

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

**p-BENZOKİNON İLE İNDÜKLENEN NOSİSEPSİYONDA
NEBİVOLOL'ÜN KRONOBİYOLOJİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Nuray ŞENYER AÇIKGÖZ

Tez Danışmanı
Prof.Dr. NURETTİN ABACIOĞLU

ANKARA
Nisan-2007

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

DOKTORA /YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI

ÖĞRENCİNİN ADI ve SOYADI : Muray Açıkgöz
ANABİLİM DALI : Farmakoloji
SINAV TARİHİ : 27.04.2007
TEZ KONUSU : p-Bentololin ile indüklenen nosisepsiyonda
nebinololün kronofizyolojik etkilerinin
araştırılması

KARAR

:

Yukarıda belirtilen tarihte yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda yukarıda konusu belirtilen tezin

Düzeltilmesine :

Kabulüne : +

Reddine :

OYBİRLİĞİ / ~~OYÇOKLUĞU~~ ile karar verilmiştir.

GEREKÇE

:

Prof. Dr. Nurettin Açıkgöz

JÜRİ BAŞKANI

Prof. Dr. A. Turgut Özalp
ÜYE

Prof. Dr. Nilüfer Turan
ÜYE

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Tablolar	VI
Şekiller	VII
Kısaltmalar	IX

I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
------------------	---

II. GENEL BİLGİLER	2
--------------------	---

II.A. AĞRI	2
------------	---

II.A.1. AĞRININ PERİFERİK VE SANTRAL MEKANİZMALARI	3
---	---

II.A.1.1. PERİFERİK AĞRI	3
--------------------------	---

II.A.1.1.1. Ağrı Reseptörleri	3
-------------------------------	---

II.A.1.1.2. Periferik Ağrı Sinir Lifleri	4
--	---

II.A.1.1.3. Omurilikte Ağrı İletimi	7
-------------------------------------	---

II.A.1.2. SANTRAL AĞRI	10
------------------------	----

II.A.1.2.1. Asenden (çıkan) Ağrı Yolları	10
--	----

II.A.1.2.2. Desendan (inen) İnhibitör Yol	11
---	----

II.A.2. DENEY HAYVANLARINDA AĞRI OLUŞTURMA YÖNTEMLERİ	11
--	----

II.B. KRONOBİYOLOJİ VE AĞRI	14
-----------------------------	----

II.B.1. Kronobiyolojik Tanımlar	14
---------------------------------	----

II.B.2. Krononosisepsiyon	18
---------------------------	----

II.C. NEBİVOLOL VE KRONONOSİSEPSİYONDA	
NİTRİK OKSİT	21
II.C.1. NEBİVOLOL	21
II.C.1.1. Nebivololün Yapısı, Etkileri ve Mekanizması	21
II.C.1.2. Nebivololün Eliminasyonu ve Metabolizasyonu	25
II.C.1.3. Nebivolol ve Nosiseptif Prosesler	26
II.C.2. L-ARJİNİN-NO\GMP YOLAĞI VE	
KRONONOSİSEPSİYON	27
II.C.2.1. NO Biyosentezi	27
II.C.2.2. NO'nun Etki Mekanizması ve Etki Yerleri	29
II.C.2.3. L-arjinin-NO\GMP Yolağı ile İlgili Ritimler ve	
Nosiseptif Proseslerde NO'nun Rolü	30
III. MATERYAL VE YÖNTEM	35
III.A. MATERYAL	35
III.A.1.DENEY HAYVANLARI	35
III.A.2. KİMYASAL MADDELER VE HAZIRLANMASI	35
III.A.3. ARAÇ VE GEREÇLER	36
III.B. YÖNTEMLER	36
III.B.1. KIVRANMA ALJEZİ MODELİ	36
III.C. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	38
IV. BULGULAR	39
IV.A. KULLANILAN MADDELERİN TEK BAŞLARINA	
OLUŞTURDUKLARI % ANTİNOİSEPSİYON	39
IV.A.1. Kontrol Grubunda Oluşan Nosisepsiyon	39

IV.A.2. Morfin, L-NAME ve L-arjinin Gruplarında Oluşan % Antiosiseptif Aktivite	39
IV.A.3. Nebivololün Oluşturduğu % Antinosiseptif Aktivite	40
IV.B. KOMBİNASYONLARDA ORTAYA ÇIKAN % ANTİNOSİSEPSİYON	41
IV.B.1. Morfin+L-NAME ve Morfin+L-arjinin Gruplarında Ortaya Çıkan % Antinosisepsiyon	41
IV.B.2. Neivolol+morfin Kombinasyonunda Ortaya Çıkan % Antinosiseptif Aktivite	42
IV.B.3. Nebivolol+L-arjinin Kombinasyonunda Ortaya Çıkan % Antinosiseptif Aktivite	43
IV.B.4. Nebivolol+L-NAME Kombinasyonunda Ortaya Çıkan % Antinosiseptif Aktivite	44
IV.B.5. Nebivolol+morfin+L-arjinin Kombinasyonunda Ortaya Çıkan % Antinosiseptif Aktivite	45
IV.B.6. Nebivolol+morfin+L-NAME Kombinasyonunda Ortaya Çıkan % Antinosiseptif Aktivite	46
IV.C. TÜM GRUPLARIN KARŞILAŞTIRILMASI	47
IV.C.1. 09 ⁰⁰ Erkek Grupları	47
IV.C.2. 09 ⁰⁰ Dişi Grupları	48
IV.C.3. 21 ⁰⁰ Erkek Grupları	48
IV.C.4. 21 ⁰⁰ Dişi Grupları	48
 V. TARTIŞMA	 53
 VI. ÖZET	 57

VII. SUMMARY	58
VIII. KAYNAKLAR	59
IX. ÖZGEÇMİŞ	76

Tablolar

Tablo 1. Biyolojik Ritimlerde Sık Karşılaşılan Frekans Ritimleri	16
Tablo 2. Kontrol Grubunda Oluşan Nosisepsiyon	39
Tablo 3. Morfin, L-NAME ve L-arjinin Gruplarında Oluşan % Antinosiseptif Aktivite	40
Tablo 4. Morfin+L-NAME ve morfin+L-arjinin Gruplarında Oluşan % Antinosiseptif Aktivite	42

Şekiller

Şekil 1. Spinal sinir ve lifleri	6
Şekil 2. Nebivololün kimyasal yapısı	22
Şekil 3. Nebivolol NO yapımını uyarır	24
Şekil 4. NO biyosentezi ve poliamin yolu	28
Şekil 5. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvranma aljezi modelinde saat 09 ⁰⁰ ve 21 ⁰⁰ ,da dişi ve erkek farelere nebivolol uygulanması ile oluşan % antinosiseptif aktivite	41
Şekil 6. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvranma aljezi modelinde saat 09 ⁰⁰ ve 21 ⁰⁰ ,da dişi ve erkek farelere nebivolol+morfin uygulanması ile oluşan % antinosiseptif aktivite	43
Şekil 7. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvranma aljezi modelinde saat 09 ⁰⁰ ve 21 ⁰⁰ ,da dişi ve erkek farelere nebivolol+L-arjinin uygulanması ile oluşan % antinosiseptif aktivite	44
Şekil 8. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvranma aljezi modelinde saat 09 ⁰⁰ ve 21 ⁰⁰ ,da dişi ve erkek farelere nebivolol+L-NAME uygulanması ile oluşan % antinosiseptif aktivite	45
Şekil 9. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvranma aljezi modelinde saat 09 ⁰⁰ ve 21 ⁰⁰ ,da dişi ve erkek farelere nebivolol+morfin+L-arjinin uygulanması ile oluşan % antinosiseptif aktivite	46
Şekil 10. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvranma aljezi modelinde saat 09 ⁰⁰ ve 21 ⁰⁰ ,da dişi ve erkek farelere nebivolol+morfin+L-NAME uygulanması ile oluşan % antinosiseptif aktivite	47

Şekil 11. Saat 09 ⁰⁰ , da erkek farelerde oluşan % antinosiseptif Aktivite	49
Şekil 12. Saat 09 ⁰⁰ , da dişi farelerde oluşan % antinosiseptif Aktivite	50
Şekil 13. Saat 21 ⁰⁰ , da erkek farelerde oluşan % antinosiseptif Aktivite	51
Şekil 14. Saat 21 ⁰⁰ , da dişi farelerde oluşan % antinosiseptif Aktivite	52

Kısaltmalar

NO	Nitrik Oksit
sGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
NMDA	N-metil-D-aspartat
WDR	Wide Dynamic Range (Geniş Dinamik Aralık)
CGRP	Kalsitonin Geni ile İlişkili Peptit
SKN	Supra Kiyazmatik Nukleus
LH	Lüteinleştirici Hormon
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
5-HT	Serotonin
SNP	Soydum Nitro Prusid
GTP	Guanozin Trifosfat
EDRF	Endotel Bağımlı Gevşetici Faktör
L-NMMA	N ^G -monometil L-arjinin
L-NİO	N-iminoetil-L-ornitin
ADMA	N ^G ,N ^G -dimetil-L-arjinin
VIP	Vazoaktif İntestinal Polipeptit
CAMKII	Ca ⁺² /kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz Tip II
PKA	Protein Kinaz A
PKG	Protein Kinaz G
L-NNA	N ^G -nitro-L-arjinin
p-BK	para-Benzokinon
s.k	Subkutan
SIN-1	3-morfolino inosidonimin

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Ağrı, hastaların sağlık kuruluşlarına başvurmalarına neden olan ortak semptomlardan birisidir. Son yıllarda ağrı mekanizmaları ve ağrı tedavileriyle ilgili çok önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Ağrı ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir.

Nebivolol, selektif bir β_1 -reseptör antagonistidir. Nebivololün nosisepsiyon üzerindeki etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma mevcut değildir. Nebivolol nitrik oksit sentaz aracılığıyla nitrik oksit üretiminde bir artışa neden olur. Nitrik oksitin de nosisepsiyon üzerinde çok önemli etkileri olduğu yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır. Nebivololün nosiseptif proseslerdeki rolünün büyük olasılıkla nitrik oksite bağlı olabileceği düşünülmektedir. Nitrik oksitin nosisepsiyon üzerindeki etkileri oldukça karmaşıktır; spinal ve supraspinal düzeylerde hem nosisepsiyon hem de antinosisepsiyon oluşturabilir.

Ağrı şiddeti günün farklı zamanlarında farklılıklar göstermektedir. Bu yüzden ağrı çalışmalarında ağrının ritmisitesi de göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu çalışmada farede kimyasal aljezik para-benzokinon ile indüklenen abdominal konstriksiyon (writhing) ağrı modelinde selektif β_1 -reseptör antagonisti olan nebivololün analjezik etki kalıbında, L-arjinin-NO/sGMP yolağının rolü ve kullanılan tüm maddelerin ve kombinasyonlarının kronobiyolojik değişiklikleri araştırılmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

II.A. AĞRI

1979 yılında IASP'nin (International Association for the Study of Pain) taksonomi komitesi ağrıyı şu şekilde tanımlamıştır: Ağrı; var olan veya olası doku hasarına eşlik eden veya bu hasar ile tanımlanabilen, hoşagitmeyen duysal ve emosyonel bir deneyimdir. Tanımdan da anlaşılacağı gibi ağrı, öznel bir kavramdır¹. Ağrının temel öğeleri şunlardır: nosisepsiyon, ağrının algılanması, acı çekme ve ağrıya bağlı davranışlar. Nosisepsiyon; travmatik veya ağrılı uyaranlara karşı oluşan nöral yanıt anlamına gelir, yani ağrının oluşumudur; fakat tüm ağrılar nosisepsiyon sonucu oluşmaz. Ağrı algılanması duysal, emosyonel ve davranışsal etkenlerden etkilenen oldukça karmaşık bir olaydır. Acı ise korku, anksiyete, stres, sevilen bir şeyin yitirilmesi veya diğer psikolojik olaylarla indüklenen negatif bir yanıtıdır^{1,2}. Ağrıya bağlı davranışlar ise ağrı ve acı sonrası kişide ortaya çıkan değişikliklerdir. Bunlar kişinin yüzünü ekşitmesi, bağırması, çalışmayı reddetmesi, kaçma kurtulma reaksiyonu şeklinde sıralanabilir².

Ağrı, kaynağına, şiddeti ve süresine, nedenine ve niteliğine göre 4 ana grupta sınıflandırılır:

I- Kaynağına göre:

a) Somatik ağrı

1) Yüzeysel veya cilt ağrısı

2) Derin ağrı

b) Viseral ağrı

c) Yansıyan ağrı

- d) Projekte ağrı
- e) Psikojenik-fonksiyonel ağrı

II- Şiddeti ve süresine göre:

- a) Akut ağrı
- b) Kronik ağrı

III- Nedenlerine göre ağrılar:

- a) Baş ağrısı
- b) Nevralji
- c) İskelet-kas ağrıları
- d) Artraljiler
- e) Karın ağrıları

IV- Niteliğine göre:

- a) Batıcı (miyelinli Aδ tipi sinir lifleri)
- b) Yanıcı (miyelinsiz C tipi sinir lifleri)
- c) Sancılı ağrı (miyelinsiz C tipi sinir lifleri)³

II.A.1. AĞRININ PERİFERİK VE SANTRAL MEKANİZ- MALARI

II.A.1.1. PERİFERİK AĞRI

II.A.1.1.1 Ağrı reseptörleri:

Ağrı algısı, nosiseptör olarak adlandırılan ağrı reseptörlerinin stimülasyonu ile başlar. Nosiseptörler serbest sinir uçlarıdır ve ağrılı fizyolojik uyarılara yanıt verirler. Nosiseptörler birçok dokuda bulunur. Beyin ve alveoller nosiseptör içermezken deri, periosteum, eklem yüzleri ve arteriyel duvarlarda yaygın olarak bulunurlar. Nosiseptörler direkt ve indirekt olarak

uyarılabilirler. Direkt uyarılmaları mekanik, termal ve kimyasal ağrı uyaranları sonucu oluşur⁴. Mekanik uyarana yanıt veren mekanosiseptörler sıkmaya ve iğne batırmaya duyarlı, termal stimülasyona yanıt veren termonosiseptörler aşırı basıya, aşırı ısıya ve alojenlere duyarlıdır. Kemoreseptörler ise kimyasal stimülasyona yanıt verirler¹. İndirekt uyarılmada ise mekanik, termal ya da kimyasal ağrı uyaranları sonucu ekstraselüler sıvıya geçen kimyasallar indirekt olarak nosiseptörleri stimüle eder.

Ağrı algılanmasında birçok endojen kimyasal rol oynar. Bunları kimyasal yapılarına göre şu şekilde sınıflandırabiliriz:

- 1)Peptitler: P maddesi, bradikinin
- 2)Aminler: histamin, serotonin, asetilkolin
- 3)Lipidler: prostaglandinler
- 4)İyonlar: potasyum iyonu⁴

II.A.1.1.2. Periferik ağrı sinir lifleri:

Nosiseptörler miyelinli A δ ve miyelinsiz C sinir liflerinin serbest uçlarında bulunur. Miyelinli A δ lifleri hızlı, keskin, akut özellikteki impulsları iletirler. İnce liflerdir, hızları 6-30 m/sn'dir. Miyelinsiz C lifleri ise yavaş liflerdir. Yanıcı, zonklayıcı ve kronik özellikteki duyuları iletirler. Hızları 0,5-2 m/sn'dir⁴. Miyelinli A δ lifleri termal ve mekanik uyaranlarla uyarılırken; miyelinsiz C lifleri polimodal özellik gösterirler, her türlü uyarana karşı duyarlıdırlar².

Ağrılı uyaran 4 aşamada üst merkezlere iletilir:

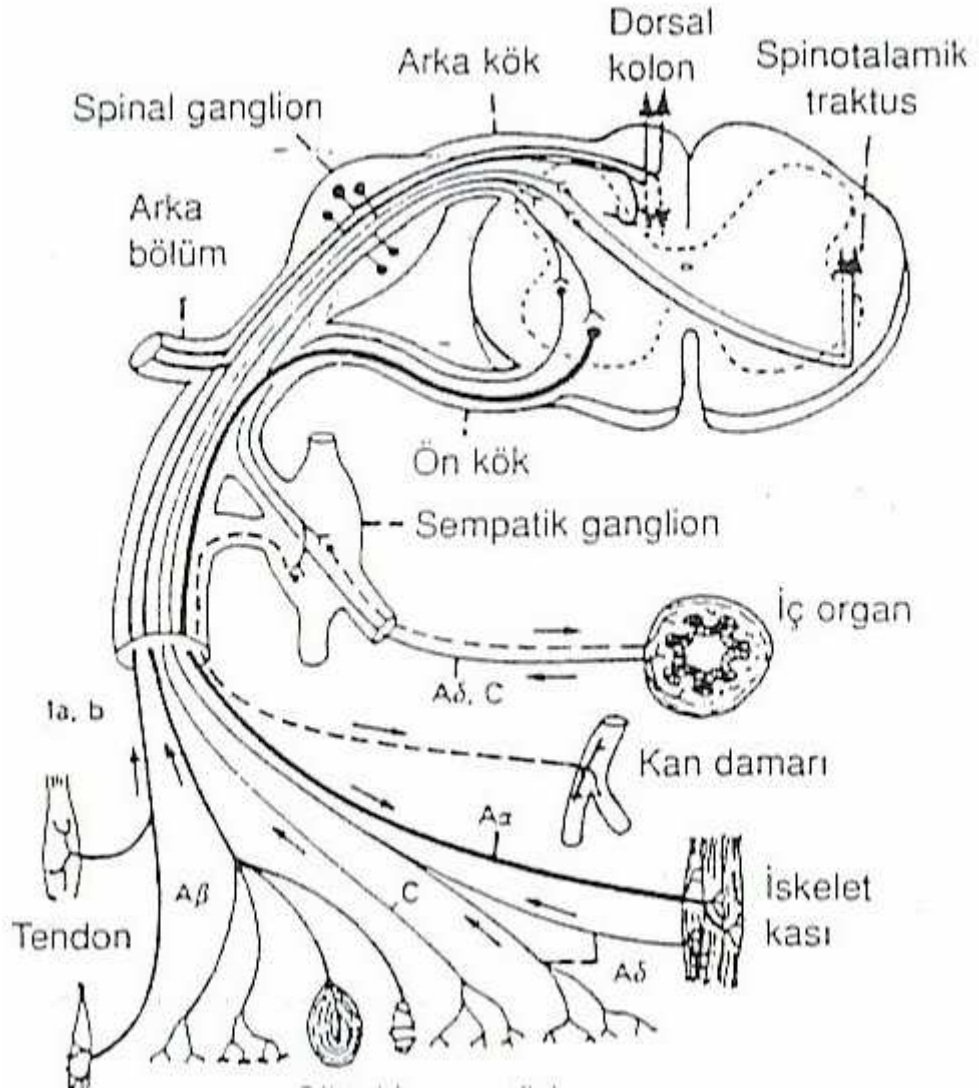
1) Transdüksiyon: Bir enerjinin başka bir enerjiye dönüşmesidir. Nosiseptörler belli bir ısıya duyarsızken ısının artmasıyla nosiseptörler duyarlı hale geçebilirler.

2) Transmisyon: Nosiseptörler tarafından algılanan ağrının daha çok A δ ve C lifleri ile üst merkezlere iletilmesi olayıdır.

3) Modülasyon: Ağrılı uyarının spinal kord düzeyinde değişikliğe uğrayarak daha üst merkezlere iletilmesi. 1965 yılında Melzack ve Wall tarafından ileri sürülen kapı-kontrol teorisine göre deriden gelen uyarılar spinal kord ve beyinde modülasyona uğrarlar.

4)Persepsiyon: Ağrının algılanması².

Vücudun herhangi bir yerinde oluşan travma veya sinir tahribatı başka bölgelerde de hasara yol açabilir. Sonuçta periferik ve merkezi sinir sisteminde değişik yanıtlar ortaya çıkabilir. Bu anlamda ağrıyı fizyolojik ve fizyopatolojik ağrı olarak sınıflandırabiliriz. Fizyolojik ağrı koruyucudur, potansiyel harabiyete karşı korur, geçicidir, kolay lokalizedir. Fizyolojik ağrı, inflamasyon ya da sinir tahribatı durumlarında, periferde ağrılı uyarıların nosiseptörleri uyarması ve bunun beyin tarafından zararlı bir uyaran olarak algılanmasıyla ortaya çıkar^{1,2}. Uzun süreli, güçlü, tekrarlayan ağrılar ağrı sistemini etkileyerek duyarlı hale gelmesine neden olurlar. Bu da fizyopatolojik ağrıya yol açar. Fizyopatolojik ağrıda A δ ve C liflerinin yanında A β lifleri de aktif hale geçebilir. Fizyopatolojik ağrının 3 temel süreci vardır:



Kas içiği Ciltteki reseptörler

Şekil 1. Spinal Sinir ve Lifleri²

1) Periferik sensitizasyon: İnfeksiyon, doku travması gibi olaylar sonucu nosiseptör uçları aşırı duyarlı hale gelerek önceden zararlı olmayan güçsüz uyaranlar tarafından aktive olurlar ve sonuçta ağrı oluşur.

2) Aşırı uyarılabilir hale gelen duysal nöronlar yolları üzerindeki anormal bölgelerde ektopik deşarjlar oluşturarak fizyopatolojik ağrı oluşturabilirler.

3) Omurilikte ve beyindeki devrelerde amplifikasyon artışı ağrıda artışa neden olur. Bu durum merkezi duyarlılaşma (santral sensitizasyon) olarak adlandırılır. Merkezi duyarlılaşma NMDA reseptörlerinin aktivasyonunu içerir ve NMDA reseptör antagonistleriyle engellenebilir. Merkezi duyarlılaşmada sadece dokunmaya duyarlı olan A β afferentleri aktive eden zayıf uyaranlar ağrı oluşturabilirler. A β afferentleri dokunma ve titreşim duyumunu iletirler⁵.

II.A.1.1.3. Omurilikte ağrı iletimi:

Ağrılı uyaranlar periferden serebral kortekse üç nöron yollarıyla geçer. Primer afferent nöronlar arka kök gangliyonlarında lokalizedir ve her birinin tek aksonu vardır. Bir uçları innerve ettikleri periferik dokuya giderken diğer uçları spinal kordun arka köküne gider. Primer afferent nöronlar dorsal kökte ikinci sıra nöronlarla sinaps yaparlar. Bunların aksonları kontralateral spinotalamik traktus ile talamusa çıkar. Talamik nukleusta üçüncü sıra nöronlarla sinaps yaparlar. Bunların uzantıları serebral korteksin postsentral girusuna projekte olur. Bu alanlarda ağrının algılanması ve tam lokalizasyonu yapılmaktadır.

1954 yılında Rexod omurilik gri cevherindeki bazı yapısal katmanları tanımlamıştır. Nosisepsiyonda lamina I, II ve V önemlidir.

Lamina I (marjinal tabaka)'deki hücreler öncelikle ağrılı uyaranlara yanıt verirler, zararsız uyaranlara da yanıt verdikleri bilinmektedir. A δ ve C primer afferent nosiseptörlerin sonlandığı bölgedir. Çoğunun aksonları pinotalamik traktusa karışmaktadır.

Lamina II (substantia gelatinosa) nöronları lamina I ve V'in hücrelerini modüle ederler. C ve A δ liflerinin sonlandığı bölgedir. Ağrılı uyaranlara yanıt veren küçük internöronlar içerirler.

Lamina V'teki hücreler ağrılı, ağrısız uyaranlara ve visseral stimuluslara yanıt verirler. Wide-dynamic-range (WDR, geniş dinamik alan) hücreleri buradadır. Kalın ve ince afferent liflerden (A β , A δ) uyarı alırlar¹.

Somatik duyular vücuttan duysal enfomasyon toplayan sinirsel mekanizmalardır. 3 çeşittirler:

1) Mekanoreseptör somatik duyular: Doku veya organların mekanik yer değıştirmesi ile uyarılırlar.

2) Termoreseptör somatik duyular: Sıcak ve soğuk algısında rol oynarlar.

3) Nosiseptif somatik duyular: Dokulara zarar veren bir uyarı ile algılanan ağrı duyusunda rol oynarlar.

Vücudun somatik segmentlerinden gelen duysal enfomasyon omurilik arka kökünden girer ve arka kordon sistemi ve spinotalamik sistem içinde omurilikten kortekse doğru uzanır. A β tipi kalın duysal lifler arka kordon sisteminde somatik iletiyi sağlar. Bunlar arka kökten girip arka kökten

geçerek omurilik boyunca yukarı çıkar, talamusa uzanır. Taktıl duyusu (dokunma, basınç, vibrasyon gibi) taşırılar. Spinotalamik sistemde iletiyi C ve Aδ tipi lifler sağlar. Bu sinirler arka boynuzdan girerek ön ve yan kordon olarak omurilik boyunca talamus ve kortekse ulaşırılar. Spinotalamik sistem iki demet halindedir. Birincisi neospinotalamik yol, ağrının direkt yoludur; ikincisi ise spinoretikülodiensefalik polisinaptik yol, ağrının indirekt yoludur, bulbus ve mezensefalonun retiküler formasyonunda sonlanır.

Vücutta Aδ tipi lifler hızlı, iyi lokalize edilen batıcı ağrı duyumunu iletirken; C lifleri yeri belirsiz, künt, yavaş, gecikmiş ağrı duyumunu iletirler. Hızlı ağrı neospinotalamik yol ile, yavaş ağrı ise spinoretikülodiensefalik yol ile üst merkezlere taşınır³.

Arka boynuzdaki ağrı sürecinde bazı nörotransmitterlerin ve nöromodülatörlerin önemi büyüktür. Glutamat ve aspartat gibi eksitatör amino asitler arka boynuzda ağırlı uyarının iletiminde rol alırlar. NMDA ve nonNMDA reseptörleri, glutamat reseptörleri, opioid (μ , κ), gaba, serotonin ve adenosin reseptörleri; primer afferentlerden salgılanan P maddesi, nörokinin A, CGRP gibi peptitler de nosiseptif transmisyon ya da modülasyonda rol alırlar.

NMDA reseptörleri kronik ağrıdaki uzun süreli değişikliklerde önem kazanır. Uzun süre aktive olan nonNMDA ve nörokinin reseptörleri NMDA reseptörlerini harekete geçirir veya harekete hazır hale getirir. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu hücre içinde ağırlı uyarılara karşı hassasiyeti artırır. Dinlenme durumunda NMDA reseptör kanalı magnezyum tıkaçı ile bloke edilmiştir. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu nörokinin reseptörlerinin hareketine ve magnezyum tıkaçının ortadan kalkmasına neden olur. Sonuçta hücre içi kalsiyum girişi ve onkojen indüksiyonu, nitrik oksit oluşumu ve sGMP, eikosanoidler ve protein kinaz C gibi maddelerin aktivasyonu

gerçekleşir. Uzun süreli uyaran bu yolla glutamat salgılanmasına ve hücrenin ölümüne neden olur².

Adenozin, arka boynuzda nosiseptif aktiviteyi ayarlar. A₁ reseptörü adenil siklazı inhibe ederken, A₂ adenil siklazı stimüle eder. Antinosisseptif etki A₁ reseptörü aracılığıyla gerçekleşir¹.

Opioid reseptörleri de pre- ve postsinaptik olarak arka boynuzda bulunurlar. Presinaptik opioid reseptörlerinin aktivasyonu ağrı üzerinde inhibitör etki oluşturur².

II.A.1.2. SANTRAL AĞRI

Periferde ortaya çıkan ağrının santrale taşınması asenden (çıkan) yol ve desenden (inen) inhibitör yol ile olur.

II.A.1.2.1. Asenden (çıkan) ağrı yolları:

Çıkan ağrı yolu 2 sisteme ayrılır:

1) Direkt duyuşal yol (neospinotalamik yol): Bu yol ağrının yer, şiddet, zaman gibi diskriminatif boyutlarıyla algılanmasını sağlar. Aδ ve C lifleri ile arka kökten giren ağrılı uyaran spinal gangliyonda substantia gelatinosa 2. duyuşal nöron ile sinaps yapar. Kontralateral çaprazlaşma ile omurilik ön, yan kordunu oluşturur ve talamusun spesifik çekirdeklerine çıkar. Somestetik kortekse difüze olur.

2) İndirekt duyuşal yol (spinoretiküler yol): Bu yol hipotalamusun medyan ön beyin demeti üzerinden limbik sistem ve ön beyni uyarır. Ağrı ile ilgili emosyonel ve otonomik yanıtların oluşmasını sağlar. C lifleri substantia gelatinosa'da sinaps yapar. Çaprazlaşarak ön, yan kordonu

oluştururlar ve mezensefalik retiküler formasyonda sonlanırlar. Spesifik olmayan talamik çekirdeklerden korteksin her tarafına difüze olurlar³.

II.A.1.2.2. Desenden (inen) inhibitör yol:

İnen inhibitör yol 3 temel bileşenden oluşur:

1) Periakvaduktal gri maddedeki (mezensefalondaki silvius kanal bölgesi) nöronlardan başlayan bulbus retiküler formasyonundaki n.raphe magnus'da sinaps yapan yol.

2) Pons ve bulbustaki retiküler formasyonun medyan kısmında bulunan n.reticularis gigantocellularis ve n.reticularis parvocellularis'den başlayan inisiyasyon yol.

3) Locus ceruleus noradrenerjik inisiyasyon yol.

İnen kontrol sistemi içinde serotonin, noradrenalin, GABA ve glisin gibi çeşitli nörotransmitterler nosiseptif inputun inhibisyonunda ve nöropatik ağrının ortaya çıkmasında rol alırlar. Noradrenalinin ise opioid agonistleri ile sinerjistik etki yaptığı gösterilmiştir³.

II.A.2. DENEY HAYVANLARINDA AĞRI OLUŞTURMA YÖNTEMLERİ

Hayvanlarda ağrı eşiğinin ve analjezinin değerlendirilmesi oldukça güç bir olaydır. Ağrılı uyaran karşısında hayvan kendini sözlü olarak

ifade edemeyeceğinden refleks, kaçma gibi motor davranışlarla ifade edecektir. Bu davranışların doğru değerlendirilmesi hayvanın ağrıyı algıladığı anın tespitinde bize yardımcı olur.

Ağrı çalışmalarında elektriksel, termal, mekanik veya kimyasal uyaranlar kullanılır.

Elektriksel uyaran: Kantitatif, tekrarlanabilir ve invazivdir. Doğal tipte bir uyaran olmaması ve yoğun elektriksel uyarının tüm periferik sinirlerde uyarıya sebep olması yöntemin dezavantajıdır.

Termal uyaran: Kütanöz reseptörlerin uyarılması için seçici bir yöntemdir. Termal uyaran şu testlerde kullanılır:

1) Tail flick ve tail immersiyon testleri: Fare ve sıçanlarda kullanılır. Tail flick testinde hayvanın kuyruğunun belli bir noktasına bir lamba ile ısı ile uygulanır. Hayvan ağrıyı hissettiği an kuyruğunu çeker. Uygulama başladığı andan hayvanın kuyruğunu çekmesine kadar geçen süre tespit edilir. Bu süre hayvanın ağrı eşiğini belirler. Isı 20 saniyeden fazla uygulanmaz, basit bir yöntemdir, çok fazla bireysel değişkenlik göstermez.

Tail immersiyon testinde ise hayvanın kuyruğu sabit sıcaklıktaki suya batırılır. Test, hayvanın kuyruğunu ya da tüm bedenini çekmesi ile sonlanır. Reaksiyon süresi hayvanın ağrı eşiğini belirler.

2) Hot-plate testi: En çok kullanılan testlerden biridir. Fare ve sıçanlarda kullanılır. 50-56°C'ye ısıtılmış bakır veya alüminyum yüzeye hayvanın pençesinin temas etmesi sağlandıktan sonra arka ayağını çekmesine kadar geçen süre tespit edilir. Hayvanda ağrı yanıtı olarak arka ayağın

çekilmesi, pençelerini yalaması gözlenir. Yöntem çok fazla bireysel değişkenlik gösterir.

3) Soğuk uyaran testi: Daha çok kronik ya da nöropatik ağrı deneylerinde kullanılır. Hayvanın kuyruğu soğuk suya batırılır ve kuyruğunu refleks olarak çekmesi gözlenir.

Mekanik uyaran: Uyaran, alınan cevapla kesilir. Uyarı spesifik değildir. Mekanik uyaran şu testlerde kullanılır:

1) Ayak çekme testi: Hayvanın pençesine giderek artan basınç uygulanır. Hayvanın ayak çekme davranışı gibi tepkileri göstermesi uygulamanın sonudur. Bu yöntem inflamasyon gibi nedenler sonucu oluşan hiperaljezi durumlarında kullanılır. Bu yöntemde yanıtlar oldukça yüksek bireysel farklılık gösterir.

2) Kuyruk sıkıştırma testi (tail clip testi): Ayak çekme testi gibidir. Uygulanan basıncın büyüklüğüne bağlı olarak ya çok çabuk ya da daha uzun sürede hayvan klipse tepki gösterir.

Kimyasal uyaran: Kimyasal ajanların uygulanması sonucu yavaş tipte bir ağrı oluşur. Progresiftir, uzun sürer ve geri dönüşümsüzdür. Kimyasal uyarının kullanıldığı testler:

1) Karın germe/kıvrınma (writhing) testi: Hayvan fenilkinon veya asetik asit enjekte edilir. Enjeksiyondan sonraki 15-20 dakika içinde hayvanda karın kaslarının kasılması ve akabinde arka ayaklarda ekstansiyon gözlenir.

2) Formalin testi: Kedi, sıçan ve farelerde kullanılır. Fareye %0.02-5'lik formalin solüsyonunun subkutan olarak arka ayağa enjeksiyonu sonucu hayvanın ayağını yalaması ve/veya ısırması gözlenir. İki aşamalıdır: Akut faz enjeksiyondan hemen sonraki ilk 5-10 dakikadır. Bu fazda nosiseptörler kimyasalla direkt uyarılmıştır. Tonik faz ise enjeksiyondan 15 dakika sonra başlar ve 1 saat kadar sürer, tonik faza inflamasyon eşlik eder⁶.

II.B. KRONOBİYOLOJİ VE AĞRI

II.B.1. KRONOBİYOLOJİK TANIMLAR

Kronobiyoloji kelimesi chronos (zaman), bios (yaşam) ve logos (bilim) kelimelerinden türemiştir. Kronobiyoloji zaman bağlı olarak düzenli bir şekilde tekrarlanan biyolojik değişiklikleri inceleyen bilim dalıdır. Zamana bağlı olarak gözlenen düzenli biyolojik değişikliklere ise biyolojik ritimler denir⁷. Biyolojik ritimlerin ortak özellikleri şunlardır:

- 1) Sabit çevresel koşullarda devam ederler.
- 2) Genetik orijinlidirler.
- 3) Biyolojik saatlerle kontrol edilirler. Bunlardan biri memelilerde ve bazı kuş türlerinde açıklanmış olan suprakiazmatik nukleidir (SKN).
- 4) Biyolojik saatler senkronizör olarak adlandırılan çevresel işaretlerin (şafak,gün kararması gibi) periyodik değişikliklerine karşı hassastır.
- 5) Bu özellikler sinirleri ve endokrin sistemi olmayan tek hücreli ökaryotlarda ve insanoğlunda benzerdir⁸.

Biyolojik ritimlerle ilgili bazı parametreler aşağıda açıklanmıştır:

Frekans: Birim zamanda görölme sıklığıdır.

Periyot : Bir tam çevirimin ne kadar sürede tamamlandığını gösterir.

Mesor (Midline Estimating Statistic of Rhythm): Ritmin en yüksek ve en düşük değerinin ortalamasıdır. Eğer gözlemler eşit aralıklarla yapılmışsa aritmetik ortalamaya eşittir.

Amplitude: Ritmik değişimin maksimum ve minimum değerleri arasındaki farkın yarısı .

Akrofaz ve Batifaz: Ritmik bir fonksiyonda en yüksek değerin ortaya çıkma zamanına akrofaz, en düşük değerin ortaya çıkma zamanına ise batifaz denir.

Tablo 1. Biyolojik ritimlerde sık karşılaşılan frekans ritimleri⁹

Ritim Alanı	Genişlik
Ultradiyan	$t < 20$ Saat (S)
Sirkadiyan	$20 S \leq t \leq 28 S$
İnfradiyan	$t > 28 S$
<i>Sirkaseptan</i>	$t = 7 \pm 3$ gün
<i>Sirkadiseptan</i>	$t = 14 \pm 3$ gün
<i>Sirkavijintan</i>	$t = 21 \pm 3$ gün
<i>Sirkatrivijintan</i>	$t = 30 \pm 5$ gün
<i>Sirkannual</i>	$t = 1$ sene ± 3 ay

(t: periyot)

Tabloda da görüldüğü gibi periyodu 20 saatten az olan ritimlere ultradiyan, yaklaşık 24 saat olan ritimlere sirkadiyan ve periyodu 28 saatin üzerinde olan ritimlere ise infradiyan ritimler denir. İnfradiyan ritimler de kendi içinde periyotlarına göre sirkaseptan, sirkadiseptan, sirkavijintan, sirkatrivijintan ve sirkannual olarak ayrılmıştır. Bazı hormonların kan düzeyleri sirkadiyan ritim gösterirken, EEG, kalp ve solunum hızı, kan basıncı ritimleri ultradiyan ritim özelliği gösterir. İnfradiyan ritimlere en güzel örnek ise menstrüal siklustur.

Organizmada kendi kendine oluşan, genetik orijinli ritimlere endojen ritimler denir. Endojen ritimler üzerinde etkili olan gece, gündüz, aktivite, dinlenme durumu gibi çevresel uyaranlara ekzojen tempocu denir. Ekzojen uyarıcı olmadığında bile ritimler devam edebilir. Bu ritimlerin devamlılığını endojen ritim uyarıcıları (sirkadiyan pacemaker) sağlar⁹. Omurgalılarda sirkadiyan saat suprakiazmatik nukleus (SKN), retina ve pineal gibi nöral yapılarda lokalize olmuştur^{10,11}. Bu yapıların sirkadiyan sistemdeki rolü benzer türler arasında çeşitlilik gösterir¹². Kuşlarda sirkadiyan ritimler retina, pineal ve SKN'den oluşan tempocu bir sistem ile regüle olurken,

memeli olmayan omurgalılarda sirkadiyan kontrol çoğunlukla retina ve pineal ile sağlanır¹³. Memelilerde ana sirkadiyan pacemaker SKN'dir^{9,13}.

Sirkadiyan ritmisite SKN'nin çekirdek nöronlarında oluşur ve direkt ve indirekt retinal girişle senkronize olur. SKN'de oluşan sirkadiyan ritim vücut sıcaklığı, lokomotor aktivite, uyku, oksijen utilizasyonu, su ve yiyecek alımı, adrenal kortikosteron ve pineal melatonin sentezi gibi fizyolojik fonksiyonları etkiler. Bu saat kontrollü yolak multisinaptik bir yoldur. Bu yolda SKN pineal hormon melatoninin sentezini ve salıverilmesini kontrol eder. Melatonin, ritmin fazını SKN nöronal aktivitesinin feedback inhibisyonuyla etkileyebilir¹⁴. Melatoninin sirkadiyan davranışlardaki rolü türler arasında çeşitlilik gösterir. Hamsterda melatonin mevsimsel değişikliklere aracılık ederken, insanlarda uyku tetikleyici bir hormondur¹⁵.

İnsanlarda endokrin dokular ve bezler immün sistem ile birlikte oluşmuştur. Bunların görevi tüm hücrelerin ve organların büyüme ve gelişmelerini ve çevresel uyaranlara olan yanıtlarını düzenlemektir. Nöroendokrin sistem elektrolit ritimlerini, karbonhidrat metabolizmasını ve kan basıncı ve kan şekeri seviyelerindeki ritmik değişiklikleri düzenler. Her hormon farklı frekanslar gösterir. Örneğin erişkin kadın ve erkeklerde lüteinleştirici hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormon (FSH) çoğunlukla pulsatil ve ultradiyan bir ritim gösterirken çocuklarda ve daha büyük deneklerde sirkadiyan ritim daha belirgin ortaya çıkar. ACTH ise daha belirgin bir pulsatil salınım gösterir. Nöroendokrin sistemdeki bu ritimler teşhis ve tedavide çok önemlidir. Örneğin sabahın erken saatlerinde kortizol tespiti adrenal bir eksiklik olduğunu gösterirken, akşam kortizol tespiti Cushings' sendromunun teşhisinde kullanılır. Ayrıca bazı endokrin testler mevsimlere bağlı olarak farklı sonuçlar gösterir: örneğin gonadotropin ve GRH. Hormon tedavisi farklı zamanlardaki dozlamaya bağlı olarak değişik etkiler gösterir.

Örneğin bronşiyal astımda kortikosteroid uygulanması saat 15.00'da optimal etki gösterirken saat 08.00 ve 20.00'da çok az etki gösterir¹⁶.

II.B.2. KRONONOSİSEPSİYON

Krononosisepsiyon zamana bağlı olarak ağrı semptomlarında ortaya çıkan değişiklikler anlamına gelir.

Ağrılı uyaranlara karşı ortaya çıkan yanıtlardaki temporal değişikliklerle ilgili çalışmalar XX. yüzyılın ilk yıllarında başlamıştır. Grabfield ve Martin 1912'de ve Martin ve Grabfield 1914'te sağlıklı deneklerde elektriksel uyarana karşı ortaya çıkan ağrının en çok saat 10.30'da, en az ise 23.30-01.00 ve 04.00-05.00 arasında olduğunu göstermişlerdir^{17,18}. Procacci ve arkadaşları 1973 ve 1974 yıllarında, yaşları 25-36 arasında değişen 34 sağlıklı gönüllüde, radyan ısı ile indüklenen ağrının saat 06.30'da maksimum ve bundan 12 saat sonra minimum olduğunu göstermişlerdir. Ağrının bu sirkadiyan ritmi kadınlarda gözlenmemiştir; fakat 25 günlük bir ritim hem kadınlarda hem de erkeklerde ortaya çıkmıştır ve çalışmanın 8. gününde ağrı pik yapmıştır. Bu infradiyan ritim menopozdaki kadınlarda gözlenmişken oral kontraseptif kullanan kadınlarda gözlenmemiştir^{19,20}.

Hummel ve arkadaşları 1992 yılında 18 sağlıklı gönüllüde karbondioksit ile ağrı oluşturarak ağrının kronobiyolojisini çalışmışlar ve gece saat 02.00'da ağrının maksimum olduğunu göstermişlerdir²¹. Perikraniyal kas sisteminin ağrı duyumunun sirkadiyan değişiklikleri 1990 yılında Göbel ve Cordes tarafından çalışılmıştır. Çalışmada 24 saatlik bir periyotta 6 kez perikraniyal damarlar üzerine 20 saniye basınç uygulanarak kan akımı kesilmiş ve böylece ağrı oluşturulmuştur. Ağrı, en düşük saat 14.00'da en yüksek ise gece saat 02.00'da gözlenmiştir. Ayrıca kadınların erkeklere göre 2 kat daha hassas olduğu not edilmiştir²².

Deneysel ağrıda klinik yönden her zaman anlamlı sirkadiyan değişiklikler görmek mümkün olmamaktadır²³. Bu çalışmalarda ortaya çıkan çelişkileri açıklamak oldukça güç bir olaydır. Bunun nedenlerinden biri kullanılan metotların farklılığıdır. Ayrıca nosiseptif uyaran 2 çeşit fiberle yayılabilir (A δ ve C fiberleri). Ağrı, vücudun farklı yerlerinden ölçülmüş olabilir. Bu çalışmalarda ağrı oluşturma yöntemi, ağrının tipi, gönüllülerin uyku-aktivite modelinin senkronizasyonları ve ağrılı uyaranın şiddetinin standardizasyonu çok önemlidir ve bunlar detaylı bir şekilde anlatılmalıdır. Deneysel ağrıda sirkadiyan değişiklikler fizyolojik faktörlerden etkilenir. Bu yüzden ağrının kronobiyolojisi hayvanlarda da çalışılmıştır²⁴.

Frederickson ve arkadaşları 1977 yılında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta kalan farelere hot plate testini uygulamışlar ve ağrılı uyaranı tolere edebilme yeteneklerinin zaman bağımlı değişimini incelemişlerdir. En az ağrı dinlenme periyodunun sonunda, aktivite periyodunun ilk 8 saatinde ortaya çıkmışken en çok ağrı aktivite periyodunun sonunda, dinlenme periyodunun ilk 8 saatinde ortaya çıkmıştır²⁵.

Martínez-Gómez ve arkadaşları 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta kalan dişi Wistar sıçanlarına tail-flick metodunu uygulayarak ağrı eşiğinin karanlık-aydınlık ve östrus dönemindeki değişimini incelemişlerdir. Maksimum ağrı eşiği aktivite periyodunun erken döneminde bulunmuşken östrus döneminde ağrı eşiği en düşük bulunmuştur. Daha sonra hayvanlara overektomi yapılmış ve 24 saatlik ritim tekrar incelendiğinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu da, ağrı eşiğinin 24 saatlik değişiminin, plazma seviyeleri gün içinde değişiklik gösteren seksüel hormonlarla ilişkisi olmadığını gösterir²⁶.

1998 yılında Konecka ve arkadaşları erkek farelerde ağrının sirkadiyan ritmini araştırmıştır. 12 saat aydınlık 12 saat karanlıkta kalan

farelere hot plate testi uygulanarak ağrı yanıtları ikişer saat ara ile ölçülmüştür. Sonuçta ağrı yanıtlarının sinosoidal bir ritim gösterdiği ifade edilmiştir. En düşük latens saat 10 ve 20 'de en yüksekleri ise saat 12 ve 4'te gözlenmiştir²⁷.

Perissin ve arkadaşları 2000 yılında dişi farelerdeki tonik ağrı reaksiyonlarının diurnal değişikliklerini araştırmışlardır. 12 saat aydınlık 12 saat karanlıkta kalan farelere hot plate ve formalin testi uygulanmıştır. Sonuçta kısa ya da uzun süreli noksiyus stimülasyona karşı, tonik ağrıya daha büyük yanıtlarla, farklı diurnal değişim reaksiyonları gözlenmiştir²⁸. Aynı çalışma grubu 2002 yılında cinsiyet, mevsim ve gece-gündüz periyodunun tonik ağrı yanıtlarına etkisini araştırmıştır. Formalin testi ile yapılan çalışma hem baharda hem de kışın gece-gündüz yapılmıştır. Tüm veriler göz önüne alındığında, uzun süreli ağırlı uyarana karşı spinal ve supraspinal bölümlerle ilgili davranışsal değişikliklerin her iki cinsten de benzer mevsimsel ve diurnal değişim gösterdiği ifade edilmiştir²⁹.

Rosenfeld ve Rice 1979 yılında sıçanlarda ağrı eşiğinin diurnal ritimlerini araştırmışlardır. Bu çalışmada sıçanların pençe yalama, tail flick ve sıçrama reaksiyon latensini ölçmüşlerdir. Latenslerin akşam (07-11pm) gündüze göre (11-04pm) daha uzun olduğu gözlenmiştir. Bu veriler gündüze göre, gece ağrı duyumundaki azalmanın endojen bir opiat aracılığıyla olduğunu önermektedir³⁰. Rosenfeld ve Rice'in bu bulguları beyin opiatörjik peptit konsantrasyonlarının değişimini gösteren çalışmalarla desteklenmiştir. Beyindeki endojen opiat peptitler (endorfinler ve enkefalinler) 24 saatlik bir periyot gösterirler. Beta endorfin konsantrasyonunun zaman bağımlı değişimi araştırılmış ve beta endorfin seviyelerinin sıçan beyninin pitüer bez, pons, medulla ve serebellumunda³¹ ve at plazmasında³² aktivite periyodunda pik yaptığı bulunmuştur.

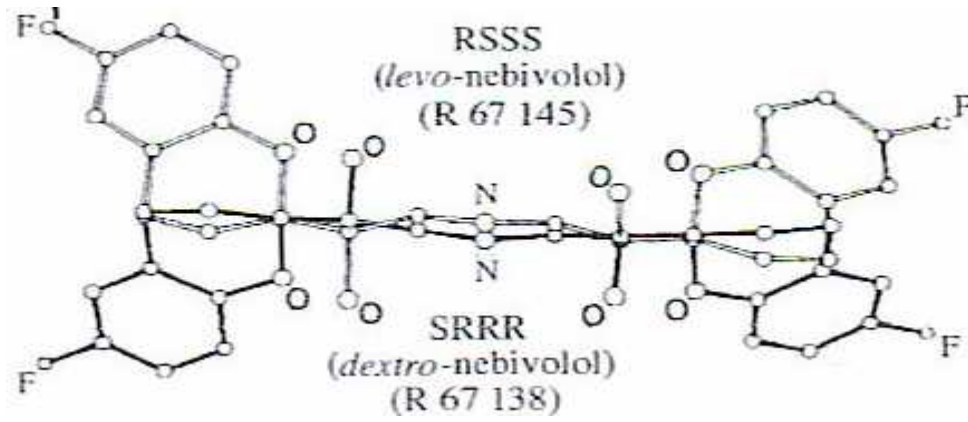
II.C. NEBİVOLOL VE KRONONOSİSEPSİYONDA NİTRİK OKSİT

II.C.1. NEBİVOLOL

II.C.1.1. Nebivololün Yapısı, Etkileri ve Mekanizması

Nebivolol, kimyasal yapısı ve hemodinamik profili bakımından diğer β_1 blokörlerden farklı olan, sıradışı farmakolojik özelliklere sahip^{33,34}, yüksek oranda kardiyoselektif^{35,36}, intrinsik sempatomimetik aktivitesi olmayan³⁷ ancak antioksidan özelliklere sahip selektif β_1 adreno reseptör antagonistidir^{36,38}.

Nebivolol, ()-R^{*}S^{*}S^{*}-(S^{*})- α,α' -(iminobismetilen)-bis-6-fluoro-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-2-metanol (**şekil 2**) 4 asimetric karbon atomu içerir. Varolan 10 stereoizomeri arasında²⁴, nebivolol, D-nebivolol (SR₃-nebivolol) ve L-nebivololün (RS₃-nebivolol) eşit miktarlarının rasemik karışımıdır^{39,34,40}.



Şekil 2. Nebivolol'ün kimyasal yapısı³⁴

D-izomeri β_1 -adrenoreseptör blokörüdür, L-izomeri ise vazodilatör özelliklerden sorumludur^{39,34,41,42}. D-izomeri güçlü ve uzun etkili bir β_1 adrenoreseptör blokörüdür ve hemodinamik profili bakımından atenolol ve diğer geleneksel β_1 blokörlere benzer (kardiyak debide azalma, sistemik vasküler dirençte artma). L-nebivolol ise DL-nebivololün hemodinamik etkilerinin tipik değişikliklerinden sorumludur^{39,34,41}. Nebivolol diğer geleneksel β -blokölerden farklı olarak periferik vasküler dirençte akut bir azalma ve kan basıncında hızlı bir düşüşe neden olur. Bu etki L-nebivolole atfedilir⁴³. L-nebivolol kan basıncını düşürmediği dozda, D-izomerinin antihipertansif özelliklerini artırır. L-nebivololün, D-nebivololün negatif inotropik kardiyak etkilerini hafiflettiği ya da tersine çevirdiği görülür^{39,34,41}. L-nebivolol endotelial β_2 adrenoreseptörlerine bağlanarak ve sonuçta endotelial NOS bağımlı NO üretiminde artışla vazodilatasyon oluşturur⁴⁴.

Nebivololün vazodilatör etkisi 1) adrenerjik vazodilatör reseptörlere bağlı değildir. Nebivolol intrinsik sempatomimetik aktiviteye sahip değildir^{45,37,39,34}. 2) β_3 -adrenoreseptörlerine bağlı değildir. Bu reseptörler üzerinde etkisi yoktur. 3) α_1 -blokajına bağlı değildir^{34,46}.

Nebivololün farmakolojik etkileri in-vitro olarak fare torasik aorta segmentlerinde^{47,48}, köpek koroner ve karotid arterlerinde⁴⁹, sıçan ve sığır aorta ve küçük mezenterik arterlerinde^{50,51,52}, insan aortik düz kas hücrelerinde⁵³, koroner endotelial ve düz kas hücreleri⁵⁴ kadar iyi çalışılmıştır.

Deneysel kanıtlar nebivololün NO aracılıklı endotel bağımlı mekanizmalarla vazodilatör etki oluşturduğunu gösterir. Bu etkisi köpek koroner arterinde ve sağlıklı gönüllülerdeki artmış önkol kan akışı ile gösterilmiştir^{55,56,45,34}.

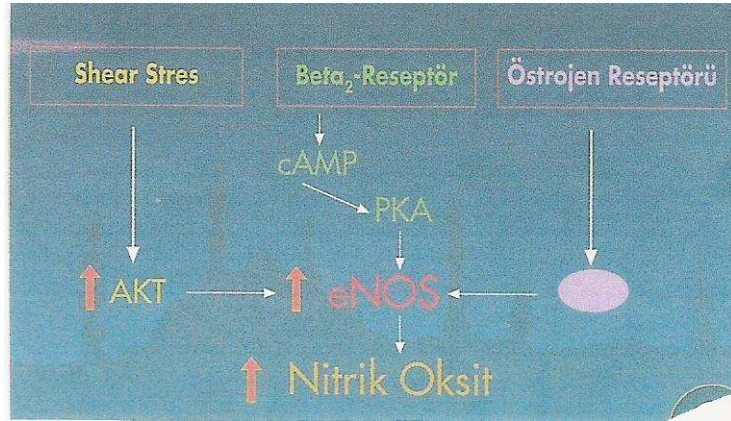
Parenti ve arkadaşları 1999 yılında sıçan mezenterik vasküler yatağında nebivololün damarlar üzerindeki gevşetici etkisini araştırmış ve nebivololün mikromolar konsantrasyonlarda endotelial hücrelerdeki cNOS aktivitesinin stimülasyonu ve inozitol fosfat metabolizmasının aktivasyonu ile vazodilatasyonu indüklediğini ispat etmiştir. Nebivololün vazodilatör özelliği fosfolipaz C aktivasyonuna ve inozitol fosfat metabolizmasının stimülasyonuna bağlıdır. Nebivololün fosfolipaz C'yi nasıl aktive ettiği net değildir. İnozikol fosfat metabolizmasının aktivasyonu hücreler serbest kalsiyum konsantrasyonunda bir artışa neden olur. Artmış kalsiyum konsantrasyonu endotel hücrede cNOS stimülasyonuna (cNOS endotel hücrede kalsiyum-kalmodulin bağımlı bir enzimdir) ve sonuçta vazodilatasyona neden olur⁵².

2002 yılında Ignarro ve arkadaşları nebivololün vasküler düz kas hücrelerini hangi mekanizmalarla gevşettiğini araştırmış ve NO ve sGMP'nin vasküler endotelial ve düz kas hücrelerinin gevşemesinde gerekli olduğunu göstermiştir³⁵.

Nebivolol, damar düz kaslarını hem endotele bağımlı (eNOS aktivasyonu aracılığıyla) hem de endotelden bağımsız (damar düz kasları

üzerindeki doğrudan etkileri ile) NO salınımı aracılığıyla gevşetmektedir. Nebivolol, NO yapımını uyarıcı β_2 reseptörleri ve östrojen reseptörlerinin aktivasyonu gibi çeşitli uyarıcı mekanizmalara sahiptir. Gerçekten nebivolol ile 17 β -östradiol arasında yakın yapısal ve fonksiyonel benzerlikler saptanmıştır. Dahası deneysel çalışmalar selektif bir östrojen reseptör antagonistinin hem östradiol hem de nebivolole bağlı vazodilatör yanıtlarını bloke ettiğini ortaya koymak sureti ile nebivololün damar gevşetici etkisine östrojen reseptörünün aracılık edebileceğini göstermiştir (Şekil 3)⁵⁷.

2005 yılında Georgescu ve arkadaşları fare renal arterinde nebivololün oluşturduğu vazodilatasyonun hücresel mekanizmalarının 1) endotelial β_2 -adrenoreseptörlerinin aktivasyonu 2) $[Ca^{+2}]_i$ 'nin katılımı 3) NO ve eNOS'da artma ve 4) Ca^{+2} ile aktive olan K^+ kanallarını gerektirdiğini göstermişlerdir⁵⁸.



Şekil 3. Nebivolol NO yapımını uyarır⁵⁷.

Yapılan çalışmalar günde 5 mg nebivolol (p.o) alınmasının sağlıklı gönüllülerde sistemik oksidatif stresi azalttığını göstermiştir³⁶.

Cominacini ve arkadaşları nebivolol ve 4-keto türevlerinin endotel hücrelerde reaktif oksijen türlerinin ve süperoksitin konsantrasyonlarını azalttığını ve NO'yu arttırdığını ispatlamıştır. ROS ve süperoksitin salınımının artması NO'yu inaktive eder ve peroksinitrit oluşur. Nebivolol ve 4-keto türevleri ise NO'nun oksidatif inaktivasyonunu azaltarak NO seviyelerini artırır³⁸.

Nebivolol lipofilik bir β_1 blokördür³⁹. Nebivololün β_1/β_2 reseptörlerine afinitesi oranı 55'tir^{39,34,40,43}. Nebivololün serotonin 5-HT₂, dopamin, α_1 ya da α_2 reseptörlerine afinitesi yoktur ya da önemsizdir^{39,34}. Nebivolol 5-hidroksi-triptamin_{1A} reseptörlerini (5-HT_{1A} reseptörleri) inhibitör bir yolla etkileyebilir. Nebivololün Ca⁺² ile ya da prostaglandin F_{2a} ile indüklenen vazokonstriksiyona etkisi yoktur ya da sadece mikromolar konsantrasyonlarda etkilidir^{34,43}.

Nebivolol hücre proliferasyonunu azaltır^{53,54}, glikoz ya da lipid metabolizması üzerine anlamlı bir etkisi yoktur^{58,44}. Glomerüler filtrasyon hızı, renal plazma akışı^{59,34,42}, renal vasküler direnç ve filtrasyon fraksiyonu üzerinde anlamlı bir etkisi yoktur^{59,34}. Renin ve aldosteron plazma seviyelerini azaltır, atriyal natriüretik faktör seviyesini artırır^{59,60,61}.

II.C.1.2. Nebivololün Eliminasyonu ve Biyotransformasyonu

Nebivolol karaciğerde sitokrom p450'nin izoformu olan CYP2D6 ile metabolize olur ve aktif metabolitlerine dönüşür³⁴. Nebivolol oral alındıktan sonra ilk geçiş etkisine uğrar ve aktif β blokör hidroksi-metabolitlerine dönüşür⁶².

Nebivolol'ün metabolizasyonu genetik polimorfizmin bir konusudur. Nebivolol debrizokin tipi polimorfizm gösterir⁶³. Bireyler fenotip açısından hızlı ve yavaş metabolize ediciler olarak karakterize edilirler. DL-, D- ve L-nebivololün eliminasyon yarı ömürleri ortalama yaklaşık on saattir, zayıf metabolize edicilerde ise bu 5 kat daha fazladır. Hidroksi-metabolitlerinin eliminasyon yarı ömürleri ise her enantiomeri için ortalama yaklaşık 24 saattir, zayıf metabolize edicilerde ise 2 katıdır^{62,63}.

II.C.1.3. Nebivolol ve Nosiseptif Prosesler

Nebivolol'ün nosiseptif proseslerdeki etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışma mevcut değildir; fakat bazı β -blokörlerin ve β reseptörlerinin nosiseptif etkileri araştırılmıştır.

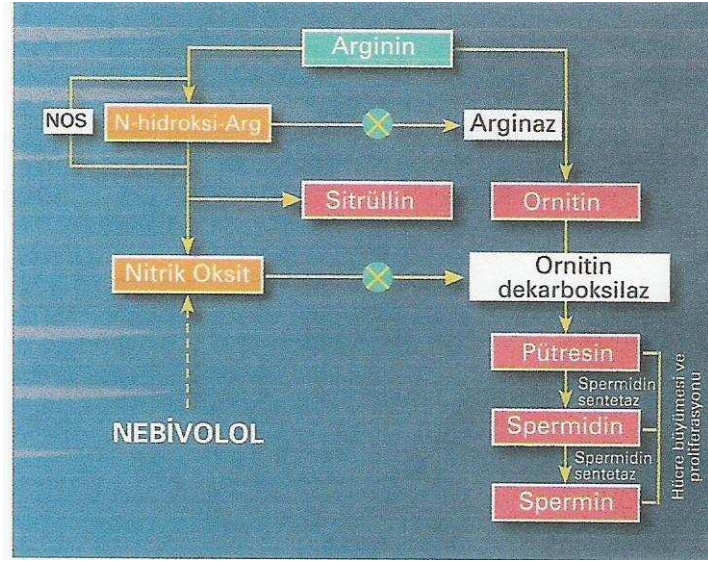
Beta-adrenoreseptör blokörü ve 5-hidroksitriptamin_{1A\1B} antagonisti olan pindololün tramadol antinosisepsiyonuna etkisi araştırılmış ve pindololün 5-HT_{1A} reseptör antagonisti özelliğine bağlı olarak tramadol antiosisepsiyonunu arttırdığı gözlenmiştir⁶⁴. Micó ve arkadaşları β_1 ve β_2 adrenerjik reseptörlerin trisiklik antidepresanların antinosiseptif etkilerine katkısını araştırmıştır. Ağrılı uyaran fiziksel ise hem β_1 hem de β_2 reseptörlerinin, kimyasal ise sadece β_1 reseptörlerinin TSA'ların antinosiseptif etkilerine aracılık ettiğini ileri sürmüşlerdir⁶⁵.

II.C.2. L-ARJİNİN-NO'sGMP YOLAĞI VE KRONONOSİ- SEPSİYON

II.C.2.1. Nitrik Oksit Biyosentezi:

1970'lerde Murad NO'nun guanilat siklaz adı verilen bir enzimi aktive ederek sGMP oluşturduğunu göstermiştir. Yine bu yıllarda Murad nitroprusid (SNP) ve nitrogliserinin NO serbestlediğini ve sitozolik guanilat siklaz aktivasyonu ile GTP'den sGMP yapımını uyardığını göstermiştir. Ignarro ve Murad 1979 yılında NO'nun damar gevşetici etkisi olduğunu ileri sürmüşlerdir. 1980 yılında Furchgott ilk kez EDRF'yi (endotel kaynaklı gevşetici faktör) tanımlamış ve bunun endotel hücrede vazodilatasyona yol açtığını göstermiştir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar EDRF ve NO'nun kimyasal yapı ve etki mekanizması bakımından benzer olduğunu ortaya koymuştur. EDRF'nin NO olarak tanımlandığı çalışmalar ise ilk kez 1987 yılında Ignarro ve arkadaşları tarafından yapılmıştır⁵⁷.

Poliaminler karbon zincirinde en az iki amin grubuna sahip bir bileşik sınıfıdır. Bunlar hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan ve hücre siklusunun ileri evrelere geçebilmesi için gerekli olan bileşiklerdir. Poliaminler nitrik oksit sentazın da prekürsörü olan L-arjinin'den sentezlenir⁶⁶. NO, endotelial NOsentaz enzimi aracılığıyla elde edilir. eNOS, Ca⁺²'ye bağımlı konstitütif bir enzimdir. eNOS, L-arjinin'in guanidnonitrojenini oksitleyerek NO sentezini başlatır⁶⁷. Diğer taraftan arjinin, arjinaz enzimi ile üre ve ornitine hidroliz olur. Ornitin ise ornitin dekarboksilaz ile pütresine, o da sırasıyla spermidine ve spermine dönüşür. Bu 3 bileşik hücre büyümesi ve proliferasyonunda önemli role sahiptir. NO ise ornitin dekarboksilazı inhibe ederek hücre proliferasyonunun blokajına yol açar⁶⁶.



Şekil 4. NO biyosentezi ve poliamin yolu⁶⁶.

NOS bir flavoproteindir. NADPH ve O₂'ye bağımlı oksijenasyonu katalizler. NADPH, FAD, FMN, tetrahidrobiopterin, hem ve kalmodulin ise enzimin kofaktörleridir.

NOS enziminin çeşitli izoformları vardır ve her biri ayrı genler tarafından eksprese edilir. eNOS endotel hücrelerde, nNOS ise beyinde bulunur. eNOS ve nNOS kalsiyum-kalmodulin bağımlıdır, bunlar konstitutif NOS (cNOS) olarak da adlandırılabilirler⁶⁷. cNOS aktivasyonu için gereken Ca⁺² ya voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının açılmasıyla ya da inositol trifosfat metabolizması sonucu depolardan salıverilmeyle karşılanır⁶⁸. iNOS ise makrofajlar ile diğer inflamasyon hücrelerinde oluşur, kalsiyum-kalmoduline bağımlı değildir. cNOS ile oluşturulan NO pikomol düzeyindedir ve çok çabuk salıverilir. iNOS ile oluşturulan NO ise daha yüksek miktardadır (nmol düzeyinde) ve yavaş salıverilir⁶⁷.

L-arjinin'den NO oluşumu, NO analoglarıyla inhibe edilir. Bunlar L^G-nitro-L-arjinin metil ester(L-NAME), N^G-monometil-L-arjinin (L-NMMA), N-iminoetil-L-ornitin (L-NİO) ve N^G,N^G-dimetil-L-arjinin (ADMA)'dır. Aminoguanidin ve bazı aminoalkilizotioüre türevleri iNOS için, L-NİO ve 7-nitroindazol ise nNOS için spesifik inhibitörlerdir⁶⁷.

II.C.2.2. NO'nun Etki Mekanizması ve Etki Yerleri

NO, lipofilik özellikte basit yapılı bir gazdır. Biyolojik zarlardan kolaylıkla geçerek hedef moleküllere kovalan bağlarla bağlanır. NO depolanmaz, sentez edildikçe salınır. NO, guanilil siklazın hem grubuna bağlanarak GTP'den sGMP oluşumuna neden olur. sGMP ise miyozin hafif zincir kinazın defosforilasyonuna neden olarak düz kas gevşemesi yapar. NO'nun bazı etkileri K⁺ kanallarının açılması ile oluşan hiperpolarizasyon ile oluşur.

NO, kan damarlarında endotel hücrelerden sentezlenir ve damar tonüsünün ayarlanmasında önemli rolü vardır. Ayrıca trombosit agregasyonu ve adezyonunu güçlü bir şekilde inhibe eder. Endotel kaynaklı NO, lökositlerin endotel hücrelere adeze olmasını ve serbest radikal oluşumunu önler. NO'nun aynı zamanda nonadrenerjik nonkolinerjik (NANK) nöronların nörotransmitteri olduğu düşünülmektedir. Bu etkisinden dolayı periferik sinir sisteminde de önemli düzenleyici bir role sahiptir. NO, vasküler ve vasküler olmayan düz kaslarda doğrudan gevşeme oluşturur. Gastrointestinal kanal ve genitoüriner sistemde de benzer şekilde gevşeme oluşturur. NO'nun memeli sistemlerinde hücre proliferasyonunun inhibisyonu, antimikrobik etkiler ve konak savunma fenomenleri gibi birçok etkileri vardır. Ayrıca öğrenme ve belleği de modüle eder⁶⁸.

II.C.2.3. L-arjinin-NO'sGMP Yolağı İle İlgili Ritimler ve NO'nun Nosiseptif Proseslerdeki Rolü

NO Ritmi: Memelilerde ana sirkadiyan pacemakerın SKN (suprakıyazmatik nukleus) olduğundan daha önce bahsetmiştik. SKN, anterior hipotalamusta^{9,13}, optik kıyazmın hemen arkasında lokalizedir⁹.

Işık SKN'ye retinohipotalamik traktus aracılığıyla ulaşır. Retinohipotalamik traktus, vazoaktif intestinal polipeptid (VIP), gastrin-releasing peptid ve hamsterda calbindin (CalB)-expressing nöronlarını innerve eder⁶⁹. Eksitator amino asit glutamat retino hipotalamik traktusta ışığın sirkadiyan etkilerinden sorumlu primer nörotransmitterdir⁷⁰. Eksitator amino asit antagonistleri SKN'deki fotik yanıtları bloke eder, optik kıyazmın stimölasyonu ise eksitator amino asit konsantrasyonunda bir artmayla sonuçlanır⁷¹. Glutamat SKN'deki NMDA ve non-NMDA reseptörleri ile etkileşir ve olaylar kaskadı saat kontrollü ritimde kronik faz kayması ile sonuçlanır⁷². NMDA ve non-NMDA reseptör antagonistleri ışığın faz kayması etkisini bloke eder; her iki çeşit glutamat reseptörü de bu yanıtta gereklidir^{72,73,74,75}. Glutamat SKN'de intraselüler Ca^{+2} seviyelerinde bir artışa neden olur^{76,77} ve SKN nöronlarında NMDA-evoked Ca^{+2} akımı gece pik yapan bir sirkadiyan ritim gösterir⁷⁶. SKN'de artmış Ca^{+2} seviyeleri Ca^{+2} -kalmomodulin bağımlı protein kinaz tip II (CaMKII) ve nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) gibi enzimleri aktive eder^{78,79,80}. SKN'de fotik transdüksiyondan sorumlu olan diğer enzimler sAMP bağımlı PKA ve sGMP bağımlı PKG'dir. PKA daha çok non-fotik uyarılara olan yanıtlara aracılık eder^{81,82}. İn-vivo SKN'de PKA'nın inhibisyonu ışıkla indüklenen faz kaymasına etkisizdir. Spesifik PKG inhibitörleri in vivo'da ışıkla indüklenen faz ilerlemesini tamamen bloke eder⁸³. NO'ya duyarlı guanilil siklaz blokajının da ışıkla indüklenen faz kaymasını bloke ettiğini biliyoruz⁸⁴. NOS inhibitörü L-NAME'in lokal uygulanması lokomotor aktivite ritimlerinde ışıkla indüklenen

faz kaymasını bloke ederken^{85,86}, NO donörlerinin ışığa olan sirkadiyan yanıtı arttırdığı gözlenmiştir⁸⁵.

Ding ve arkadaşları 1994 ve 1997 yıllarında yapmış oldukları çalışmada NOS'un SKN'deki spesifik aktivitesini ölçmüşler ve NOS aktivitesinin aydınlık-karanlık periyodunda anlamlı bir fark gösterdiğini, sabit karanlıkta ise anlamlı bir fark göstermediğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak NOS aktivitesinin direkt olarak sirkadiyan saatle kontrol edilmediğini ifade etmişlerdir^{87,88}.

Tunçtan ve arkadaşları 2002 yılında fare beyin, aorta, akciğer, testis ve böbreklerinde NOS aktivitesinin sirkadiyan değişikliklerini ölçmüşlerdir. Çalışma aydınlık-karanlık (14:10) ve aydınlık-aydınlık periyodunda yapılmıştır. Çalışma sonucunda fare böbreği aydınlık-karanlık periyodunda ritmisite gösterip aydınlık-aydınlık periyodunda ritmisite göstermemiştir. Beyin, testis, akciğer ve aorta ise aydınlık-aydınlık periyodunda 24 saatlik bir ritim göstermiştir. Sonuç olarak fare beyin, akciğer, aorta ve testisinde NOS aktivitesinin endojen bir saatle regüle olduğunu, böbreğin NOS aktivite ritminin ise ekzojen sinyallerle senkronize olduğunu söyleyebiliriz⁸⁹.

1996'da Ayers ve arkadaşları sıçan serebellum, beyin kökü, hipotalamus, hipokampus ve geri kalan beyin bölgelerinde nitrik oksit sentaz aktivitesinin ve sitozolik protein içeriğinin sirkadiyan değişikliklerini çalışmışlardır. Hem NOS aktivitesinin hem de sitozolik protein konsantrasyonlarının karanlık periyodunda yüksek, aydınlık periyodunda ise düşük olduğunu ölçmüşlerdir. NOS aktivitesi gün ortasından gece yarısına kadar olan dönemde %120 oranında zaman bağımlı bir artış göstermiştir⁹⁰.

NOS'un sirkadiyan sistemdeki rolünü şöyle özetleyebiliriz: SSS'de NOS glutamat ile aktive olduğunda solubl guanilil siklazı aktive eder ve sGMP seviyelerinde bir artışa neden olur. sGMP de sGMP bağımlı protein kinazı (PKG) aktive eder⁹¹ ve kalsiyum-kalmodulin bağımlı kinaz inhibisyonu NMDA ile indüklenen NO sentezini bloke eder⁹².

NO ve Nosiseptif Prosesler: NO ağrının modülasyonunda ve ağrı hipersensitivitesinin gelişiminde kritik bir role sahiptir. Yapılan çalışmalar bize NO'nun hem nosiseptif hem de antinosiseptif etkileri olduğunu göstermektedir. L-arjinin-NO-sGMP yolağının nosisepsiyondaki rolü farklı tipteki nosiseptif uyaranlara ve yine farklı tipteki primer duyuşal nöronların katılımına bağılıdır. Örneğın insanlarda NO'nun paravasküler dokuya ya da izole kütanöz venlere uygulanması ağrı oluşturur⁹³ ve NO-sGMP kaskadı bradikinin ile indüklenen inflamator ağrıya aracılık eder⁹⁴. Bazı çalışmalarda ise NO-sGMP kaskadı antinosiseptif etkiler gösterir. NO-sGMP kaskadı morfin ve non-steroidal antiinflamatuvar ilaçların periferdeki analjezik etkilerine aracılık eder^{95,96}.

nNOS'un, spinal kordun arka kökünde ve arka kök gangliyada yoğun olarak bulunduğunu biliyoruz^{97,98}. NOS, primer aferent C liflerinin innerve ettiğı alanlarda lokalizedir⁹⁹ ve ağrı algısında önemli role sahiptir¹⁰⁰. NOS inhibitörlerinin farede kıvrınma (writhing) aljezi modelinde ya da formalin testinin ikinci fazında antinosiseptif etki gösterirken^{101,102} karagenen ve formalinle tonik nosiseptif yanıtlar oluşturduğunu söylemek mümkündür^{103,104}. Doursout ve arkadaşları 2003 yılında sıçanda formalin testiyle NOS inhibitörlerinin antinosiseptif etkisini araştırmıştır. Çalışmada iNOS inhibitörü aminoguanidin, nNOS inhibitörü 7-nitroindazol ve non-selektif NOS inhibitörü N-nitro-L-arjinin kullanılmıştır ve her 3 NOS inhibitörünün de faz II esnasındaki nosiseptif davranışları azalttığı görülmüştür¹⁰⁵. Sekuguchi ve arkadaşları güçlü bir iNOS inhibitörü olan ONO-

174'ün sıçanda karagenen ile indüklenen termal hiperaljeziyi diğer NOS inhibitörleri (L-NAME, 7-nitroindazol) gibi baskıladığını ve antinosisepsiyon oluşturduğunu göstermişlerdir¹⁰⁶. Abacıoğlu ve arkadaşları 2000 yılında farede p-BK ile indüklenen kıvrınma modelinde L-arjinin-nitrik oksit\NO yolağının rolünü araştırmışlardır. NO prekürsörü olan L-arjinin ve guanilil siklaz inhibitörü olan metilen mavisi, doz bağımlı olarak nosisepsiyon-antinosisepsiyon-nosisepsiyon şeklinde trifazik bir etki gösterirken, NOS inhibitörü L-NAME antinosiseptif aktivite göstermiştir¹⁰⁷. Nitrik oksit donörü SIN-I'in nosisepsiyondaki dual etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada SIN-I ve NOS inhibitörlerinin guanilil siklaz aktivasyonu gerektiren spinal mekanizmalarla ağrıyı azalttığı; fakat yine de SIN-I'in etkisinin doz bağımlı olduğu ve kullanılan ağrı modeline göre değiştiği ifade edilmiştir¹⁰⁸. Prostaglandin sentez inhibitörleri olan meloksikam ve indometazin periferel antinosiseptif etkilerinde prostaglandin sentez inhibisyonunun yanı sıra NO-sGMP yolağının aktivasyonunun da önemli role sahip olduğu bilinmektedir^{109,110}. Sıçan formalin testinde lokal morfin uygulanması sonucu oluşan antinosisepsiyon da L-arjinin-NO-sGMP yolağına bağılıdır¹¹¹. Bir κ -opioit agonist olan bremazokinin de sıçanda karagenen ile indüklenen nosisepsiyonda L-arjinin-NO-sGMP yolağına bağılı olarak antinosisepsiyon gösterir¹¹².

NO fizyolojik proseslerde kimyasal bir haberci olduğu gibi opioit tolerans gelişiminde anahtar bir modölatör olarak da tanımlanmaktadır^{113,114}. Supraspinal NO-sGMP sisteminin akut morfin antinosiseptif toleransına aracılık ettiğini ve NO üretiminin antinosiseptif toleransın şiddetini değiştirmedini biliyoruz¹¹⁵. Heinzen ve arkadaşları çalışmalarında morfin uygulanması sonucu nNOS üretiminde bir artış olduğunu, artmış NO'nun da opioide karşı tolerans geliştirdiğini göstermişlerdir¹¹⁴. Bhargava ve arkadaşları kronik L-arjinin (i.p) tedavisinin merkezi NOS aktivitesini arttırdığını ve morfin antinosisepsiyonunu azalttığını

göstermişlerdir. Artan NOS aktivitesinin NO oluşumunu arttırdığı, NO'nun ise aljezik etkileri olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Morfin antinosisepsiyonundaki azalmanın ise merkezi sinir sisteminin spinal ve supraspinal yapılarındaki morfin seviyelerinin azalmasına bağlı olduğu ileri sürülmüştür¹¹⁶. Başka bir çalışmada NOS inhibitörü L-NNA'nın (N^G-nitro-L-arjinin) morfin antinosisepsiyonunda L-arjinin ile indüklenen değişiklikleri (morfin antinosisepsiyonunda ve beynin belli bölgeleri ve spinal korddaki morfin seviyelerinde azalma) tersine çevirdiği; bu sonuçlardan yola çıkılarak da NO-NOS sisteminin kan-beyin bariyerinin morfine karşı düzenlenmesinde rolü olduğu ileri sürülmüştür¹¹⁷.

NO spinal NMDA reseptör aktivasyonu ile indüklenen hiperaljeziye aracılık eder. 2003 yılında Watanebe ve arkadaşları sıçan formalin testinde i.t. L-NAME'in morfin antinosisepsiyonuna etkisini araştırmıştır. L-NAME + morfin kombinasyonu morfin antinosisepsiyonunu arttırmış ve nitrit-nitrat ve glutamat salınımı da anlamlı bir şekilde azalmıştır. Kombinasyon grubunun bu etkisinin spinal korddaki NMDA-NO'ya bağlı olabileceği ileri sürülmüştür¹¹⁸.

III. MATERİYAL VE YÖNTEM

III.A.MATERİYAL

III.A.1. DENEY HAYVANLARI

Deneyde kullanılan hayvanlar Saki Yenilli Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden temin edilmiştir. Deneylerimizde 16-30 g ağırlığındaki albino dişi ve erkek fareler kullanılmıştır. Hayvanlar 12'şer saat aydınlık (07^{00} - 19^{00}) ve karanlık (19^{00} – 07^{00}) periyodunda tutularak senkronize edilmiştir.

III.A.2. KİMYASAL MADDELER VE HAZIRLANMASI

para-Benzokinon ile Oluşturulan Ağrı Modelinde Nosiseptif Aktivite Tayini

p-Benzokinon (p-BK) (Sigma, USA)

Serum fizyolojik (SF) (%0.9 NaCl) (Eczacıbaşı-Baxter, Türkiye)

L-arjinin (Sigma, USA)

Nebivolol

L-N^G-nitroarjinin metil ester (L-NAME) (Sigma, USA)

Morfin (Toprak Mahsulleri Ofisi, Türkiye)

p-BK, L-arjinin, nebivolol, L-NAME ve morfin günlük olarak hazırlanmıştır ve ışıktan korunarak +4 °C'de saklanmıştır. p-BK, L-arjinin, L-NAME ve morfin %0.9'luk SF'te, nebivolol ise distile suda çözülmüştür.

III.A.3. ARAÇ VE GEREÇLER

Hassas terazi

Tek uçlu ve depolu otomatik pipetler

Parafilm

Vorteks

p-BK ile Oluşturulan Ağrı Modelinde Nosiseptif Aktivite Tayini İçin Gerekenler:

Steril enjektör

Cam tüp (10 ml)

Alüminyum folyo

Kıvrınma sayma kafesi (10 bölmeli)

III.B. YÖNTEMLER

III.B.1. KIVRANMA ALJEZİ MODELİ

Okun ve arkadaşlarının 1963 yılında tanımladığı p-BK ile indüklenen abdominal konstriksiyon (kıvrınma, writhing) testi analjezik aktivite tayininde kullanılmıştır¹¹⁹. Farelere SF içerisinde 2.5 mg/kg p-BK i.p olarak uygulanmıştır. Kontrol grubuna p-BK'dan 15 dakika önce günün 2 değişik saatinde (09⁰⁰ ve 21⁰⁰) SF (0.1 ml/10g) subkutan (s.k) olarak uygulanmıştır.

Deney gruplarına aynı saatlerde nebivolol (0.5 mg/kg, s.k), L-arjinin (2mg/kg, s.k), L-NAME (75 mg/kg, s.k) ve morfin ($ED_{50}=0.13$ mg/kg, s.k)¹²⁰ uygulanmıştır.

Yine aynı saatlerde nebivolol (0.5 mg/kg, s.k.) + L-arjinin (2 mg/kg, s.k), nebivolol (0.5 mg/kg, s.k.) + L-NAME (75 mg/kg, s.k.), nebivolol (0.5 mg/kg, s.k.) + morfin ($ED_{50}=0.13$ mg/kg, s.k)¹²⁰, nebivolol (0.5 mg/kg, s.k) + morfin ($ED_{50}=0.13$ mg/kg)¹²⁰ + L-NAME (75mg/kg, s.k) ve nebivolol (0.5 mg/kg, s.k) + morfin ($ED_{50}=0.13$ mg/kg)¹²⁰ + L-arjinin (2 mg/kg, s.k) uygulanmıştır.

Laboratuvarımızda paralel yürüyen bir çalışmada aynı saatlerde dişi ve erkek farelere morfin ($ED_{50}=0.13$ mg/kg, s.k)¹²⁰ + L-NAME (75 mg/kg, s.k), morfin ($ED_{50}=0.13$ mg/kg, s.k)¹²⁰ + L-arjinin (2 mg/kg, s.k) uygulanmıştır¹²¹.

p-BK, kontrol ve deney gruplarına madde uygulanmasından 15 dakika sonra uygulanmıştır. p-BK uygulandıktan sonra 15 dakika süreyle kıvrama sayıları kaydedilmiştir. Kıvrınma sayıları için farelerde gözlenen başlıca davranışlar aşağıdakilerdir:

- 1) Hayvanın karnını konkavlaştırması,
- 2) Konkav karınla bir yöne bükülmesi,
- 3) Arka ayaklarında tek veya her iki taraflı tonik ve/veya klonik gerilme, sürüklenme ve toplanma

Bu davranışlardan tümünün veya herhangi birinin görülmesi skorlamada bir "+" değeridir.

Kıvrınma sayısı üzerinde test maddelerinin gösterdiği inhibitör etki, % antinosiseptif aktivitedir ve aşağıdaki formül ile hesaplanır:

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

D (Deney): Madde ve p-BK uygulanmasından sonra gözlenen ortalama kıvrınma sayısı

K (Kontrol): SF ve p-BK uygulanmasından sonra gözlenen ortalama kıvrınma sayısı

Açısal transformasyonun yerine getirilmesi için ise, her bir % antinosiseptif aktivite değerine " $X = \arcsin \sqrt{X}$ " formülü uygulanmıştır ($X = \% \text{ antinosiseptif aktivite} / 100$).

III.C. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizde parametrik ve non-parametrik ANOVA kullanılmıştır. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı farklı kabul edilmiştir.

IV. BULGULAR

IV.A. KULLANILAN MADDELERİN TEK BAŞLARINA OLUŞTURDUKLARI % ANTİNOSİSEPSİYON

IV.A.1. Kontrol Grubunda Oluşan Nosisepsiyon;

Laboratuvarımızda paralel yürüyen bir çalışmada kontrol grubunda oluşan nosisepsiyon **tablo 2**'de gösterilmiştir¹²¹. Tüm değerler birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 2. Kontrol grubunda oluşan nosisepsiyon¹²¹.

	09 ⁰⁰	21 ⁰⁰
<i>Dişi</i>	19.09±2.1 (n=21)	16.15±1.6 (n=20)
<i>Erkek</i>	18.22±1.4 (n=22)	14.39±1.9 (n=23)

IV.A.2. Morfin, L-NAME ve L-arjinin Gruplarında Oluşan % Antinosiseptif Aktivite

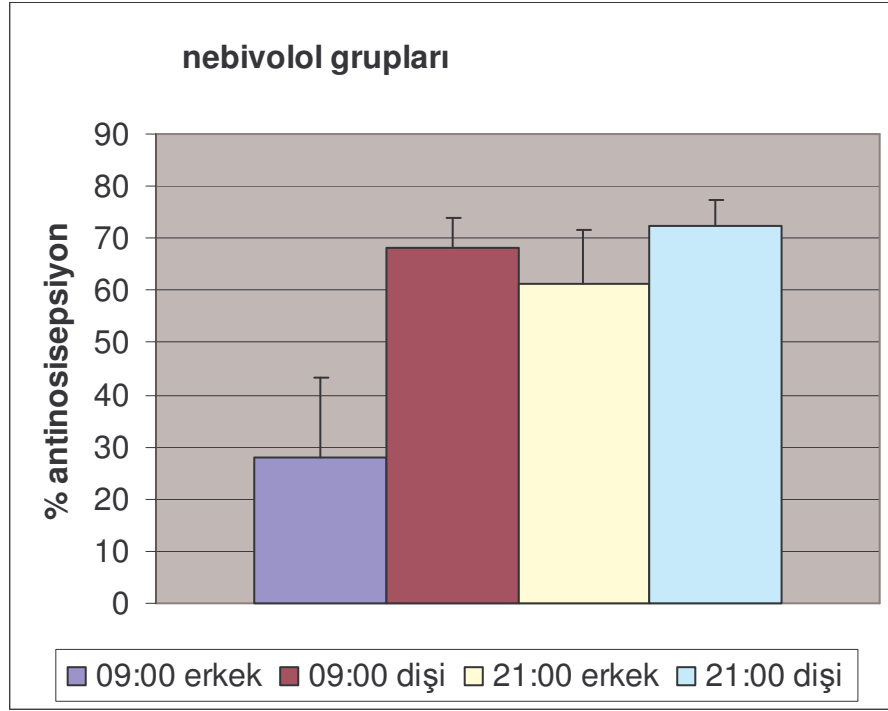
Laboratuvarımızda paralel yürüyen bir çalışmada bu gruplarda bulunan % antinosiseptif aktivite değerleri **tablo 3**'te gösterilmiştir¹²¹. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında yalnızca gece L-NAME grubunda dişi ve erkek fareler arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (P<0.05). Dişiler, erkeklere göre daha yüksek bir antinosiseptif aktivite göstermiştir.

Tablo 3. Morfin, L-NAME ve L-arjinin gruplarında oluşan % antinosiseptif aktivite¹²¹.

	<i>09⁰⁰ erkek</i>	<i>09⁰⁰ dişi</i>	<i>21⁰⁰ erkek</i>	<i>21⁰⁰ dişi</i>
<i>Morfin</i>	61.95±7.1 (n=12)	62.36±4.8 (n=15)	57.89±11.1 (n=9)	68.43±5.8 (n=9)
<i>L-NAME</i>	66.42±5.7 (n=11)	55.73±1.9 (n=9)	48.77±6.7 (n=9)	71.32±5 (n=26)
<i>L-arjinin</i>	68.86±3.4 (n=9)	69.36±4.5 (n=9)	58.21±11.1 (n=9)	73.75±4.2 (n=20)

IV.A.3. Nebivololün Oluşturduğu % Antinosiseptif Aktivite

Yaptığımız çalışmada dişi ve erkek farelere günün iki değişik saatinde (09⁰⁰ ve 21⁰⁰) 0.1, 0.5 ve 1mg/kg dozunda nebivolol uygulanmıştır. Yapılan doz-cevap çalışmasında antinosiseptif etkide doz bağımlı bir cevap göremediğimiz için 0.5 mg/kg nebivolol dozu kullanılmıştır. 0.5 mg/kg nebivololün nosisepsiyona etkisi ve bu etkisinin diurnal değişimi araştırılmıştır. Nebivololün oluşturduğu % antinosisepsiyon **şekil 5**'te gösterilmiştir. Oluşan % antinosisepsiyon değerleri şu şekildedir: saat 09⁰⁰'da erkek farelerde 28.01±15.4 (n=9), dişilerde 68.30±5.8 (n=11); saat 21⁰⁰'da erkeklerde 61.18±10.5 (n=10) ve dişilerde ise 72.38±4.9 (n=12) olarak bulunmuştur. Nebivololün oluşturduğu % antinosiseptif aktivitede gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (P > 0.05).



Şekil 5. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvrınma aljezi modelinde saat 09⁰⁰ ve 21⁰⁰,da dişi ve erkek farelere nebivolol (0.5 mg/kg) uygulanması ile oluşan % antinosiseptif aktivite.

IV.B. KOMBİNASYON GRUPLARINDA ORTAYA ÇIKAN % ANTİNOSİSEPSİYON

IV.B.1. Morfin+L-NAME ve Morfin+L-Arjinin Gruplarında Ortaya Çıkan % Antinosisepsiyon

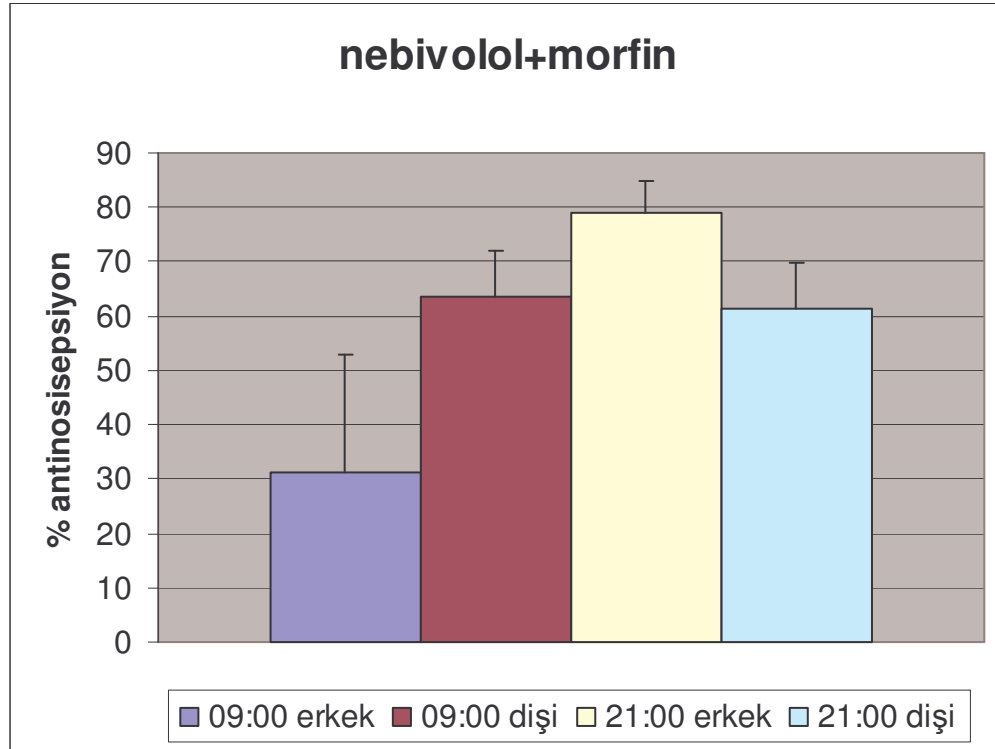
Laboratuvarımızda eş zamanlı yürütülen başka bir çalışmada bu gruplara ait % antinosiseptif aktivite değerleri **tablo 4**'teki gibi bulunmuştur¹²¹. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (P>0.05).

Tablo 4. Morfin+L-NAME ve morfin+L-arjinin gruplarında oluşan % antinosiseptif aktivite¹²¹.

	09 ⁰⁰ erkek	09 ⁰⁰ dişi	21 ⁰⁰ erkek	21 ⁰⁰ dişi
Morfin+ L-NAME	67.39±1.3 (n=13)	67.64±0.7 (n=15)	67.9±3.3 (n=9)	70.82±3.8 (n=9)
Morfin+ L-Arjinin	69.58±2.6 (n=9)	74.25±3.5 (n=9)	72.66±2.9 (n=8)	76.03±2.8 (n=9)

IV.B.2. Nebivolol+Morfin Kombinasyonunun Oluşturduğu % Antinosiseptif Aktivite

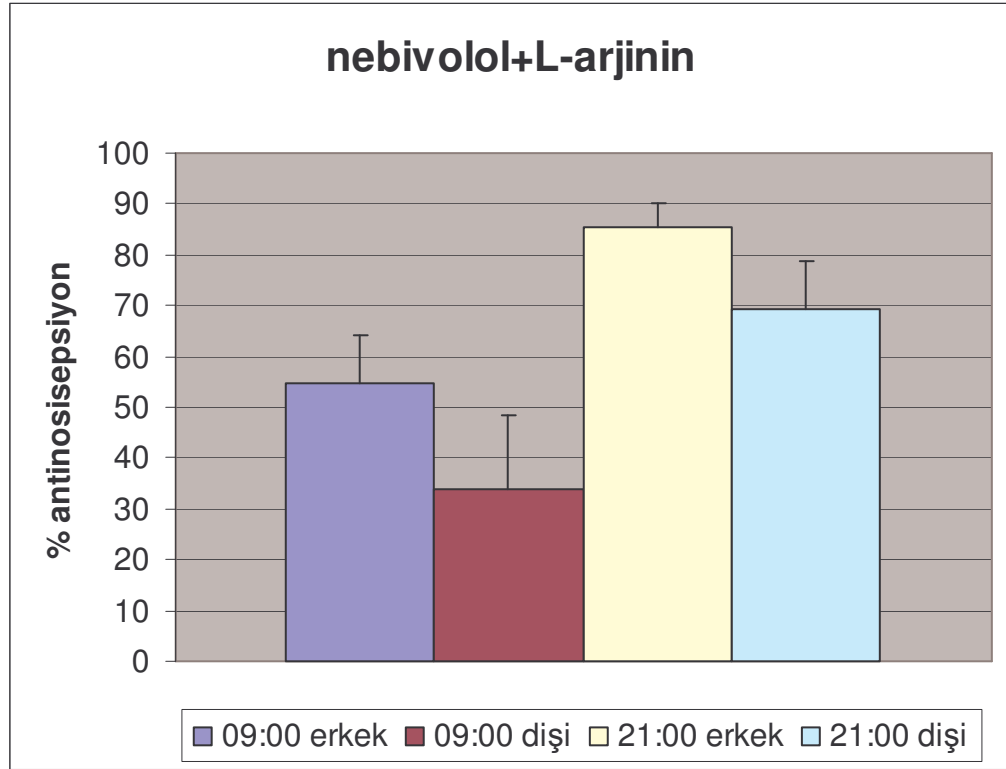
Fareye p-BK uygulanmasından 15 dakika önce nebivolol (0.5 mg/kg, s.k.)+morfin (0.13 mg/kg, s.k.)¹²⁰ kombinasyonu uygulanmıştır. Oluşan % antinosiseptif aktivite **şekil 6**'da gösterilmiştir. % antinosiseptif aktivite, saat 09⁰⁰,da erkeklerde 31.21±21.8 (n=10), dişilerde 63.43±8.6 (n=10); saat 21⁰⁰,da ise erkeklerde 78.97±5.9 (n=10) ve dişilerde 61.45±8.5 (n=5) olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (P>0.05)



Şekil 6. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvrınma aljezi modelinde saat 09⁰⁰ ve 21⁰⁰'da dişi ve erkek farelere nebivolol (0.5 mg/kg)+morfin (0.13 mg/kg)¹²⁰ uygulanması ile oluşan % antinosiseptif aktivite.

IV.B.3. Nebivolol+L-Arjinin Kombinasyonunun % Antinosiseptif Aktivitesi

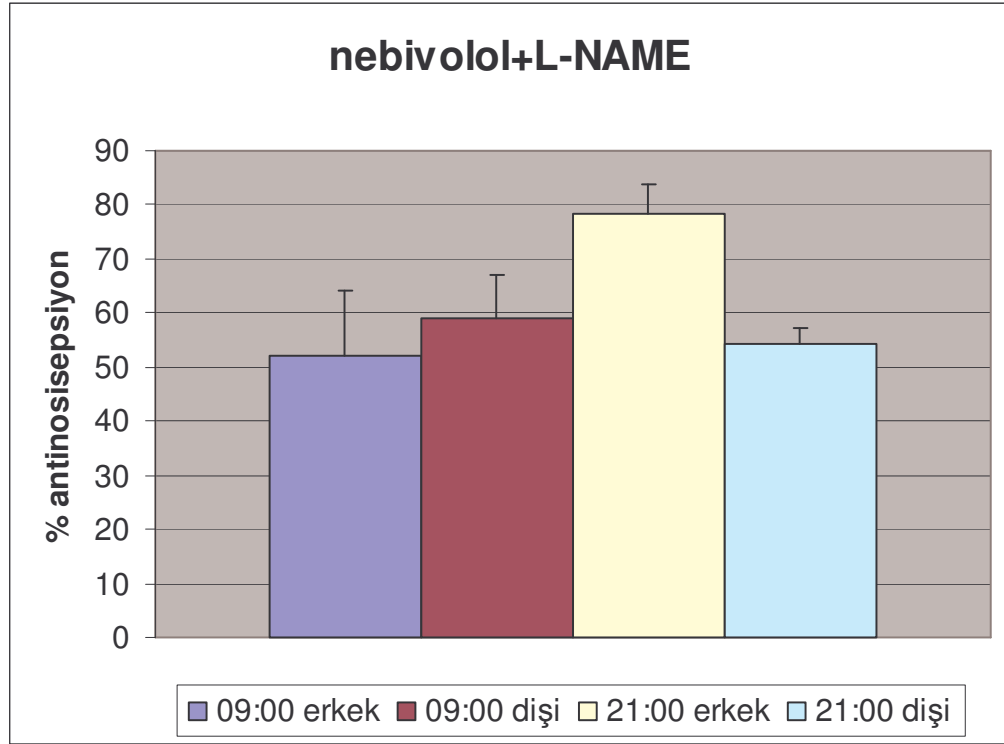
Fareye p-BK uygulanmasından 15 dakika önce nebivolol (0.5 mg/kg, s.k.)+L-arjinin (2.0 mg/kg, s.k.) kombinasyonu uygulandığında oluşan % antinosiseptif aktivite **şekil 7**'de gösterilmiştir. % antinosiseptif aktivite değerleri şu şekilde bulunmuştur: saat 09⁰⁰'da erkek farelerde 54.61±9.5 (n=5), dişilerde 34.05±14.2 (n=5); saat 21⁰⁰'da erkeklerde 85.62±4.4 (n=5), dişilerde ise 69.42±9.3 (n=5). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (P > 0.05).



Şekil 7. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvrınma aljezi modelinde saat 09⁰⁰ ve 21⁰⁰,da dişi ve erkek farelere nebivolol (0.5 mg/kg)+L-arjinin (2.0 mg/kg) uygulanması ile oluşan % antinospesitif aktivite.

IV.B.4. Nebivolol+L-NAME Kombinasyonunun Oluşturduğu % Antinospesitif Aktivite

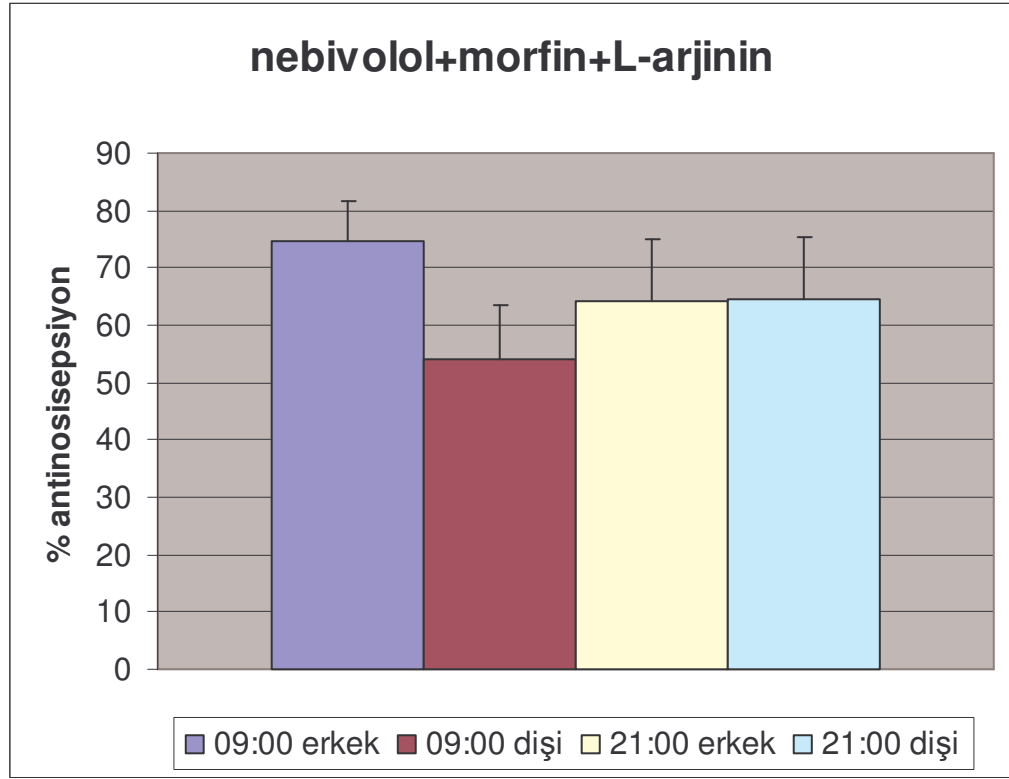
Nebivololün etki profiline L-NAME'in katkısı araştırılırken fareye p-BK'dan 15 dakika önce nebivolol (0.5 mg/kg, s.k.)+L-NAME (75mg/kg, s.k) kombinasyonu uygulanmıştır. Bulunan % antinospesitif aktivite **şekil 9**'da gösterilmiştir. % antinospesiyon değerleri saat 09⁰⁰,da erkek farelerde 51.97±12.1 (n=5), dişi farelerde 58.98±7.9 (n=5); saat 21⁰⁰,da erkeklerde 78.45±5.2 (n=5) ve dişilerde 54.16±3.1 (n=5)'dir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (P > 0.05).



Şekil 8. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvrınma aljezi modelinde saat 09⁰⁰ ve 21⁰⁰,da dişi ve erkek farelere nebivolol (0.5 mg/kg)+L-NAME (75 mg/kg) uygulanması ile oluşan % antinosiseptif aktivite.

IV.B.5. Nebivolol+Morfin+L-Arjinin Kombinasyonunun Oluşturduğu % Antinosiseptif Aktivite

Kombinasyon grubunun etkileri araştırılırken fareye p-BK'dan 15 dakika önce nebivolol (0.5 mg/kg, s.k.)+morfin (0.13 mg/kg, s.k.)¹²⁰+L-arjinin (2.0 mg/kg, s.k.) kombinasyonu uygulanmıştır. Oluşan % antinosiseptif aktivite **şekil 9'**daki gibidir. % antinosisepsiyon değerleri şöyledir: saat 09⁰⁰,da erkek farelerde 74.70±7.1 (n=5), dişilerde 54.11±9.4 (n=5); saat 21⁰⁰,da erkeklerde 64.29±10.7 (n=5) ve dişilerde de 64.39±10.9 (n=5)'dir. Tüm gruplar incelendiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (P > 0.05).

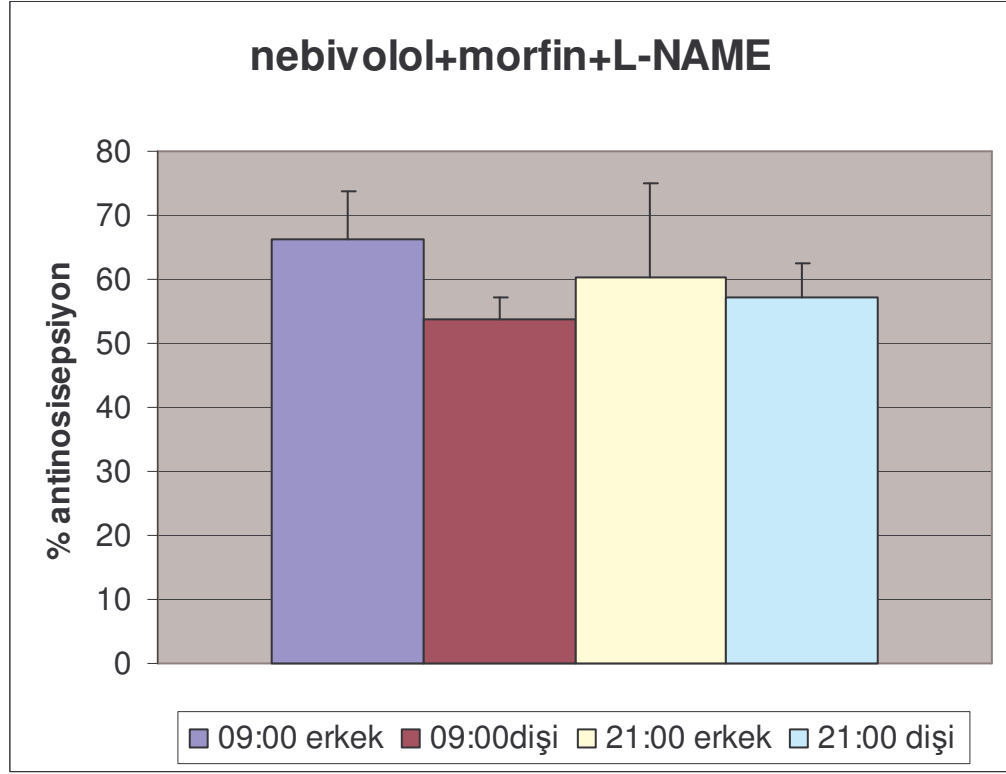


Şekil 9. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvrınma aljezi modelinde saat 09⁰⁰ ve 21⁰⁰,da dişi ve erkek farelere nebivolol (0.5 mg/kg)+morfin (0.13 mg/kg)¹²⁰+L-arjinin (2.0 mg/kg) uygulanması ile oluşan % antinosiseptif aktivite.

IV.B.6. Nebivolol+Morfin+L-NAME Kombinasyonunun Oluşturduğu % Antinosiseptif Aktivite

Kombinasyon grubunun etkileri araştırılırken fareye p-BK'dan 15 dakika önce nebivolol (0.5 mg/kg, s.k.)+morfin (0.13 mg/kg, s.k.)¹²⁰+L-NAME (75 mg/kg, s.k.) uygulanmıştır. Ortaya çıkan % antinosiseptif aktivite **şekil 10**'daki gibidir. % antinosisepsiyon değerleri saat 09⁰⁰,da erkek farelerde 66.19±7.7 (n=5), dişilerde 53.62±3.7 (n=5); saat 21⁰⁰,da 60.31±14.8 (n=5) ve

dişilerde 57.17 ± 5.4 (n=5) olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($P > 0.05$).



Şekil 10. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvrınma aljezi modelinde saat 09⁰⁰ ve 21⁰⁰,da dişi ve erkek farelere nebivolol (0.5 mg/kg)+morfin (0.13 mg/kg)¹²⁰+L-NAME (75 mg/kg) uygulanması ile oluşan % antinosiseptif aktivite.

IV.C. TÜM GRUPLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

IV.C.1. 09⁰⁰ Erkek Gruplarının Karşılaştırılması

Saat 09⁰⁰,da erkek gruplarında ortaya çıkan % antinosiseptif aktivite **şekil 11**'de gösterilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur ($P > 0.05$).

IV.C.2. 09⁰⁰ Dişi Gruplarının Karşılaştırılması

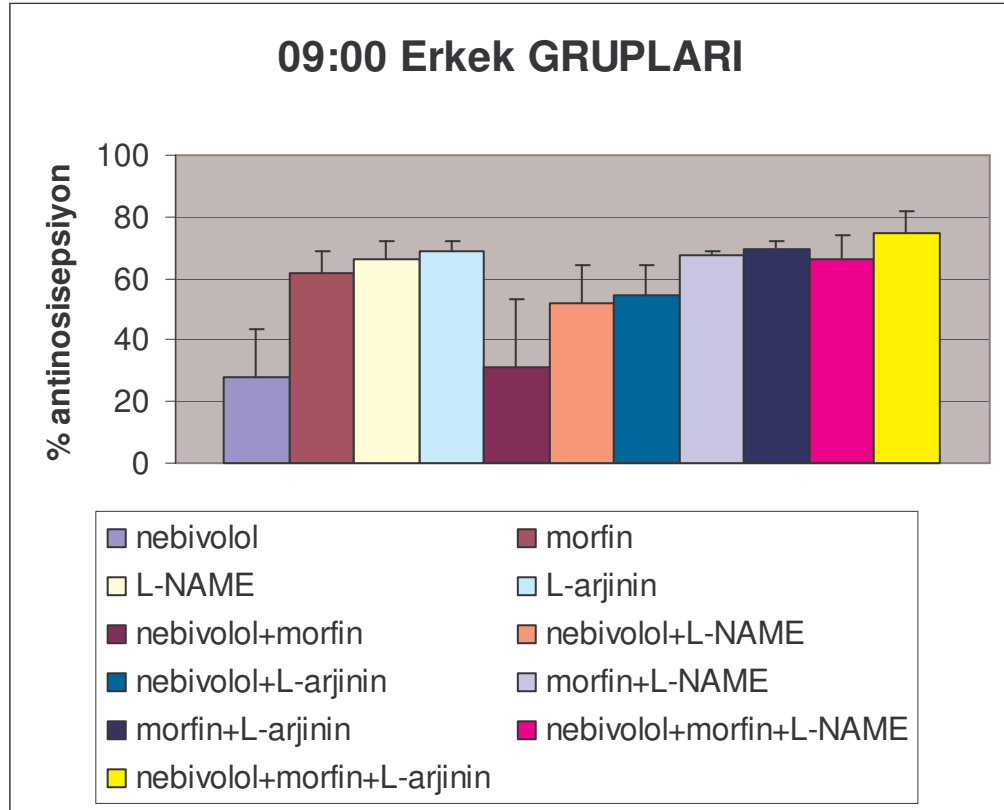
Saat 09⁰⁰,da dişi farelerde tüm gruplarda oluşan % antinosiseptif aktivite **şekil 12**'deki gibidir. Nebivolol ile nebivolol+L-arjinin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($P < 0.05$). Nebivololün oluşturduğu % antinosiseptif aktivite nebivolol+L-arjinin kombinasyonu ile azalmıştır.

IV.C.3. 21⁰⁰ Erkek Gruplarının Karşılaştırılması

Saat 21⁰⁰,da tüm erkek gruplarında ortaya çıkan % antinosiseptif aktivite **şekil 13**'te gösterilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($P > 0.05$).

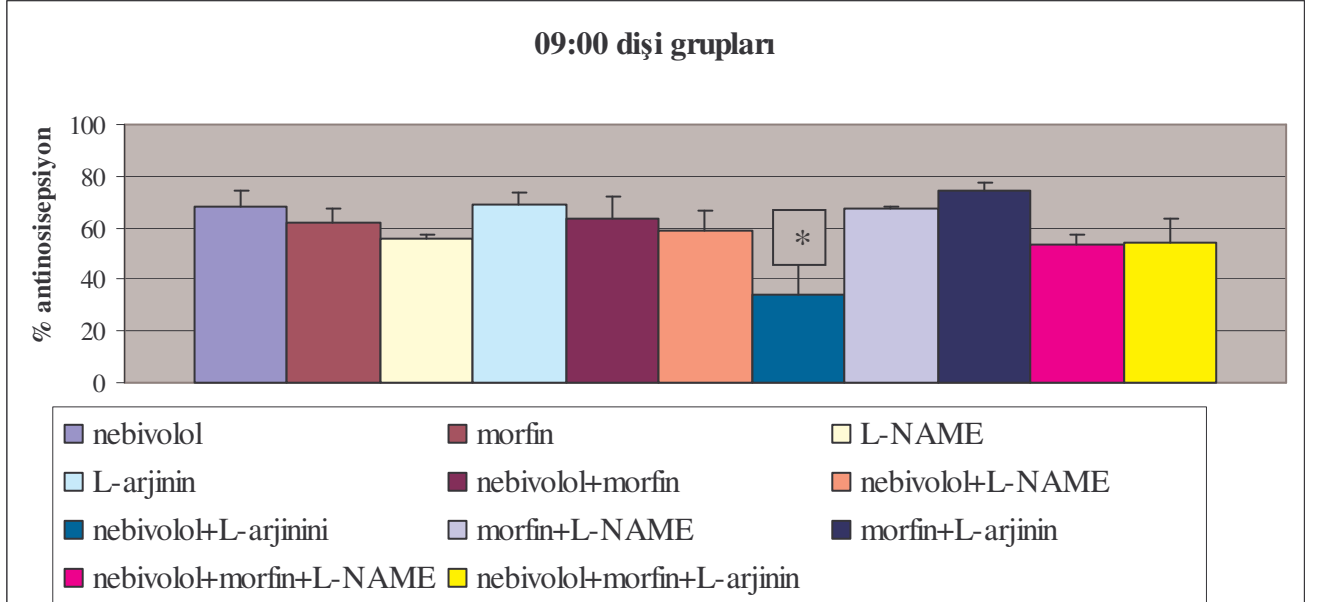
IV.C.4. 21⁰⁰ Dişi Gruplarının Karşılaştırılması

Saat 21⁰⁰,da tüm dişi gruplarında gözlenen % antinosiseptif aktivite **şekil 14**'te gösterilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur ($P > 0.05$).



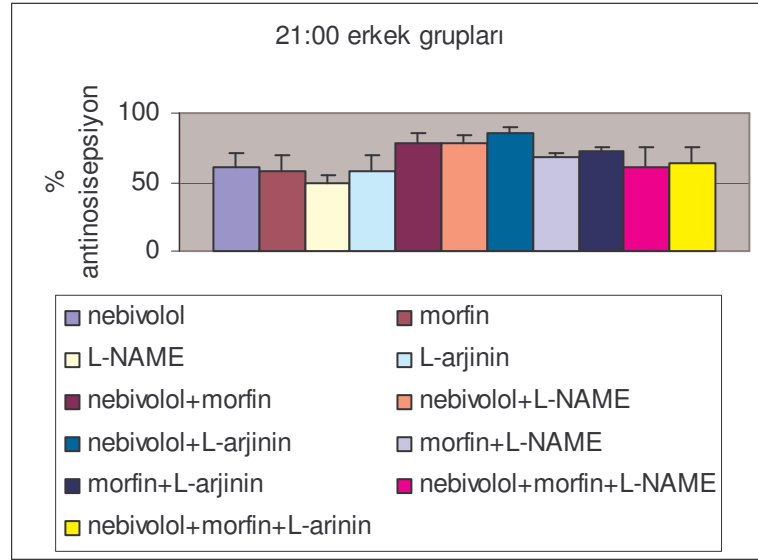
Şekil 11. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvrınma aljezi modelinde saat 09⁰⁰'da erkek farelerde oluşan % antinosisepatif aktivite.

(L-NAME, morfin, L-arjini, morfin+L-NAME ve morfin+L-arjini grupları¹²¹)



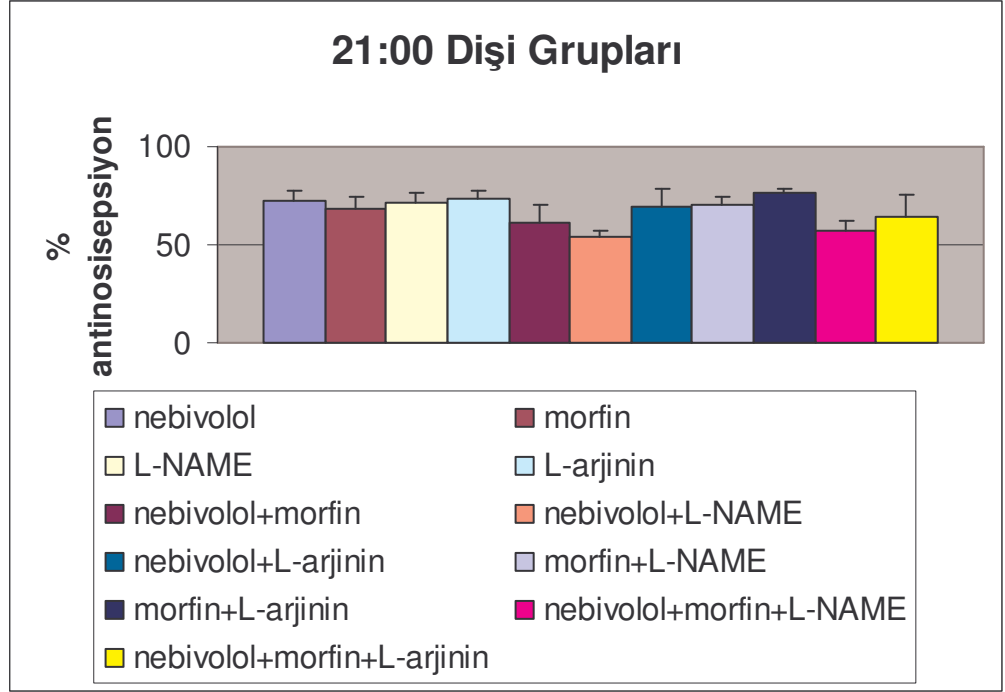
Şekil 12. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvrınma aljezi modelinde saat 09⁰⁰'da dişi farelerde oluşan % antinosiseptif aktivite. % antinosiseptif aktivite * nebivololden anlamlı farklı (P<0.05).

(L-NAME, morfin, L-arjini, morfin+L-NAME ve morfin+L-arjini grupları¹²¹)



Şekil 13. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvrınma aljezi modelinde saat 21⁰⁰'da erkek farelerde oluşan % antinosiseptif aktivite.

(L-NAME, morfin, L-arjinin, morfin+L-NAME ve morfin+L-arjinin grupları¹²¹)



Şekil 14. Farelerde p-BK ile oluşturulan kıvrınma aljezi modelinde saat 21⁰⁰'da dişi farelerde oluşan % antinociceptif aktivite

(L-NAME, морфин, L-аргинин, морфин+L-NAME ve морфин+L-аргинин grupları¹²¹)

V. TARTIŞMA

Bu çalışmada farede p-BK ile indüklenen nosisepsiyona nebivololün etkisi araştırılmış, oluşan etkinin zamana ve cinsiyete göre değişimi ve L-arjinin-NO\ sGMP yolağının bu etkiye katkısı incelenmiştir.

Yapılan çalışmalar bize ağrının, hastaların en çok şikayetçi olduğu rahatsızlıklardan biri olduğunu göstermektedir. Ağrı subjektif bir duygu olarak tanımlandığı için ağrı deneylerinde kullanılan ağrı modelinin seçimi oldukça zordur²⁴. Ağrıya bağlı davranışlar biyolojik ritim gösterir ve kullanılan deney modeli, zaman ve türler arası farklılıklar sonuçları etkiler^{17,18,19,20,21,22,24,25,29}.

Nosisepsiyonun günlük ritmisitesinin anlaşılması analjezik ilaç çalışmalarının standardizasyonunda oldukça önemli bir role sahiptir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada ağrı duyumu aydınlık-karanlık siklusun karanlık fazında daha fazla iken²⁶, başka bir çalışmada ağrı duyumu aydınlık fazında daha fazla bulunmuştur³⁰. Farelerde yapılan bir çalışmada ise ağrı duyumunun hem aydınlık hem de karanlık fazında günde 2 kez pik yaptığı gösterilmiştir²⁷. Laboratuvarımızda bizim çalışmamızla paralel yürüyen bir çalışmada kontrol grubunda oluşan nosiseptif aktivitenin diurnal değişimi incelendiğinde anlamlı bir fark bulunmamıştır¹²¹.

Ağrı deneylerinde kadınlar ve erkekler arasında ağrı hassasiyetinde oluşan farklılık sosyal duruma ve fizyolojik faktörlere bağlıdır. Ayrıca hayvan deneylerinde de noksiyus uyarana karşı dişi ve erkekler arasında farklılıklar gözlenmiştir ve biyolojik mekanizmaların bu farklılıkların nedeni olabileceği ifade edilmiştir¹²². Yapılan çalışmalarda ağırlı termal uyarana karşı, kadınlarda ağrı eşiğinin erkeklere göre daha düşük olduğu ifade edilmiştir^{22,123}. Dişi sıçan ve fareler de kimyasal, ısı ve elektriksel uyarılara karşı erkeklere

göre daha hassastır¹²². Bizim çalışmamızla paralel yürüyen diğer çalışmada, dişi ve erkek fareler arasında morfin, L-arjinin, morfin+L-NAME ve morfin+L-arjinin gruplarında oluşan % antinosiseptif aktivite incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. L-NAME gece grubunda dişi ve erkek fareler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($P<0.05$). Dişiler erkeklere göre daha yüksek bir antinosiseptif aktivite göstermiştir¹²¹. Bizim çalışmamızda ise dişi ve erkek fareler arasında, nebivolol, nebivolol+L-NAME, nebivolol+L-arjinin, nebivolol+morfin+L-NAME ve nebivolol+morfin+L-arjinin gruplarında oluşan % antinosiseptif aktivite istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Abacıoğlu ve arkadaşları kimyasal aljezik p-BK ile indüklenen kıvrınma aljezi modelinde L-arjinin-NO\GMP yolağının etkisini araştırmıştır. NO prekürsörü olan L-arjinin 0.125-1.0 mg/kg dozunda, NOS inhibitörü L-NAME de 18.75-150 mg/kg dozunda antinosisepsiyon oluşturmuştur. L-arjinin dozu arttırıldığında (10-100 mg/kg), guanilil siklaz ve/veya NOS inhibitörü metilen mavisi gibi doz bağımlı olarak nosisepsiyon-antinosisepsiyon-nosisepsiyon şeklinde trifazik bir etki gözlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak L-arjinin-NO\GMP kaskadındaki bileşenlerin, nosiseptörler üzerinde direkt etkileri olduğunu veya NO ile indüklenen diğer nosiseptif yollarla, periferik ve santral olarak nosiseptif proseslere katılıyor olabildiğini belirtmişlerdir¹⁰⁷.

Laboratuvarımızda paralel yürüyen bir diğer çalışmada morfin ($ED_{50}=0.13$ mg/kg)¹²⁰, L-NAME (75 mg/kg), L-arjinin (2.0 mg/kg), morfin (0.13 mg/kg)¹²⁰+L-NAME (75 mg/kg) ve morfin (0.13 mg/kg)¹²⁰+L-arjinin (2.0 mg/kg) kombinasyonlarında oluşturan % antinosiseptif aktivite dişi ve erkek farelerde iki farklı zamanda (09⁰⁰-21⁰⁰) hesaplanmıştır. Kontrol grubunda oluşan nosisepsiyonda; morfin, L-arjinin, L-NAME, morfin+L-NAME ve

morfin+L-arjinin gruplarında oluşan antinosiseptif aktivitede gece- gündüz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Biz çalışmamızda nebivololün tek başına ve nebivolol+morfin, nebivolol+L-arjinin, nebivolol+L-NAME, nebivolol+morfin+L-arjinin ve nebivolol+morfin+L-NAME kombinasyonlarında oluşturduğu % antinosiseptif aktiviteyi ve bunun zamana ve cinsiyete bağlı değişimini araştırdık.

Nebivolol selektif bir β_1 -reseptör antagonistidir ve periferik vazodilatör etkiye sahiptir. Bu etkisi endojen NO üretimi aracılığıyla gerçekleşir^{34,39,40,41}. Nebivololün vasküler düz kas hücrelerindeki vazodilatör etkisi ise NO-sGMP bağımlı mekanizmalarla gerçekleşir³⁵. Biz çalışmamıza nebivolol ve L-arjinin-NO\sGMP yolağı arasındaki ilişkiden yola çıkarak başladık. Diğer bazı β blokerlerin nosiseptif proseslerdeki rolünün araştırıldığı çalışmalarda oluşturdukları nosiseptif\antinosiseptif etki L-arjinin-NO\sGMP yolağından bağımsız olup^{64,65}, aynı çalışmada kullanılan ağrı modeline göre değişebileceği gibi⁶⁵, kullanılan β blokerin diğer reseptörler üzerindeki etkilerinden kaynaklanan antinosiseptif özellikleri de olabileceği gösterilmiştir. Örneğin β -adrenoreseptör blokörü olan pindololün tramadol antinosisepsiyonunu arttırdığı; fakat bu etkisinin pindololün aynı zamanda 5-HT_{1A} reseptör antagonisti olma özelliğine bağlı olduğu gösterilmiştir⁶⁴.

Bizim çalışmamızda nebivololün tek başına ve nebivolol+morfin, nebivolol+L-NAME, nebivolol+morfin+L-NAME ve nebivolol+morfin+L-arjinin kombinasyonlarında oluşturduğu % antinosiseptif aktivite gece-gündüz ve dişi-erkek grupları incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$). Dişi gündüz (09⁰⁰) grubunda nebivolol ve nebivolol+L-arjinin kombinasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0.05$). Nebivololün oluşturduğu % antinosiseptif aktivitenin

(%68.30±5.8), nebivolol+L-arjinin (%34.05±14.2) kombinasyonu ile azaldığı görülmüştür.

Tüm veriler göz önüne alındığında nebivololün antinosisseptif etkisinde, zaman farkı ve cinsiyetten kaynaklanan anlamlı bir fark gözlenmediyse de, dişi farelerde nebivolol antinosisepsiyonunun nebivolol+L-arjinin kombinasyonu ile azalmasında L-arjinin/NO yolağının olası bir rolü olabileceğini öngörebiliriz.

VI. ÖZET

p-BENZOKİNON İLE İNDÜKLENEN NOSİSEPSİYONDA NEBİVOLOL'ÜN KRONOBİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, 12'şer saat aydınlık (07⁰⁰-19⁰⁰) ve karanlıkta (19⁰⁰-07⁰⁰) kalarak senkronize olmuş albino dişi ve erkek farelerde, kimyasal aljezik p-BK ile indüklenen kıvranma aljezi modelinde, selektif β_1 -adrenoreseptör blokörü olan nebivololün analjezik etkilerinin diurnal ve cinsiyete bağlı değişimi incelenmiş ve bu etkilerde L-arjinin-NO yolağının olası rolü araştırılmıştır. Bunun için saat 09⁰⁰ ve 21⁰⁰'da morfin, L-NAME ve L-arjininin nebivolol ile ve nebivololsüz kombinasyonları hayvanlara uygulanmış ve oluşan kıvranma sayıları kaydedilmiştir. Test edilen maddelerin kıvranma sayıları üzerindeki inhibitör etkisi % antinosiseptif aktivite olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel analizde parametrik ve non-parametrik anova kullanılmıştır.

Sonuç olarak nebivolol grupları arasında zaman farkı ve cinsiyetten kaynaklanan istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadıysa da, dişilerde nebivolol antinosisepsiyonunun nebivolol+L-arjinin kombinasyonu ile azalmasında, L-arjinin-NO yolağının olası bir rolü olabileceğini öngörebiliriz.

VII. SUMMARY

INVESTIGATION THE CHRONOBIOLOGIC EFFECTS OF NEBIVOLOL ON p-BK-INDUCED NOCICEPTION IN THE MOUSE

In this study, the analgesic activity of nebivolol, the selective β_1 -adrenoreceptor blocker, on diurnal and gender variation on female and male mice synchronized to 12:12 light-dark and the L-arginin-NO pathway's potential role in this activity were investigated. At 09⁰⁰ and 21⁰⁰, morphine, L-NAME and L-arginin and their combinations with nebivolol are administered to the animals and the number of writhes were counted. The inhibitory effect of the tested materials were counted as the % antinociceptive activity. Parametric and non-parametric ANOVA was used for statistical analysis.

Although there isn't any statistically significant difference between nebivolol groups according to time and gender, we may say that the decrease of nebivolol antinociception with nebivolol+L-arginin combination in female mice may be deal with the L-arginin/NO pathway.

VIII. KAYNAKLAR

1. Önal A. Algoloji. Elazığ: Nobel Kitabevi; 2004. s.1-20
2. Erdine S. Ağrı. Savaş Ciltevi; 2000. s.20-9
3. Abacıoğlu N. Aljezi, inflamasyon, pirezis ve nonsteroidal analjezik antiinflamatuvar ilaçlar. In: Bökesoy TA, Çakıcı İ, Melli M, editörs. Farmakoloji Ders Kitabı. Ankara: Gazi Kitabevi; 2000. s.473-7.
4. Abacıoğlu N. Chronobiology of pain in experimental designs. In: Mediterranean Society for Chronobiology First Graduate Course Abstracts on Chronobiology. Antalya, Türkiye. 2001.
5. Devor M. Sinir hasarıyla ilişkili ağrı mekanizmaları. Savaş Ciltevi; 2000. s.30-9.
6. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. Pharmacol Rev 2001; 53: 597-652.
7. Halberg F, Cornelissen G. Rhythms and blood pressure. Ann Ist Super Sanita 1993; 29(4): 647-65.
8. Reinberg A. Chronobiology: concepts and definations. In: Mediterranean Society for Chronobiology First Graduate Course Abstracts on Chronobiology. Antalya, Türkiye. 2001.

9. Haus E, Touitou Y. Principals of clinical chronobiology. In: Touitou Y, Haus E, editors. Biological rhythms in clinical and laboratory medicine. 2 nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1994. p. 6-34.
10. Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesion in the rat. *Brain Res* 1972; 42: 201-6.
11. Tosini G, Menaker M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 1996; 272 (5260): 419-21.
12. Menaker M, Tosini G. The evolution of vertebrate circadian systems. In: Honma K, Honma S, editors. Circadian organization and oscillatory coupling. Hokkaido University. Sapporo. 1996; pp. 39-52.
13. Zordan M, Kyriacou CP. The circadian clock in mammals. *J Headache Pain* 2000; 1: 103-7.
14. Kalsbeek A, Cutrera RA, Van Heerikhuize JJ, Van Der Vliet J, Buijs RM. GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neuroscience* 1999; 91 (2): 453-61.
15. Zhdanova IV, Wurtman RJ. Efficacy of melatonin as a sleep-promoting agent. *J Biol Rhythms* 1997; 12 (6): 644-50.
16. Haus E. Chronobiology of endocrine systems and therapeutic approaches to endocrine disorders. In: Mediterranean Society for Chronobiology First Graduate Course Abstracts. Antalya, Türkiye. 2001.

17. Grabfield GP, Martin EG. Variations in the sensory threshold for faradic stimulation in normal human subjects I. The diurnal rhythm. *Am J Physiol* 1912; 31: 300-8.
18. Martin EG, Grabfield GP. Variations in the sensory threshold for faradic stimulation in normal human subjects I. The nocturnal rhythm. *Am J Physiol* 1914; 33: 415-22.
19. Procacci P, Dellacorte M, Zoppi M, Maresca M. Rhythmic changes of the cutaneous pain threshold in man. A general review. *Chronobiologia* 1974; 1: 77-87.
20. Procacci P, Moretti R, Zoppi M, Cappelletti C, Voegelin MR. Rhythms circadiens et circadrigindiens du Seuil de la douleur cutanée chez thomme. *Bull Groupe Et Rhythmes Biol* 1973; 5: 65-75.
21. Hummel T, Hepper M, Kaiser R, Bos R, Liefjold J, Kobal G. Investigation of circadian effects on the plasma levels of dihydrocodeine and tramadol after peroral administration. In: *Proceedings of the 5th International Conference of Biological Rhythms and Medications*. Ameli Island, F.L, Houston; 1992.
22. Gobel H, Cordes P. Circadian variation of pain sensitivity in pericranial musculature. *Headache* 1990; 30 (7): 418-22.
23. Strian F, Lautenbacher S, Galfe G, Holzi R. Diurnal variations in pain perception and thermal sensitivity. *Pain* 1989; 36 (1): 125-31.

24. Labrecque G, Vanier MC. Biological rhythms in pain and in the effects of opioid analgesics. *Pharmac Ther* 1995; 68 (1): 129-47.
25. Frederickson RC, Burgis V, Edwards JD. Hyperalgesia induced by naloxane follows diurnal rhythm in responsivity to painful stimuli. *Science* 1977; 198 (4318): 756-8.
26. Martínez-Gómez M, Cruz Y, Salas M, Hudson R, Pacheco P. Assessing pain threshold in the rat: Changes with estrus and time of day. *Physiology&Behavior* 1994; 55 (4): 651-57.
27. Konecka AM, Sroczynska I. Circadian rhythm of pain in male mice. *Mice Gen Pharmac* 1998; 31 (5): 809-10.
28. Perisin L, Facchin P, Porro CA. Diurnal variations in tonic pain reactions in mice. *Life Sciences* 2000; 67: 1477-88.
29. Perisin L, Facchin P, Porro CA. Tonic pain response in mice: effects of sex, season and time of day. *Life Sciences* 2003; 72: 897-907.
30. Rosenfeld JP, Rice PE. Diurnal rhythms in nociceptive threshold of rats. *Physiol Behav* 1979; 23: 419-20.
31. Kerdelhue B, Karteszi M, Pasqualini C, Reinberg A, Mezey E, Palkovits M. Circadian variations in beta-endorphin concentrations in pituitary and in some brain nuclei of the adult male rat. *Brain Res* 1983; 261 (2): 243-8.

32. Hamra JG, Kamerling SG, Wolfsheimer KJ, Bagwell CA. Diurnal variation in plasma ir-beta-endorphin levels and experimental pain thresholds in the horse. *Life Sci* 1993; 53 (2): 121-9.

33. Luyten WHML, Pauwels PJ, Moereels H, Marulla S, Strosberg AD, Leysen JE . Comparative study of the binding properties of cloned human β_1 - and β_2 - adrenergic receptors expressed in Escherichia coli. *Drug Invest* 1991; 3 (1): 3-12.

34. Mangrella M, Rossi F, Fici F, Rossi F. Pharmacology of nebivolol. *Pharmacological Research* 1998; 38 (6): 419-31.

35. Ignarro LJ, Byrns RE, Trinh K, Sisodia M, Buga GM. Nebivolol: a selective β_1 -adrenergic receptor antagonist that relaxes vascular smooth muscle by nitric oxide- and cyclic GMP-dependent mechanisms. *Nitric Oxide* 2002; 7: 75-82.

36. Troost R, Schwedhelm E, Rojczyk S, Tsikas D, Frölich JC. Nebivolol decreases systemic oxidative stres in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2000; 50: 377-79.

37. Janssens WJ, Van de Water A, Xhonneux R, Reneman RS, Van Nueten JM, Janssen PAJ. Nebivolol is devoid of intrinsic sympathomimetic activity. *Eur J Pharmacol* 1989; 159 (1): 89-95.

38. Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Nava C, Davoli A, Criscuoli M, Crea A, Sawamura T, Lo Cascio V. Nebivolol and its 4-keto derivative increase nitric oxide in endothelial cells by reducing its oxidative inactivation. *Journal of American College of Cardiology* 2003; 42 (10): 1838-44.

39. Janssens WJ, Xhonneux R, Janssen PAJ. Animal pharmacology of nebivolol. *Drug Investig* 1991; 3 (1): 13-24.
40. Pauwels PJ, Gommeren W, Van Lommen G, Janssen PA, Leysen JE. The receptor binding profile of the new antihypertensive agent nebivolol and its stereoisomers compared with various beta-adrenergic blockers. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1988; 34 (6): 843-51.
41. McLay JS, Irvine N, McDevitt DG. Clinical pharmacology of nebivolol. *Drug Invest* 1991; 3 (1-1): 31-2.
42. McNeely W, Goa KL. Nebivolol in the management of essential hypertension. *Drugs* 1999; 57 (4): 633-51.
43. Van de Water A, Janssens W, Van Neuten J, Xhonneux R, De Cree J, Verhaegen H, Reneman RS, Janssen PA. Pharmacological and hemodynamic profile of nebivolol, a chemically novel, potent, and selective beta 1-adrenergic antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 11 (5): 552-63.
44. Waeber B. Nebivolol: a beta blocker with vasodilator properties. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2000; 89 (15): 631-3.
45. Gao YS, Nagao T, Bond RA, Janssens WJ, Vanhoutte PM. Nebivolol induces endothelium-dependent relaxations of canine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 (6): 964-9.

46. Van Bortel LM, de Hoon JN, Kool MJ, Wijnen JA, Vertommen CI, Van Nueten LG. Pharmacological properties of nebivolol in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1997; 51 (5): 379-84.
47. Altwegg LA, d'Uscio LV, Barandier C, Cosentino F, Yang Z, Luscher TF. Nebivolol induces NO-mediated relaxations of rat small mesenteric but not of large elastic arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36 (3): 316-20.
48. Broeders MA, Doevendans PA, Bekkers BC, Bronsaer R, Van Gorsel E, Heemskerk JW, Egbrink MG, Van Breda E, Reneman RS, Van Der Zee R. Nebivolol: a third generation beta blocker that augments vascular nitric oxide release: endothelial beta(2)- adrenergic receptor-mediated nitric oxide production. *Circulation* 2000; 102: 677-84.
49. Ritter JM. Nebivolol: endothelium-mediated vasodilating effect. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38 (3): 13-6.
50. Cosentino F, Bonetti S, Eto M, Werner-Felmayer G, Luscher TF. Nitric oxide mediated relaxations in salt-induced hypertension: effect of chronic beta1- selective receptor blockade. *J Hypertens* 2002; 20: 421-28.
51. de Groot AA, Mathy MJ, van Zwieten PA, Peters SL. Involvement of the beta3 adrenoceptor in nebivolol-induced vasorelaxation in the rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42 (2): 232-6.
52. Parenti A, Filippi S, Amerini S, Granger HJ, Fazzini A, Ledda F. Inositol phosphate metabolism and nitric-oxide synthase activity in endothelial cells are involved in the vasorelaxant activity of nebivolol. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292 (2): 698-703.

53. Andre DE, Arnet U, Yang Z, Luscher TF. Nebivolol inhibits human aortic smooth muscle cell growth: effects on cell cycle regulatory proteins. *J Cardiovasc Pharm* 2000; 35 (6): 845-8.
54. Brehm BR, Bertsch D, von Fallois J, Wolf SC. Beta-blockers of the third generation inhibit endothelin-1 liberation, mRNA production and proliferation of human coronary smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36 (5-1): 401-3.
55. Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Brett SE, Chen JP, Dupont AG, Van Nueten L, Wooding SJ, Ritter JM. Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: evidence for an L-arginine/NO-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274 (3): 1067-71.
56. Dawes M, Brett SE, Chowienczyk PJ, Mant TG, Ritter JM. The vasodilator action of nebivolol in forearm vasculature of subjects with essential hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48 (3): 460-3.
57. Ignarro LJ. Bir sinyal molekülü olarak nitrik oksit. Nitrik Oksit (NO), Endotel ve Kardiyovasküler Hastalıklar Kongresi. İstanbul , Türkiye, 2004.
58. Georgescu A, Pluteanu F, Flonta M, Badila E, Dorobantu M, Popov D. The cellular mechanisms involved in the vasodilator effect of nebivolol on the renal artery. *Eur J Pharmacol* 2005; 508: 159-66.
59. Blankestijn PJ, Van Den Meiracker AH, Man in't Veld AJ, Boosma F, Derkx FHM, Schalekamp MADH. Nebivolol. An acute and long term study in essential hypertension. *Drug Invest* 1991; 3 (1): 152-4.

60. Chan TYK, Woo KS, Critchley JAJH, Swaminatham R. Effects of nebivolol on blood pressure, hormones and cardiac function in Chinese subjects with essential hypertension. *Drug Invest* 1991; 3 (1): 98-104.
61. Nakaoka H, Kitahara Y, Amano M, Imataka K, Fujii J, Ishibashi M, Yamaji T. Effect of beta-adrenergic receptor blockade on atrial natriuretic peptide in essential hypertension. *Hypertension* 1987; 10 (2): 221-5.
62. Janssens WJ, Snoeck E. Pharmacology and pharmacokinetics of nebivolol. Presented at the symposium on endothelium in hypertension. *New Therapeutic Trends*, Berlin, Germany, 1997 Mar 1; 10-3.
63. Van Rooy P, De Créé J. Haemodynamic effects of nebivolol in poor and extensive metabolisers. *Atti del First International Nebivolol Investigator's Meetinf.* Antwerp, 13-16 Septemder, 1990.
64. Rojas-Corrales MO, Ortega-Alvaro A, Gibert-Rahola J, Roca-Vinardell A, Micó JA. Pindolol, a beta-adrenoreceptor blocker/5-hydroxytryptamine_{1A/1B} antagonist, enhances the analgesic effect of tramadol. *Pain* 2000; 88: 119-24.
65. Micó JA, Gibert-Rahola J, Casas J, Rojas O, Serrano MI, Serano JS. Implication of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors in the antinociceptive effect of tricyclic antidepressants.
66. Ignarro LJ. Nitrik oksitin biyolojik etkileri. 1. Uluslararası Nitrik Oksit Toplantısı Temel Bilimden Klinik Kanıt. Barselona, İspanya, 2003.

67. Türker RK, Melli M, Kayaalp SO. Eikozanoidler ve diğer otakoidler. In: Kayaalp SO, editör. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Onuncu Baskı. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık; 2002. s.1439-63.
68. Akar F. Endotel ve epitel kaynaklı otakoidler. In: Bökesoy TA, Çakıcı İ, Melli M, editors. Farmakoloji Ders Kitabı. Ankara: Gazi Kitabevi; 2000. s. 221-7.
69. Meijer JH, Schwartz WJ. In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. J Biol Rhythms 2003; 18 (3): 235-49.
70. Ebling FJ. The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. Prog Neurobiol 1996; 50 (2-3): 109-32.
71. Liou SY, Shibata S, Iwasaki K, Ueki S. Optic nerve stimulation-induced increase of 3H-glutamate and 3H-aspartate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. Brain Res Bull 1986; 16 (4): 527-31.
72. Colwell CS, Menaker M. NMDA as well as non-NMDA receptor antagonist can prevent the phase shifting effects of light on the circadian system of the golden hamster. J Biol Rhythms 1992; 7: 125-36.
73. Abe H, Rusak B, Robertson HA. NMDA and non-NMDA receptor antagonists inhibit photic induction of FOS protein in the hamster suprachiasmatic nucleus. Brain Res Bull 1992; 28: 831-5.

74. Gannon RL, Rea MA. Glutamate receptor immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1993; 622: 337-42.
75. Rea MA, Buckley B, Lutton LM. Local administration of EAA antagonists blocks light-induced phase shifts and c-fos expression in hamster SCN. *Am J Physiol* 1993; 265 (5-2): 1191-8.
76. Colwell CS. NMDA-evoked calcium transients and currents in suprachiasmatic nucleus: gating by the circadian system. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 1420-28.
77. Van den Pool AN, Finkbeiner SM, Cornell-Bell AH. Calcium excitability and oscillations in suprachiasmatic nucleus, neurons and glia in vitro. *J Neurosci* 1992; 12: 2648-64.
78. Fukushima T, Shimazoe T, Shibata S, Watanabe A, Ono M, Hamada T, Watanabe S. The involvement of calmodulin and Ca^{+2} /calmodulin dependent protein kinase II in the circadian rhythms controlled by the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 1997; 227: 45-8.
79. Golombek DA, Ralph MR. KN-62, an inhibitor of Ca^{+2} /calmodulin kinase II, attenuates circadian responses to light. *Neuroreport* 1994; 5: 1638-40.
80. Golombek DA, Ralph MR. Circadian responses to light: the calmodulin connection. *Neurosci Lett* 1995; 192: 101-4.

81. Prosser RA, McArthur AJ, Gillette MU. cGMP induces phase shifts of a mammalian circadian pacemaker at night, in antiphase to cAMP effects. *Proc Nat Acad Sci* 1989; 86: 6812-5.
82. Prosser RA, Heller HC, Miller JD. Serotonergic phase advances of the mammalian circadian clock involve protein kinase A and K⁺ channel opening. *Brain Res* 1994; 644 (1): 67-73.
83. Mathur A, Golombek DA, Ralph MR. cGMP-dependent protein kinase inhibitors block light-induced phase advances of circadian rhythms in vivo. *Am J Physiol* 1996; 270 (5-2): 1031-6.
84. Ferreyra GA, Golombek DA. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase activity in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Soc Res Biol* 1998; 6
85. Melo L, Golombek DA, Ralph MR. Regulation of circadian photic responses by nitric oxide. *J Biol Rhythms* 1997; 12 (4): 319-26.
86. Watanabe A, Ono M, Shibata S, Watanabe S. Effect of a nitric oxide synthase inhibitor, N-nitro-L-arginine methylester, on light-induced phase delay of circadian rhythm of wheel-running activity in golden hamsters. *Neurosci Lett* 1995; 192 (1): 25-8.
87. Ding JM, Fauman LE, Hurst WJ, Kuriashka LR, Gillette MU. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci* 1997; 17: 667-75.

88. Ding JM, Chen D, Weber ET, Faiman LE, Rea MA, Gillette MU. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* 1994; 266: 1713-7.
89. Tunçtan B, Weigl Y, Dotan A, Peleg L, Zengil H, Ashkenazi I, Abacıoğlu N. Circadian variation of nitric oxide synthase activity in mouse tissue. *Chronobiol Int* 2002; 19 (2): 393-404.
90. Ayers NA, Kapas L, Krueger JM. Circadian variation of nitric oxide synthase activity and cytosolic protein levels in rat brain. *Brain Res* 1996; 707 (1): 127-30.
91. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9030-903.
92. Rodriguez –Alvarez J, Lafon-Cazal M, Bockaert J. The CaM-kinase II inhibitor KN-62 blocks NMDA but not kainate stimulation of NO synthesis. *Neuroreport* 1996; 7 (15-17): 2525-8.
93. Holthusen H, Arndt JO. Nitric oxide evokes pain at nociceptors of the paravascular tissue and veins in humans. *J Physiol* 1995; 487 (1): 253-8.
94. Holthusen H. Involvement of the NO/cyclicGMP pathway in bradykinin-evoked pain from veins in humans. *Pain* 1997; 69 (1-2): 87-92.
95. Ferreira SH, Duarte ID, Lorenzetti BB. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* 1991; 201: 121-122.

96. Tonussi CR. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol* 1994; 251 (2-3): 173-9.
97. Aimi Y, Fujimura M, Vincent SR, Kimura H. Localization of NADPHdiaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat. *J Comp Neurol* 1991; 306 (3): 382-92.
98. Valtchanoff JG, Weinberg RJ, Rustioni A, Schmidt HH. Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord. *Neurosci Lett* 1992; 148 (1-2): 6-10.
99. Ren K, Ruda MA. Nitric oxide synthase-containing neurons in sensory ganglia of the rat are susceptible to capsaicin-induced cytotoxicity. *Neuroscience* 1995; 65 (2): 505-11.
100. Meller ST, Gebhart GF. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 1993; 52 (2): 127-36.
101. Babbedge RC, Wallace P, Gaffen ZA, Hart SL, Moore PK. L-NG-nitro arginine p-nitroanilide (L-NAPNA) is antinociceptive in the mouse. *Neuroreport* 1993; 4 (3): 307-10.
102. Moore PK, Oluyomi AO, Babbedge RC, Wallace P, Hart SL. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol* 1991; 102 (1): 198-202.
103. Haley JE, Dickenson AH, Schachter M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology* 1992; 31 (3): 251-8.

104. Meller ST, Cummings CP, Traub RJ, Gebhart GF. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. *Neuroscience* 1994; 60 (2): 367-74.
105. Doursout M, Liang Y, Chelly JE. NOS inhibitors exhibit antinociceptive properties in the rat formalin test. *Can J Anesth* 2003; 50 (9): 909-16.
106. Sekiguchi F, Mita Y, Kamanaka Y, Kawao N, Matsuya H, Taga C, Kawabata A. The potent inducible nitric oxide synthase inhibitor ONO-1714 inhibits neuronal NOS and exerts antinociception in rats. *Neurosci Lett* 2004; 365: 111-5.
107. Abacıoğlu N, Tunçtan B, Akbulut E, Çakıcı İ. Participation of the components of L-arginine/nitric oxide/cGMP cascade by chemically-induced abdominal constriction in the mouse. *Life Sci* 2000; 67: 1127-37.
108. Sousa AM, Prado WA. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res* 2001; 897: 9-19.
109. Aguirre-Bañuelos P, Grandos-Soto V. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 2000; 395: 9-13.
110. Ventura-Martínez R, Déciga-Campos M, Díaz-Reval I, González-Trujano E, López-Muñoz F. Peripheral involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the indomethacin-induced antinociception in rat. *Eur J Pharmacol* 2004; 503: 43-8.

111. Grandos-Soto V, Rufino M, Lopes LDG, Ferreira SH. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 1997; 340: 177-80.
112. Amarante LH, Duarte IDG. The κ -opioid agonist ($\pm$)-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol* 2002; 454: 19-23.
113. Babey AM, Kolesnikov Y, Cheng J, Inturissi CE, Trifilletti RR, Pasternak GW. Nitric oxide and opioid tolerance. *Neuropharmacology* 1994; 33 (11): 1463-70.
114. Heinzen EL, Pollack GM. Pharmacodynamics of morphine-induced neuronal nitric oxide production and antinociceptive tolerance development. *Brain Res* 2004; 1023: 175-84.
115. Xu JY, Hill KP, Bidlack JM. The nitric oxide/cyclic GMP system at the supraspinal site is involved in the development of acute morphine antinociceptive tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 196-201.
116. Bhargava HN, Bian J, Kumar S. Mechanism of attenuation of morphine antinociception by chronic treatment with L-arginine. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281: 707-12.
117. Bhargava HN, Bian J. N^G-nitro-L-arginine reverses L-arginine induced changes in morphine antinociception and distribution of morphine in brain regions and spinal cord of the mouse. *Brain Res* 1997; 749: 351-3.

118. Watanabe C, Okuda K, Sakurada C, Ando R, Sakurada T, Sakurada S. Evidence that nitric oxide-glutamate cascade modulates spinal antinociceptive effect of morphine: a behavioural and microdialysis study in rats. *Brain Res* 2003; 990: 77-86.
119. Okun R, Liddon SC, Lasanga L. The effects of aggregation, electric shock and adrenergic blocking drugs on inhibition of the 'writhing syndrome'. *J Pharmacol Exp Ther* 1963; 139: 107-9.
120. Abacıoğlu N, Bediz A, Çakıcı İ, Tunçtan B, Kanlık İ. Antinociceptive effects of H₁- and H₂- antihistaminics in mice. *Gen Pharmac* 1993; 24 (5): 1173-6.
121. Dağlı G. Tiaminin Antinosiseptif Etkilerinin Kronobiyolojik Olarak İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2006.
122. Wiesenfeld-Hallin Z. Sex differences in pain perception. *Gender Medicine* 2005; 2 (3): 137-45.
123. Wise EA, Price DD, Myers CD. Gender role expectations of pain: relationship to experimental pain perception. *Pain* 2002; 96: 335-48.

IX. ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Samsun’da doğdum. İlköğrenimimi Samsun 19 Mayıs İlkokulu’nda, ortaokul ve liseyi ise Samsun Anadolu Lisesi’nde tamamladım. 2002 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden mezun oldum. 2003 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı’nın açmış olduğu yüksek lisans programına başladım. Halen Adana Kozan Devlet Hastanesi’nde eczacı olarak görev yapmaktayım.