hasarını takiben hasarlı sinir bölgesinin proinflamatuvar cevapla temizlenerek rejenerasyonun başladığı süreçte oksidatif stresin azaltılmasının rejenerasyonu hızlandırdığı gösterilmiştir (A. Areti, V. G. Yerra, V. G. M. Naidu, and A. Kumar, 2014b). Bizim de çalışmamızda kullandığımız asiatic asitin antioksidan özelliğiyle oksidatif stresi azalttığı, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engellediği ve lipid peroksidasyonunu anlamlı

derecede hafiflettiği önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca yakın zamanda yapılan çalışmalarda asiatic asitinin santral sinir sistemi hasarına karşı koruyucu etkilere sahip olduğunu ve birçok oksidan etkene karşı koruyucu rol oynadığını göstermiştir (Nataraj, Manivasagam, Justin Thenmozhi, and Essa, 2017).

Nöropatik ağrıda özellikle spinal kordda serbest oksijen radikallerinin arttığı ve antioksidan enzimlerin seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (S.-Y. Shim and Kim, 2013). Yapılan prelinik çalışmalarda oksidatif stresin nöropatik ağrıyı artırdığını ve hasarlı periferik sinirin hiperaljeziyi indüklediğini göstermiştir (Mallet, Hadjivassiliou, Sarrigiannis, and Zis, 2020). Oksidatif stresin temel etkeni olan serbest oksijen radikalleri hücrel mekanizmaları bozarak nöronlarda hasara neden olmaktadır. Glutasyon bu hücrel mekanizmalarda rol oynayan başlıca antioksidan moleküllerden biridir. Hücrede oluşan oksidatif stresin glutasyon vasıtasıyla nötralize edilmesi temel mekanizma olarak kabul edilmektedir (Kwon et al., 2019). Daha önce yapılan çalışmalarda santral sensitizasyonda rol oynayan dorsal boynuz hücrelerinin reaktif oksijen radikalleri tarafından tetiklendiğini ve bu tetiklenmenin spinal ve santral glial hücreleri aktive ederek kronik ağrıya neden olduğu gösterilmiştir (H. S. Shim et al., 2019). Nöropatik ağrının serbest oksijen radikalleri ile azaltılması TEMPOL gibi yüksek antioksidan içerikli bileşiklerle sağlanması hücrede bir başka antioksidan enzim olan SOD' u taklit ederek termal hiperaljezide anlamlı azalmaya neden olduğu bilinmektedir (Jia et al., 2019). Ayrıca oksidatif stres sonucu oluşan lipid peroksidasyonun özellikle nöronal yapılara, protein ve hücre çekirdeklerine zarar verdiğinden dolayı önemlidir. Bu hasar bir lipidperoksidasyon ürünü olan MDA'nın oluşmasıyla gözlemlenmekte ve lipidperoksidasyonunun antioksidan bileşiklerle azaltılmasının sinir hasarını engellediğı ve dolayısıyla santral sensitizasyonu önlediğı gösterilmiştir (Yoshida, Umeno, and Shichiri, 2013). Asiatic asitinin glutasyon ve SOD üzerine etkileri asiatic asitle ilgili yapılan çalışmalarda araştırılmış ve seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Ramachandran and Saravanan, 2013). Bizim çalışmamızda da siyatik sinir hasarı sonucu azalan SOD seviyelerinin asiatic asit uygulamasıyla düzeldiğı görüldü. Ayrıca hasarın başka bir parametresi olan artan MDA seviyeleri asiatic asitle anlamlı şekilde azaltmıştır. Sonuçlarımız diğerk çalışmalara paralel olarak asiatic asitinin antioksidan özellikleri ile mikrogliozis sonucu nöronlarda ortaya çıkan oksidatif hasarı azaltmıştır (Jiang et al., 2016). Somchit ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmada asiatic asitinin antinosiseptif ve antiinflamatuar etkisini hot plate

ve writhing testi ile araştırmıştır. Bu alışma sonucunda asiyatik asidin antinosiseptif etkilerinden olası antioksidan mekanizmaların sorumlu olduğu öne sürülmüştür (Mn et al., 2004). Daha sonra yapılan çalışmalarda asiyatik asitin antinosiseptif ve antiinflamatuvar etkileri desteklenmiştir (Huang et al., 2011). Ancak bizim çalışmamızda oluşturduğumuz siyatik sinir konstrikasyonu modelindeki etkisi bilinmediğinden, elde ettiğimiz sonuçlar antioksidan mekanizmanın gösterilmesiyle ve hot plate testi sonuçlarımıza göre asiyatik asidin protektif etkilerden sorumlu olduğu hipotezini desteklemektedir. Ayrıca alışmamızda gösterdiğimiz mekanik allodiniye karşı koruyucu etkiden antioksidan mekanizmaların sorumlu olabileceği hipotezi bu bulgularla uyulmaktadır. Daha önceden yapılan çalışmalarda antioksidan sistemin aktivitesinin çeşitli bileşiklerle artırılmasının pençe testinde antiallodinik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bilgilere paralel olarak çalışmamızda asiyatik asit uygulaması sonucu ortaya çıkan antiallodinik etkinin antioksidan mekanizmayla ortaya çıkabileceği görülmektedir. Asiyatik asit uygulanmasından itibaren reaktif oksijen türlerinin salınımının azaldığı ve nöroinflamatuvar prosesin engellendiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Bates et al., 2019). Siyatik sinir konstrikasyonu sonucu ortaya çıkan oksidatif stres literatür bilgisine uyumlu olarak lipit peroksidasyon ürünlerinde artışı ve antioksidan enzimlerin (GSH, SOD) azalışına neden olmuştur. Asiyatik asit uygulamamız sonucunda oluşturduğumuz antioksidan yanıt nöron kültürlerinde gösterilmiş ve oksidatif mekanizmayla asiyatik asitin arasındaki ilişki doğrulanmıştır.

Nöropatik ağrının patogenezi ve ağrı iletim yolakları göz önünde bulundurulduğunda özellikle spinal kordda meydana gelen değişikliklerin incelenmesinin, nöropatik ağrıda inflamasyon ve ağrı iletimi üzerine etkili bileşiklerin araştırılması için önemlidir. Bu nedenle bizde çalışmamızda asiyatik asidin etkisini araştırırken spinal kord ve beyin düzeylerinde ortaya çıkan olası değişikliklerin değerlendirdik. Siyatik sinir hasarı sonucunda oluşan pro-inflamatuvar yanıt TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  aracılığıyla başlamaktadır. İnflamasyonun sürmesi halinde bu sitokinlerin periferik dokular ve santralde arttığı gösterilmiştir (Hung, Lim, and Doshi, 2017). Proinflamatuvar cevabın sürekliliğini sağlayan bu sitokinler siyatik sinir hasarı sonucunda da artarak rejenerasyonu ve inflamasyonu dengelemektedir. Yapılan alışmalar bu sitokinlerin spesifik antagonistler veya değişik kimyasallarla etkilerinin engellenmesinin inflamasyonu azalttığını ve protektif etkilere sahip olduğunu

göstermiştir (Leal, Casabona, Puntel, and PITOSI, 2013). Sağlıklı sıçanlarla kıyaslandığında siyatik sinir hasarı oluşturulmuş sıçanlarda bu sitokinlerin artışı nöropatik ağrının sürekliliğinde ve oluşan gangliyon hasarında rol oynadığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Sommer and Sorkin, 2013). Özellikle periferik sinir hasarına bağlı santral sinir sisteminde bu sitokinlerin arttığının gösterilmesi ağrının santral sensitizasyon ve sürekliliği hipoteziyle uyumaktadır. Bu nedenle bizde çalışmamızda asiyatik asit uygulaması sonrasında bu sitokinlerde ortaya çıkan değişiklikleri araştırdık. Daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak asiyatik asitin spinal kord ve santral sinir sisteminde siyatik sinir hasarıyla artmış olan bu sitokinlerin azaldığı gösterilmiştir. Sonuçlarımız literatürde daha önce yapılan çalışmalarla paralel olarak asiyatik asitin antiinflamatuar etkilerini göstermektedir (H. Chen, Hua, Ze, Wang, and Wei, 2017).

BDNF nin nöropatik ağrıdaki rolü tartışmalıdır (Siniscalco, Giordano, Rossi, Maione, and de Novellis, 2011). Birçok çalışma BDNF nin antinöroseptif etkilerini göstermişken diğer çalışmalar BDNF nin pronöroseptif etkilere sahip olduğunu öne sürmüştür (Sandra M. Garraway and J. Russell Huie, 2016a). Wang ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları çalışmada güçlü antioksidan etkilere sahip sülfid bileşiklerinin antinöroseptif etkilerinde BDNF nin rol oynadığını ve bu etkinin BDNF antagonisti ile ortadan kaldırıldığını söylemişlerdir (G. Wang et al., 2020). Her ne kadar BDNF nin bu kompleks rolü açıklanamamış olsa da BDNF nin parakrin ve otokrin etkilerinden dolayı farklı sonuçlar ortaya çıkabileceği ileri sürülmüştür.

Tateiwa ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada BDNF nin yaşa bağlı değişiminin özellikle yaşlılarda daha sık görülen nöropatik ağrıya olan ilişkisini araştırmışlardır (Tateiwa et al., 2018). Yaptıkları siyatik sinir ligasyonu modelinde ağrının yorumlanması için davranışsal parametreleri incelemiş ve ayrıca intranasal yoldan uygulanan BDNF nin bu parametreler üzerine etkisini göstermişlerdir. Yapılan deneyler sonucunda tekrarlı BDNF tedavisinin santral BDNF sinyalini güçlendirerek yaşa bağlı hiperaljezik davranışı engellediğini göstermişlerdir (Tateiwa et al., 2018). Nörotrofik faktörler santral sinir sisteminde yoğun bir şekilde sentezlenmekte ve nöron yaşamı, rejenerasyon, sinaptik fonksiyonla doğrudan ilişkilidir (Apfel, 2000). Bu faktörlerden biri olan BDNF kendi reseptörü olan TrkB ye yüksek afinite ile bağlanarak hücresel yanıtları oluşturmaktadır. Özellikle BDNF nin spinalkord aracılığıyla santral sensitizasyonda rol oynadığı daha önceki çalışmalarda

gösterilmiştir (Sandra M. Garraway and J. Russell Huie, 2016b). Ayrıca yapılan çalışmalar santral sinir sisteminde hipokampus ve spinal kordda BDNF seviyelerinin diğer bölgelere kıyasla daha yoğun olduğunu göstermiştir (S. M. Garraway and J. R. Huie, 2016). BDNF ekspresyonu yetişkin santral sinir sisteminde birçok nöronal hasara karşı aktive olarak transkripsiyonel olarak cevap oluşturmaktadır. Özellikle sürekli noziseptif uyarana karşı spinal kordda ve dorsal boynuz hücrelerinde BDNF nin mRNA seviyelerinin arttığı ve ERK/cAMP ve CREB yoluyla aktive olduğunu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Sandra M. Garraway and J. Russell Huie, 2016a). Bu mekanizmalarla artmış olan BDNF uyarımının özellikle dorsal boynuz hücrelerinde ve ganglionlarda ortaya çıkan noziseptif davranışla ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Malcangio, Clark, and Ogbonna, 2013). Daha önce yapılan çalışmalar BDNF ekspresyonunun spinal kord düzeyinde sinir hasarını takiben bir iki gün sonra ortaya çıktığı ve 14. günde kaybolduğunu söylemiştir. Fakat bunun tersine santral düzeydeki BDNF nin hasar sonrasında 7 ile 14 gün arasında azaldığını ve santral düzeyde sürekli ağrı hissini oluşmasına katkı sağladığı da gösterilmiştir (Tateiwa et al., 2018). Ayrıca hipokampal BDNF mRNA seviyelerindeki bu azalma yaşlı sıçanlarda gösterilmiş ve yaşa bağlı ortaya çıkan hiperaljezi ile ilişkili olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Yetişkin hipokampusunda BDNF'nin nörojenezde önemli bir rol oynadığı ve hipokampal düzeydeki azalmasının hipokampal nörojenez doğrudan azalttığı bilinmektedir (Galvan and Jin, 2007). Klinik ve deneysel araştırma sonuçları hipokampal nörojenezin azalmasını ağrı hissini algılanmasında ve santral sensitizasyon patolojisinin şiddetlenmesinde rol oynadığını düşündürmektedir. Ayrıca hipokampal nörojenezin azalmasının kongnitif eksikliklere yol açması ileri yaşlı kongnitif eksikliği olan hastalarda görülen kronik nöropatik ağrı tablosuyla uyumaktadır. Preklinik araştırmalar sürekli nozisepsiyonun nörojenezini azalttığını fakat akut ağrının böyle bir etkisinin olmadığını göstermektedir (A. Vania Apkarian et al., 2016). Nörojenez ile BDNF bağlantısı düşünüldüğünde bu bağlantının BDNF kaynaklı olması olasıdır. Daha önceki çalışmalarda gösterilen spinal BDNF uygulamasının hem antinosiseptif hemde pronosiseptif etkiler gösterdiği fakat intranazal yolla uygulamasının santral BDNF düzeylerini spinal korda kıyasla anlamlı şekilde artırdığını ve antihiperalezik role sahip olduğunu öne sürmemizi desteklemektedir (Xia, Zhong, Xing Liu, Dou, and L, 2018). Bizde yaptığımız tez çalışmasında spinal kord ve beyin BDNF düzeylerinde gördüğümüz artışın bu

mekanizmayla ortaya çıktığını düşünmekteyiz.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında kronik bir hastalık olan nöropatik ağrıyı deney modeli olarak hayvanlarda taklit ederek asiatic asitin bu ağrının davranışsal, hücresel ve moleküler mekanizmaları üzerindeki etkisini inceledik. İn vivo ve in vitro deney sonuçlarımız asiatic asitin siyatik sinir konstriksiyonu sonucu ortaya çıkan termal hiperaljezi ve mekanik allodiniyi engellediğini ayrıca antioksidan mekanizmaları etkileyerek sinir hasarını azalttığını gösterdik. Bunun yanı sıra asiatic asitin in vitro ortamda mikrogliozis ve mikrogliozis kaynaklı nöron ölümüne karşı protektif olduğunu ayrıca spinal kord ve beyin seviyesinde siyatik sinir konstriksiyonuna bağlı BDNF ekspresyonundaki azalışı engellediğini saptadık

Çalışmamızın sonuçlarının, siyatik sinir hasarı ve toplumun önemli bir kısmını etkileyen nöropatik ağrının azaltılması için yapılacak araştırmalara ve gelecekteki çalışmalara bilgi aktarımı sağlayarak asiatic asitin sinir rejenerasyon üzerindeki etkilerinin de gösterilmesi halinde büyük bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- Ab Aziz, C. B., and Ahmad, A. H. (2006). The role of the thalamus in modulating pain. *Malays J Med Sci*, 13(2), 11-18.
- Abd-Elseyed, A., Jackson, M., Gu, S. L., Fiala, K., and Gu, J. (2019). Neuropathic pain and Kv7 voltage-gated potassium channels: The potential role of Kv7 activators in the treatment of neuropathic pain. *Mol Pain*, 15, 1744806919864256. doi:10.1177/1744806919864256
- Abram, S. E. (2000). Neural blockade for neuropathic pain. *Clin J Pain*, 16(2 Suppl), S56-61. doi:10.1097/00002508-200006001-00010
- Adelson, D., Lao, L., Zhang, G., Kim, W., and Marvizón, J. C. G. (2009). Substance P release and neurokinin 1 receptor activation in the rat spinal cord increase with the firing frequency of C-fibers. *Neuroscience*, 161(2), 538-553. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.03.058
- Alves, R. V., and Asfora, W. T. (2011). Deep brain stimulation for Dejerine-Roussy syndrome: case report. *Minim Invasive Neurosurg*, 54(4), 183-186. doi:10.1055/s-0031-1280833
- Apfel, S. C. (2000). Neurotrophic factors and pain. *Clin J Pain*, 16(2 Suppl), S7-11. doi:10.1097/00002508-200006001-00003
- Apkarian, A. V. (2008). Pain perception in relation to emotional learning. *Curr Opin Neurobiol*, 18(4), 464-468. doi:10.1016/j.conb.2008.09.012
- Apkarian, A. V., Mutso, A. A., Centeno, M. V., Kan, L., Wu, M., Levinstein, M., . . . Kessler, J. A. (2016). Role of adult hippocampal neurogenesis in persistent pain. *Pain*, 157(2), 418-428. doi:10.1097/j.pain.0000000000000332
- Ardell, J. L. (2020). Neuromodulation of Dorsal Root Ganglia: Chronic Pain Mitigation and Autonomic Implications. *JACC. Basic to translational science*, 5(10), 986-987. doi:10.1016/j.jacbts.2020.09.001
- Areti, A., Yerra, V. G., Naidu, V., and Kumar, A. (2014a). Oxidative stress and nerve damage: role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. *Redox biology*, 2, 289-295. doi:10.1016/j.redox.2014.01.006
- Areti, A., Yerra, V. G., Naidu, V. G. M., and Kumar, A. (2014b). Oxidative stress and nerve damage: Role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. *Redox Biology*, 2, 289-295.
- Attal, N., Fermanian, C., Fermanian, J., Lanteri-Minet, M., Alchaar, H., and Bouhassira, D. (2008). Neuropathic pain: are there distinct subtypes depending on the aetiology or anatomical lesion? *Pain*, 138(2), 343-353. doi:10.1016/j.pain.2008.01.006
- Bae, C., Wang, J., Shim, H. S., Tang, S.-J., Chung, J. M., and La, J.-H. (2018). Mitochondrial superoxide increases excitatory synaptic strength in spinal dorsal horn neurons of neuropathic mice. *Molecular Pain*, 14, 1744806918797032. doi:10.1177/1744806918797032
- Bardoni, R. (2013). Role of presynaptic glutamate receptors in pain transmission at the spinal cord level. *Current neuropharmacology*, 11(5), 477-483. doi:10.2174/1570159X11311050002
- Baron, R., Maier, C., Attal, N., Binder, A., Bouhassira, D., Cruccu, G., . . . Treede, R. D. (2017). Peripheral neuropathic pain: a mechanism-related organizing principle based on sensory profiles. *Pain*, 158(2), 261-272. doi:10.1097/j.pain.0000000000000753

- Bates, D., Schultheis, B. C., Hanes, M. C., Jolly, S. M., Chakravarthy, K. V., Deer, T. R., . . . Hunter, C. W. (2019). A Comprehensive Algorithm for Management of Neuropathic Pain. *Pain Med*, 20(Suppl 1), S2-s12. doi:10.1093/pm/pnz075
- Boadas-Vaello, P., Castany, S., Homs, J., Alvarez-Perez, B., Deulofeu, M., and Verdu, E. (2016). Neuroplasticity of ascending and descending pathways after somatosensory system injury: reviewing knowledge to identify neuropathic pain therapeutic targets. *Spinal Cord*, 54(5), 330-340. doi:10.1038/sc.2015.225
- Campbell, J. N., and Meyer, R. A. (2006). Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*, 52(1), 77-92. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.021
- Carrasco, C., Naziroğlu, M., Rodríguez, A. B., and Pariente, J. A. (2018). Neuropathic Pain: Delving into the Oxidative Origin and the Possible Implication of Transient Receptor Potential Channels. *Frontiers in physiology*, 9, 95-95. doi:10.3389/fphys.2018.00095
- Cavalli, E., Mammana, S., Nicoletti, F., Bramanti, P., and Mazzon, E. (2019). The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 33, 2058738419838383-2058738419838383. doi:10.1177/2058738419838383
- Cervero, F. (2009). Visceral versus somatic pain: similarities and differences. *Dig Dis*, 27 Suppl 1, 3-10. doi:10.1159/000268115
- Chanda, M. L., Alvin, M. D., Schnitzer, T. J., and Apkarian, A. V. (2011). Pain characteristic differences between subacute and chronic back pain. *J Pain*, 12(7), 792-800. doi:10.1016/j.jpain.2011.01.008
- Chen, H., Hua, X.-M., Ze, B.-C., Wang, B., and Wei, L. (2017). The anti-inflammatory effects of asiatic acid in lipopolysaccharide-stimulated human corneal epithelial cells. *International journal of ophthalmology*, 10(2), 179-185. doi:10.18240/ijo.2017.02.01
- Chen, J. S., Kandle, P. F., Murray, I., Fitzgerald, L. A., and Sehdev, J. S. (2020). Physiology, Pain. In *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Chen, S. S., and Zhang, J. M. (2015). Progress in Sympathetically Mediated Pathological Pain. *J Anesth Perioper Med*, 2(4), 216-225. doi:10.24015/JAPM.2015.0029
- Cortes-Altamirano, J. L., Olmos-Hernandez, A., Jaime, H. B., Carrillo-Mora, P., Bandala, C., Reyes-Long, S., and Alfaro-Rodríguez, A. (2018). Review: 5-HT1, 5-HT2, 5-HT3 and 5-HT7 Receptors and their Role in the Modulation of Pain Response in the Central Nervous System. *Curr Neuropharmacol*, 16(2), 210-221. doi:10.2174/1570159x15666170911121027
- Cunha, T. M., Verri, W. A., Jr., Schivo, I. R., Napimoga, M. H., Parada, C. A., Poole, S., . . . Cunha, F. Q. (2008). Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol*, 83(4), 824-832. doi:10.1189/jlb.0907654
- Da Silva, L. F. S., Walder, R. Y., Davidson, B. L., Wilson, S. P., and Sluka, K. A. (2010). Changes in expression of NMDA-NR1 receptor subunits in the rostral ventromedial medulla modulate pain behaviors. *Pain*, 151(1), 155-161. doi:10.1016/j.jpain.2010.06.037
- de Tommaso, M., Arendt-Nielsen, L., Defrin, R., Kunz, M., Pickering, G., and Valeriani, M. (2016). Pain in Neurodegenerative Disease: Current Knowledge and Future Perspectives. *Behav Neurol*, 2016, 7576292. doi:10.1155/2016/7576292
- Di Cesare Mannelli, L., Micheli, L., Crocetti, L., Giovannoni, M. P., Vergelli, C., and Ghelardini, C. (2017).  $\alpha 2$  Adrenoceptor: a Target for Neuropathic Pain

- Treatment. *Mini Rev Med Chem*, 17(2), 95-107. doi:10.2174/1389557516666160609065535
- DiBonaventura, M. D., Sadosky, A., Concialdi, K., Hopps, M., Kudel, I., Parsons, B., . . . Farrar, J. T. (2017). The prevalence of probable neuropathic pain in the US: results from a multimodal general-population health survey. *J Pain Res*, 10, 2525-2538. doi:10.2147/JPR.S127014
- Dubin, A. E., and Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*, 120(11), 3760-3772. doi:10.1172/JCI42843
- Dubový, P., Klusáková, I., Hradilová-Sviženská, I., Joukal, M., and Boadas-Vaello, P. (2018). Activation of Astrocytes and Microglial Cells and CCL2/CCR2 Upregulation in the Dorsolateral and Ventrolateral Nuclei of Periaqueductal Gray and Rostral Ventromedial Medulla Following Different Types of Sciatic Nerve Injury. *Front Cell Neurosci*, 12, 40. doi:10.3389/fncel.2018.00040
- Edwards, R. R., Dworkin, R. H., Turk, D. C., Angst, M. S., Dionne, R., Freeman, R., . . . Yarnitsky, D. (2016). Patient phenotyping in clinical trials of chronic pain treatments: IMMPACT recommendations. *Pain*, 157(9), 1851-1871. doi:10.1097/j.pain.0000000000000602
- Favereaux, A., Thoumine, O., Bouali-Benazzouz, R., Roques, V., Papon, M. A., Salam, S. A., . . . Landry, M. (2011). Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain. *Embo j*, 30(18), 3830-3841. doi:10.1038/emboj.2011.249
- Ferreira, J., Beirith, A., Mori, M. A. S., Araújo, R. C., Bader, M., Pesquero, J. B., and Calixto, J. B. (2005). Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(9), 2405-2412. doi:10.1523/JNEUROSCI.2466-04.2005
- Fidanboyly, M., Griffiths, L. A., and Flatters, S. J. L. (2011). Global Inhibition of Reactive Oxygen Species (ROS) Inhibits Paclitaxel-Induced Painful Peripheral Neuropathy. *PLOS ONE*, 6(9), e25212. doi:10.1371/journal.pone.0025212
- Finnerup, N. B., Kuner, R., and Jensen, T. S. (2021). Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment. *Physiological Reviews*, 101(1), 259-301. doi:10.1152/physrev.00045.2019
- Fischer, M., Wille, G., Klien, S., Shanib, H., Holle, D., Gaul, C., and Broessner, G. (2012). Brain-derived neurotrophic factor in primary headaches. *The Journal of Headache and Pain*, 13(6), 469-475. doi:10.1007/s10194-012-0454-5
- Fossat, P., Dobremez, E., Bouali-Benazzouz, R., Favereaux, A., Bertrand, S. S., Kilk, K., . . . Nagy, F. (2010). Knockdown of L calcium channel subtypes: differential effects in neuropathic pain. *J Neurosci*, 30(3), 1073-1085. doi:10.1523/jneurosci.3145-09.2010
- Galvan, V., and Jin, K. (2007). Neurogenesis in the aging brain. *Clinical interventions in aging*, 2(4), 605-610. doi:10.2147/cia.s1614
- Garraway, S. M., and Huie, J. R. (2016a). Spinal Plasticity and Behavior: BDNF-Induced Neuromodulation in Uninjured and Injured Spinal Cord. *Neural plasticity*, 2016, 9857201-9857201. doi:10.1155/2016/9857201
- Garraway, S. M., and Huie, J. R. (2016b). Spinal Plasticity and Behavior: BDNF-Induced Neuromodulation in Uninjured and Injured Spinal Cord. *Neural Plasticity*, 2016, 9857201. doi:10.1155/2016/9857201
- Garraway, S. M., and Huie, J. R. (2016). Spinal Plasticity and Behavior: BDNF-Induced Neuromodulation in Uninjured and Injured Spinal Cord. *Neural Plast*, 2016, 9857201. doi:10.1155/2016/9857201

- Greenwood, R. D. (1975). Fothergill's Neuralgia. *West J Med*, 123(3), 239.
- Gustin, S. M., Wrigley, P. J., Siddall, P. J., and Henderson, L. A. (2010). Brain anatomy changes associated with persistent neuropathic pain following spinal cord injury. *Cereb Cortex*, 20(6), 1409-1419. doi:10.1093/cercor/bhp205
- Huang, S. S., Chiu, C. S., Chen, H. J., Hou, W. C., Sheu, M. J., Lin, Y. C., . . . Huang, G. J. (2011). Antinociceptive activities and the mechanisms of anti-inflammation of asiatic Acid in mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 895857. doi:10.1155/2011/895857
- Hung, A. L., Lim, M., and Doshi, T. L. (2017). Targeting cytokines for treatment of neuropathic pain. *Scandinavian journal of pain*, 17, 287-293. doi:10.1016/j.sjpain.2017.08.002
- Iolascon, G., de Sire, A., Moretti, A., and Gimigliano, F. (2015). Complex regional pain syndrome (CRPS) type I: historical perspective and critical issues. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 12(Suppl 1), 4-10. doi:10.11138/ccmbm/2015.12.3s.004
- Iyer, S., and Kim, H. J. (2016). Cervical radiculopathy. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 9(3), 272-280. doi:10.1007/s12178-016-9349-4
- Jang, J. Y., Lee, S. H., Kim, M., and Ryu, J. S. (2014). Characteristics of neuropathic pain in patients with spinal cord injury. *Annals of rehabilitation medicine*, 38(3), 327-334. doi:10.5535/arm.2014.38.3.327
- Ji, R. R., Donnelly, C. R., and Nedergaard, M. (2019). Astrocytes in chronic pain and itch. *Nat Rev Neurosci*, 20(11), 667-685. doi:10.1038/s41583-019-0218-1
- Jia, D., Wang, H., Han, B., Zhang, L., and Guo, J. (2019). Tempol Attenuates Neuropathic Pain by Inhibiting Nitric Oxide Production. *Analytical Cellular Pathology*, 2019, 8253850. doi:10.1155/2019/8253850
- Jiang, W., Li, M., He, F., Yao, W., Bian, Z., Wang, X., and Zhu, L. (2016). Protective Effects of Asiatic Acid Against Spinal Cord Injury-Induced Acute Lung Injury in Rats. *Inflammation*, 39(6), 1853-1861. doi:10.1007/s10753-016-0414-3
- Jin, S. X., Zhuang, Z. Y., Woolf, C. J., and Ji, R. R. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci*, 23(10), 4017-4022. doi:10.1523/jneurosci.23-10-04017.2003
- Johnson, Q., Borsheski, R. R., and Reeves-Viets, J. L. (2013). Pain management mini-series. Part I. A review of management of acute pain. *Mo Med*, 110(1), 74-79.
- Juarez-Salinas, D. L., Braz, J. M., Etlin, A., Gee, S., Sohal, V., and Basbaum, A. I. (2019). GABAergic cell transplants in the anterior cingulate cortex reduce neuropathic pain aversiveness. *Brain*, 142(9), 2655-2669. doi:10.1093/brain/awz203
- Kennedy, R., and Abd-Elsayed, A. (2019). The International Association for the Study of Pain (IASP) Classification of Chronic Pain Syndromes. 1101-1103. doi:10.1007/978-3-319-99124-5\_234
- Kenshalo, D. R., and Willis, W. D. (1991). The Role of the Cerebral Cortex in Pain Sensation. 9, 153-212. doi:10.1007/978-1-4615-6622-9\_5
- Kim, K. J., and Chung, J. M. (1997). Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Experimental Brain Research*, 113(2), 200-206. doi:10.1007/BF02450318
- Krishnamurthy, R. G., Senut, M.-C., Zemke, D., Min, J., Frenkel, M. B., Greenberg, E. J., . . . Majid, A. (2009). Asiatic acid, a pentacyclic triterpene from Centella

- asiatica, is neuroprotective in a mouse model of focal cerebral ischemia. *Journal of neuroscience research*, 87(11), 2541-2550. doi:10.1002/jnr.22071
- Kwon, D. H., Cha, H.-J., Lee, H., Hong, S.-H., Park, C., Park, S.-H., . . . Choi, Y. H. (2019). Protective Effect of Glutathione against Oxidative Stress-induced Cytotoxicity in RAW 264.7 Macrophages through Activating the Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor-2/Heme Oxygenase-1 Pathway. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(4), 82. doi:10.3390/antiox8040082
- Latremoliere, A., and Woolf, C. J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*, 10(9), 895-926. doi:10.1016/j.jpain.2009.06.012
- Leal, M., Casabona, J., Puntel, M., and PITOSSO, F. (2013). Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ : reliable targets for protective therapies in Parkinson's Disease? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(53). doi:10.3389/fncel.2013.00053
- Li, C., Lei, Y., Tian, Y., Xu, S., Shen, X., Wu, H., . . . Wang, F. (2019). The etiological contribution of GABAergic plasticity to the pathogenesis of neuropathic pain. *Mol Pain*, 15, 1744806919847366. doi:10.1177/1744806919847366
- Li, H., Shen, L., Ma, C., and Huang, Y. (2013). Differential expression of miRNAs in the nervous system of a rat model of bilateral sciatic nerve chronic constriction injury. *Int J Mol Med*, 32(1), 219-226. doi:10.3892/ijmm.2013.1381
- Li, J., Xu, L., Deng, X., Jiang, C., Pan, C., Chen, L., . . . Liu, W. (2016). N-acetylcysteine attenuates neuropathic pain by suppressing matrix metalloproteinases. *PAIN*, 157(8), 1711-1723. doi:10.1097/j.pain.0000000000000575
- Li, X.-H., Miao, H.-H., and Zhuo, M. (2019). NMDA Receptor Dependent Long-term Potentiation in Chronic Pain. *Neurochemical Research*, 44(3), 531-538. doi:10.1007/s11064-018-2614-8
- Li, X. H., Miao, H. H., and Zhuo, M. (2019). NMDA Receptor Dependent Long-term Potentiation in Chronic Pain. *Neurochem Res*, 44(3), 531-538. doi:10.1007/s11064-018-2614-8
- Lim, E. Y., and Kim, Y. T. (2016). Food-Derived Natural Compounds for Pain Relief in Neuropathic Pain. *BioMed Research International*, 2016, 7917528. doi:10.1155/2016/7917528
- Lv, H., Qi, Z., Wang, S., Feng, H., Deng, X., and Ci, X. (2017). Asiatic Acid Exhibits Anti-inflammatory and Antioxidant Activities against Lipopolysaccharide and d-Galactosamine-Induced Fulminant Hepatic Failure. *Front Immunol*, 8, 785. doi:10.3389/fimmu.2017.00785
- Lv, J., Sharma, A., Zhang, T., Wu, Y., and Ding, X. (2018). Pharmacological Review on Asiatic Acid and Its Derivatives: A Potential Compound. *SLAS Technol*, 23(2), 111-127. doi:10.1177/2472630317751840
- Malcangio, M., Clark, A. K., and Ogbonna, A. C. (2013). Spinal Cord Nociception, Neurotrophins. In G. F. Gebhart and R. F. Schmidt (Eds.), *Encyclopedia of Pain* (pp. 3578-3582). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Mallet, M.-L., Hadjivassiliou, M., Sarrigiannis, P. G., and Zis, P. (2020). The Role of Oxidative Stress in Peripheral Neuropathy. *Journal of Molecular Neuroscience*, 70(7), 1009-1017. doi:10.1007/s12031-020-01495-x
- Mansour, A. R., Farmer, M. A., Baliki, M. N., and Apkarian, A. V. (2014). Chronic pain: the role of learning and brain plasticity. *Restor Neurol Neurosci*, 32(1), 129-139. doi:10.3233/RNN-139003

- Martins, R. S., Bastos, D., Siqueira, M. G., Heise, C. O., and Teixeira, M. J. (2013). Traumatic injuries of peripheral nerves: a review with emphasis on surgical indication. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 71, 811-814.
- McEntire, D. M., Kirkpatrick, D. R., Dueck, N. P., Kerfeld, M. J., Smith, T. A., Nelson, T. J., . . . Agrawal, D. K. (2016). Pain transduction: a pharmacologic perspective. *Expert review of clinical pharmacology*, 9(8), 1069-1080. doi:10.1080/17512433.2016.1183481
- Meacham, K., Shepherd, A., Mohapatra, D. P., and Haroutounian, S. (2017). Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Curr Pain Headache Rep*, 21(6), 28. doi:10.1007/s11916-017-0629-5
- Mn, S., Sulaiman, M. R., Ahmad, Z., Samsuddin, L. N., N, S., Israf, D. A., and S, M. (2004). Antinociceptive and antiinflammatory effects of *Centella asiatica*. *Indian Journal of Pharmacology (ISSN: 0253-7613) Vol 36 Num 6*, 36.
- Mulvey, M. R., Bennett, M. I., Liwowsky, I., and Freynhagen, R. (2014). The role of screening tools in diagnosing neuropathic pain. *Pain Manag*, 4(3), 233-243. doi:10.2217/pmt.14.8
- Namer, B., Barta, B., Orstavik, K., Schmidt, R., Carr, R., Schmelz, M., and Handwerker, H. O. (2009). Microneurographic assessment of C-fibre function in aged healthy subjects. *J Physiol*, 587(2), 419-428. doi:10.1113/jphysiol.2008.162941
- Nataraj, J., Manivasagam, T., Justin Thenmozhi, A., and Essa, M. M. (2017). Neuroprotective effect of asiatic acid on rotenone-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress-mediated apoptosis in differentiated SH-SYS5Y cells. *Nutr Neurosci*, 20(6), 351-359. doi:10.1080/1028415x.2015.1135559
- Nijs, J., Meeus, M., Versijpt, J., Moens, M., Bos, I., Knaepen, K., and Meeusen, R. (2015). Brain-derived neurotrophic factor as a driving force behind neuroplasticity in neuropathic and central sensitization pain: a new therapeutic target? *Expert Opin Ther Targets*, 19(4), 565-576. doi:10.1517/14728222.2014.994506
- Nishihara, T., Tanaka, J., Sekiya, K., Nishikawa, Y., Abe, N., Hamada, T., . . . Yorozyua, T. (2020). Chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats causes different activation modes of microglia between the anterior and posterior horns of the spinal cord. *Neurochemistry International*, 134, 104672.
- Nomura, T., Ikezaki, K., Matsushima, T., and Fukui, M. (1994). Trigeminal neuralgia: differentiation between intracranial mass lesions and ordinary vascular compression as causative lesions. *Neurosurg Rev*, 17(1), 51-57. doi:10.1007/BF00309988
- Oliveira Júnior, J. O. d., Corrêa, C. F., and Ferreira, J. A. (2016). Invasive treatment to control neuropathic pain. *Revista Dor*, 17, 98-106.
- Oyenihi, A. B., Ayeleso, A. O., Mukwevho, E., and Masola, B. (2015). Antioxidant strategies in the management of diabetic neuropathy. *BioMed research international*, 2015, 515042-515042. doi:10.1155/2015/515042
- Parada, C. A., Tambeli, C. H., Green, P. G., and Cairns, B. E. (2012). Primary afferent nociceptor as a target for the relief of pain. *Pain Res Treat*, 2012, 348043. doi:10.1155/2012/348043
- Park, H. J., Joo, H. S., Chang, H. W., Lee, J. Y., Hong, S. H., Lee, Y., and Moon, D. E. (2010). Attenuation of neuropathy-induced allodynia following intraplantar injection of pregabalin. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie*, 57(7), 664-671. doi:10.1007/s12630-010-9318-0

- Park, J., and Luo, Z. D. (2010). Calcium channel functions in pain processing. *Channels (Austin, Tex.)*, 4(6), 510-517. doi:10.4161/chan.4.6.12869
- Perret, D., and Luo, Z. D. (2009). Targeting voltage-gated calcium channels for neuropathic pain management. *Neurotherapeutics*, 6(4), 679-692. doi:10.1016/j.nurt.2009.07.006
- Pinho-Ribeiro, F. A., Verri, W. A., Jr., and Chiu, I. M. (2017). Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends in immunology*, 38(1), 5-19. doi:10.1016/j.it.2016.10.001
- Ramachandran, V., and Saravanan, R. (2013). Asiatic acid prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Functional Foods*, 5(3), 1077-1087.
- Reimann, F., Cox, J. J., Belfer, I., Diatchenko, L., Zaykin, D. V., McHale, D. P., . . . Woods, C. G. (2010). Pain perception is altered by a nucleotide polymorphism in SCN9A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(11), 5148-5153. doi:10.1073/pnas.0913181107
- Reynolds, W. S., Dmochowski, R., Wein, A., and Bruehl, S. (2016). Does central sensitization help explain idiopathic overactive bladder? *Nat Rev Urol*, 13(8), 481-491. doi:10.1038/nrurol.2016.95
- Roca-Lapirot, O., Radwani, H., Aby, F., Nagy, F., Landry, M., and Fossat, P. (2018). Calcium signalling through L-type calcium channels: role in pathophysiology of spinal nociceptive transmission. *Br J Pharmacol*, 175(12), 2362-2374. doi:10.1111/bph.13747
- Rodriguez-Raecke, R., Niemeier, A., Ihle, K., Ruether, W., and May, A. (2009). Brain gray matter decrease in chronic pain is the consequence and not the cause of pain. *J Neurosci*, 29(44), 13746-13750. doi:10.1523/jneurosci.3687-09.2009
- Sagalajev, B., Wei, H., Chen, Z., Albayrak, I., Koivisto, A., and Pertovaara, A. (2018). Oxidative Stress in the Amygdala Contributes to Neuropathic Pain. *Neuroscience*, 387, 92-103.
- Salvemini, D., Little, J. W., Doyle, T., and Neumann, W. L. (2011). Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free radical biology and medicine*, 51(5), 951-966. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.026
- Scadding, J. W. (2004). Treatment of neuropathic pain: historical aspects. *Pain Med*, 5 Suppl 1, S3-8. doi:10.1111/j.1526-4637.2004.04018.x
- Seybold, V. S. (2009). The role of peptides in central sensitization. *Handb Exp Pharmacol*(194), 451-491. doi:10.1007/978-3-540-79090-7\_13
- Shiao, R., and Lee-Kubli, C. A. (2018). Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury: Challenges and Research Perspectives. *Neurotherapeutics*, 15(3), 635-653. doi:10.1007/s13311-018-0633-4
- Shim, H. S., Bae, C., Wang, J., Lee, K.-H., Hankerd, K. M., Kim, H. K., . . . La, J.-H. (2019). Peripheral and central oxidative stress in chemotherapy-induced neuropathic pain. *Molecular pain*, 15, 1744806919840098-1744806919840098. doi:10.1177/1744806919840098
- Shim, S.-Y., and Kim, H.-S. (2013). Oxidative stress and the antioxidant enzyme system in the developing brain. *Korean journal of pediatrics*, 56(3), 107-111. doi:10.3345/kjp.2013.56.3.107
- Siniscalco, D., Giordano, C., Rossi, F., Maione, S., and de Novellis, V. (2011). Role of neurotrophins in neuropathic pain. *Current neuropharmacology*, 9(4), 523-529. doi:10.2174/157015911798376208

- Sommer, C. (2007). Neuropathic Pain Model, Chronic Constriction Injury. In R. F. Schmidt and W. D. Willis (Eds.), *Encyclopedia of Pain* (pp. 1290-1292). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Sommer, C., and Sorkin, L. S. (2013). Cytokines as Targets in the Treatment of Neuropathic Pain. In G. F. Gebhart and R. F. Schmidt (Eds.), *Encyclopedia of Pain* (pp. 850-855). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Sousa, A. M., Lages, G. V., Pereira, C. L., and Slullitel, A. (2016). Experimental models for the study of neuropathic pain. *Revista Dor*, 17, 27-30.
- St. John Smith, E. (2018). Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *Journal of Neurology*, 265(2), 231-238. doi:10.1007/s00415-017-8641-6
- Szok, D., Tajti, J., Nyari, A., and Vecsei, L. (2019). Therapeutic Approaches for Peripheral and Central Neuropathic Pain. *Behav Neurol*, 2019, 8685954. doi:10.1155/2019/8685954
- Tao, Y. X. (2012). AMPA receptor trafficking in inflammation-induced dorsal horn central sensitization. *Neurosci Bull*, 28(2), 111-120. doi:10.1007/s12264-012-1204-z
- Tateiwa, H., Kawano, T., Nishigaki, A., Yamanaka, D., Aoyama, B., Shigematsu-Locatelli, M., . . . Yokoyama, M. (2018). The role of hippocampal brain-derived neurotrophic factor in age-related differences in neuropathic pain behavior in rats. *Life Sci*, 197, 56-66. doi:10.1016/j.lfs.2018.01.030
- Tobaldini, G., Sardi, N. F., Guilhen, V. A., and Fischer, L. (2019). Pain Inhibits Pain: an Ascending-Descending Pain Modulation Pathway Linking Mesolimbic and Classical Descending Mechanisms. *Mol Neurobiol*, 56(2), 1000-1013. doi:10.1007/s12035-018-1116-7
- Treede, R. D. (2018). The International Association for the Study of Pain definition of pain: as valid in 2018 as in 1979, but in need of regularly updated footnotes. *Pain Rep*, 3(2), e643. doi:10.1097/PR9.0000000000000643
- Tsuda, M., Koga, K., Chen, T., and Zhuo, M. (2017). Neuronal and microglial mechanisms for neuropathic pain in the spinal dorsal horn and anterior cingulate cortex. *J Neurochem*, 141(4), 486-498. doi:10.1111/jnc.14001
- Tsuda, M., Masuda, T., Tozaki-Saitoh, H., and Inoue, K. (2013). P2X4 receptors and neuropathic pain. *Front Cell Neurosci*, 7, 191. doi:10.3389/fncel.2013.00191
- Tuchman, M., Barrett, J. A., Donevan, S., Hedberg, T. G., and Taylor, C. P. (2010). Central sensitization and Ca(V) $\alpha_2\delta$  ligands in chronic pain syndromes: pathologic processes and pharmacologic effect. *J Pain*, 11(12), 1241-1249. doi:10.1016/j.jpain.2010.02.024
- VanDenKerkhof, E. G., Mann, E. G., Torrance, N., Smith, B. H., Johnson, A., and Gilron, I. (2016). An Epidemiological Study of Neuropathic Pain Symptoms in Canadian Adults. *Pain Res Manag*, 2016, 9815750. doi:10.1155/2016/9815750
- Velázquez, K. T., Mohammad, H., and Sweitzer, S. M. (2007). Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. *Pharmacological research*, 55(6), 578-589. doi:10.1016/j.phrs.2007.04.006
- Vicario, N., Turnaturi, R., Spitale, F. M., Torrisi, F., Zappalà, A., Gulino, R., . . . Parenti, R. (2020). Intercellular communication and ion channels in neuropathic pain chronicization. *Inflammation Research*, 69(9), 841-850. doi:10.1007/s00011-020-01363-9
- Vysokov, N., McMahan, S. B., and Raouf, R. (2019). The role of NaV channels in synaptic transmission after axotomy in a microfluidic culture platform. *Scientific Reports*, 9(1), 12915. doi:10.1038/s41598-019-49214-w

- Wang, G., Yang, Y., Wang, C., Huang, J., Wang, X., Liu, Y., and Wang, H. (2020). Exploring the role and mechanisms of diallyl trisulfide and diallyl disulfide in chronic constriction-induced neuropathic pain in rats. *The Korean journal of pain*, 33(3), 216-225. doi:10.3344/kjp.2020.33.3.216
- Wang, H., Geng, Y., Zheng, W., Fang, W., Gu, E., Liu, X., and Li, W. (2018). Phantom limb syndrome induced by combined spinal and epidural anesthesia in patients undergoing elective open gynecological surgery. *Medicine (Baltimore)*, 97(41), e12708. doi:10.1097/MD.00000000000012708
- Wang, X., Zhang, L., Zhan, Y., Li, D., Zhang, Y., Wang, G., and Zhang, M. (2017). Contribution of BDNF/TrkB signalling in the rACC to the development of pain-related aversion via activation of ERK in rats with spared nerve injury. *Brain Research*, 1671, 111-120.
- Wang, Y., Wu, J., Wu, Z., Lin, Q., Yue, Y., and Fang, L. (2010). Regulation of AMPA receptors in spinal nociception. *Mol Pain*, 6, 5. doi:10.1186/1744-8069-6-5
- Welbat, J. U., Chaisawang, P., Pannangrong, W., and Wigmore, P. (2018). Neuroprotective Properties of Asiatic Acid against 5-Fluorouracil Chemotherapy in the Hippocampus in an Adult Rat Model. *Nutrients*, 10(8), 1053. doi:10.3390/nu10081053
- Wigerblad, G., Huie, J. R., Yin, H. Z., Leinders, M., Pritchard, R. A., Koehn, F. J., . . . Sorkin, L. S. (2017). Inflammation-induced GluA1 trafficking and membrane insertion of Ca(2+) permeable AMPA receptors in dorsal horn neurons is dependent on spinal tumor necrosis factor, PI3 kinase and protein kinase A. *Exp Neurol*, 293, 144-158. doi:10.1016/j.expneurol.2017.04.004
- Woolf, C. J. (1987). Physiological, Inflammatory and Neuropathic Pain. *15*, 39-62. doi:10.1007/978-3-7091-6984-1\_2
- Xia, L., Zhong, J., Xing Liu, M., Dou, N. N., and L, B. (2018). A Feasibility Research on Restoration of Demyelination in Trigeminal Nerve with Transnasal Administration of BDNF/ NGF Loading on PEG-PLA Nanoparticles. *Neuropsychiatry*, 08(03). doi:10.4172/Neuropsychiatry.1000417
- Xu, Q., and Yaksh, T. L. (2011). A brief comparison of the pathophysiology of inflammatory versus neuropathic pain. *Curr Opin Anaesthesiol*, 24(4), 400-407. doi:10.1097/ACO.0b013e32834871df
- Yalcin, I., Megat, S., Barthas, F., Waltisperger, E., Kremer, M., Salvat, E., and Barrot, M. (2014). The sciatic nerve cuffing model of neuropathic pain in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*(89), 51608. doi:10.3791/51608
- Yamashita, T., Sakuma, Y., Kato, Y., and Kotani, J. (2004). Effect of different suture materials on the chronic constriction injury model. *Journal of Osaka Dental University*, 38(2), 89-94. doi:10.18905/jodu.38.2\_89
- Yang, F., Xu, Q., Cheong, Y. K., Shechter, R., Sdrulla, A., He, S. Q., . . . Guan, Y. (2014). Comparison of intensity-dependent inhibition of spinal wide-dynamic range neurons by dorsal column and peripheral nerve stimulation in a rat model of neuropathic pain. *European journal of pain (London, England)*, 18(7), 978-988. doi:10.1002/j.1532-2149.2013.00443.x
- Yawn, B. P., Wollan, P. C., Weingarten, T. N., Watson, J. C., Hooten, W. M., and Melton, L. J., 3rd. (2009). The prevalence of neuropathic pain: clinical evaluation compared with screening tools in a community population. *Pain Med*, 10(3), 586-593. doi:10.1111/j.1526-4637.2009.00588.x
- Yin, Y., Yi, M.-H., and Kim, D. W. (2018). Impaired Autophagy of GABAergic Interneurons in Neuropathic Pain. *Pain Research and Management*, 2018, 9185368. doi:10.1155/2018/9185368

- Yoshida, Y., Umeno, A., and Shichiri, M. (2013). Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 52(1), 9-16. doi:10.3164/jcbtn.12-112
- Youn, D. H., Gerber, G., and Sather, W. A. (2013). Ionotropic glutamate receptors and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in long-term potentiation of spinal dorsal horn synapses and pain hypersensitivity. *Neural Plast*, 2013, 654257. doi:10.1155/2013/654257
- Yowtak, J., Lee, K. Y., Kim, H. Y., Wang, J., Kim, H. K., Chung, K., and Chung, J. M. (2011). Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. *Pain*, 152(4), 844-852. doi:10.1016/j.pain.2010.12.034
- Zhang, J.-M., and An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27-37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e
- Zhang, Z., Winborn, C. S., Marquez de Prado, B., and Russo, A. F. (2007). Sensitization of calcitonin gene-related peptide receptors by receptor activity-modifying protein-1 in the trigeminal ganglion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(10), 2693-2703. doi:10.1523/JNEUROSCI.4542-06.2007

# ETİK KURUL KARARI



T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 68489742-604.01.03-E.5510  
Konu : Hadyek izin onayı hk.

05/03/2019

PROF. DR. SÜLEYMAN SİRRI BİLGE  
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ

Laboratuvar Hayvanlar üzerinde Araştırma amaçlı çalışma yapmak üzere başvuran Prof. Dr Süleyman Sırrı BİLGE 'nin 2019/06 Kabul nolu "Siyatik sinir ligasyonu ile oluşturulan nöropatik ağrı modelinde asiaticasitin etkisinin erkek sıçanlarda araştırılması." başlıklı projesi 01.03.2019 tarihli Kurul toplantısında OMU- HADYEK'in yönergesi kapsamında değerlendirilmiş ve Hayvan Hakları ve Deney Etik İlkelerine Uygun bulunmuştur. Karar onayı ekte sunulmuştur.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ  
HADYEK

Ek: ETİK KURUL KARARI 2019-06- S.BİLGE

Adres: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Rektörlüğü  
Telefon: 0362 312 19 19 Faks: 0362 457 60 91  
Elektronik Ağ: <http://www.omu.edu.tr/>

Kep Adresi: [omu@hs01.kep.tr](mailto:omu@hs01.kep.tr)

Hayriye ÇELİK

5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na uygun olarak Güvenli Elektronik İmza ile üretilmiştir.  
Evrak teyidi <https://ebys.orgu.omu.edu.tr> adresinden 036U-Y3G7-0HH7 kodu ile yapılabilir.

## ÖZ GEÇMİŞ

Mustafa Nusret ÇİÇEKLİ Tokat Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2008 yılında mezun oldu. Mezuniyetten bu yana 2008-2010 yılları arası Turhal Devlet Hastanesi'nde mecburi hizmet görevini acil servis hekimi olarak bitirmiş, 2010-2015 yılları arası Medical Park Sağlık Grubu'nda acil servis hekimi olarak görev yapmıştır. 2011 yılında OMÜ LEE Tıbbi Farmakoloji Doktora programını girdi. 2015 yılında Atasam Sağlık Grubu'nda çalışmaya başlayan ve halen burada başhekimlik ve GETAT sorumlu hekimliği görevlerine devam etmekte olan Mustafa Nusret ÇİÇEKLİ iyi derecede İngilizce bilmektedir. Temel ilgi alanları, ağrı, nöropatik ağrı ve antioksidanlardır. (14/01/2022)

### İletişim Bilgileri

Öğrenci no :11220074

ORCID ID : 0000-0003-4608-3262