T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL

ENDOJEN NİTRİK OKSİT SENTAZ İNHİBİTÖRÜ ASİMETRİK DİMETİLARGİNİNİN MORFİN TOLERANS VE BAĞIMLILIĞINDAKİ MODÜLATÖR ROLÜ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Özgür GÜNDÜZ

EDİRNE-2010

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde ve tez çalışmalarımda değerli katkıları olan danışman hocam Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'e; Prof. Dr. İsmet DÖKMECİ'ye, Prof. Dr. Hakan KARADAĞ'a, Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ'ye; bu çalışmada benden yardımlarını esirgemeyen Samime GÜNDÜZ, Gülçin AKIN ve Burhan ELMAS'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **AĞRI** 3
- **AĞRININ ALGILANMA AŞAMALARI** 4
- **NOSİSEPTÖRLER VE AĞRI MEDİYATÖRLERİ** 5
- **MEDULLA SPİNALİS DORSAL BOYNUZ NÖRONAL SİSTEMİ** 6
- **AĞRI YOLAKLARI** 7
- **ROSTRAL MERKEZLER VE AĞRI İLETİMİ** 9
- **AĞRI SINIFLAMASI** 10
- **NİTRİK OKSİT** 12
- **ASİMETRİK DİMETİLARGİNİN** 14
- **MORFİN** 17

GEREÇ VE YÖNTEMLER 20

BULGULAR 27

TARTIŞMA 44

SONUÇLAR 49

ÖZET 50

SUMMARY 51

KAYNAKLAR 53

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

ADMA	**:**	Asimetrik dimetilarginin
BH_4	**:**	Tetrahidrobiopterin
CaMKII	**:**	Ca^{2+}/calmodulin bağımlı protein kinazII
cAMP	**:**	Siklik adenozin monofosfat
cGMP	**:**	Siklik guanozin monofosfat
DDAH	**:**	Dimetilarginin dimetil-aminohidrolaz
DDL	**:**	Düşük dansiteli lipoprotein
EDRF	**:**	Endotel Derived Relaxing Factor
eNOS	**:**	Endotelyal Nitrik Oksit
FAD	**:**	Flavin adenin dinükleotit kalmodulin
FMN	**:**	Flavin mononükleotit
GABA	**:**	Gama amino bütirik asit
GRKs	**:**	G-protein-coupled reseptör kinaz
GTP	**:**	Guanozin trifosfatı
HPLC	**:**	High Performance Liquid Chromotography
IASP	**:**	International Association for the Study of Pain
IS	**:**	İnternal Standart
iNOS	**:**	İndüklenebilir Nitrik Oksit
L-NA	**:**	Nitro-L-arginin
L-NAME	**:**	Nitro-L-arginin metilester
7-NI	**:**	7-nitroindazol
L-NMMA	**:**	Monometil-L-arginin

MAPKs	**:**	Mitogen activated kinaz
NA	**:**	Noradrenalin
NADPH	**:**	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NMDA	**:**	N-metil-D-aspartat
nNOS	**:**	Nöronal Nitrik Oksit
NOS	**:**	Nitrik oksit sentaz
PARS	**:**	Poly (ADP-ribose) synthase
PGE_2	**:**	Prostoglandin E_2
PGI_2	**:**	Prostoglandin I_2
PKC	**:**	protein kinaz C
PRMT	**:**	Protein arginin metil transferaz
SAM	**:**	S-adenozil-metiyonin
SDMA	**:**	Simetrik dimetilarginin
VPL	**:**	Ventralis posterior lateralis
VPM	**:**	Ventralis posterior medialis
WDR	**:**	Wide dynamic range

GİRİŞ VE AMAÇ

En güçlü analjezik ilaçlar olarak kabul edilen opioid ilaçların etkinlikleri, birçok etkilerine karşı tolerans gelişmesi ve istenmeyen etkilerinin fazlalığı nedeniyle kısıtlanmakta, bu nedenle bu grup ilaçlar uzun süreyle ve yüksek dozlarda gönül rahatlığıyla kullanılamamaktadırlar. Örneğin, tedavisinde kullanılan ilaç sayısı çok az olan nöropatik ağrı ve benzeri durumlara karşı, tolerans gelişimi ve istenmeyen etkileri nedeniyle etkin olarak kullanımı kısıtlanmaktadır (1-3). Bu nedenlerle, opioid ilaçlara karşı gelişen toleransın ve bağımlılığın moleküler temelinin ve mekanizmalarının aydınlatılabilmesi, bu ilaçların çok daha etkin bir şekilde kullanılabilmeleri açısından büyük önem taşımaktadır.

Nitrik oksit (NO) santral sinir sisteminde yeni bir nöronal ulak ve nöromodülatör olarak görülmekte olup, nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla L-arginin'den oluşmaktadır (4-6). NOS'un endotelyal, indüklenebilir ve nöronal (sırasıyla, eNOS, iNOS ve nNOS) olarak isimlendirilen üç farklı formu saptanmış olup, asimetrik dimetilarginin (ADMA) her üç izoformu da inhibe edebilen endojen bir NOS inhibitörüdür (7). NO ile ilgili yapılan araştırmalar, gerek ağrının oluşmasında gerekse ilaçların analjezik etkilerindeki rolü nedeniyle son senelerde belirgin derecede artmıştır; benzer şekilde NOS inhibitörlerinin de ağrı modellerinde etkinliklerine ilişkin araştırmalar yapılmıştır (4,8). Nöropatik ağrıya benzer belirtiler ortaya çıkarttığı bilinen bir deneysel diyabet modelinde ADMA düzeylerinin arttığı saptanmış ve bu artışın en az sekiz hafta devam ettiği bildirilmiştir (9-13).

Ayrıca, yakın zamanda, ADMA'nın nNOS'u inhibe edip NO düzeylerini azaltarak, morfinin analjezik doz-yanıt eğrisini değiştirebileceğine ve opioid tolerans ve bağımlılığında rol oynayan bir modülatör olabileceğine işaret edilmektedir (14). Tolerans, bağımlılık ve etki

mekanizmaları başta olmak üzere, birçok özellikleri açısından opioid ilaçlara benzerlikleri olan kanabinoidlere karşı gelişen tolerans ve bağımlılıkta da ADMA'nın modülatör olabileceği iddia edilmektedir (15).

Araştırmamızda, bu verilerden yola çıkarak, deneysel opioid tolerans ve bağımlılığında ADMA düzeylerinin değişebileceğini ve ADMA'nın opioid tolerans ve bağımlılığının bir göstergesi olabileceğini düşündük. Bu amaçla farelerde, morfine karşı tolerans ve bağımlılık oluşturmayı, bu sürecin farklı zaman dilimlerinde farelerin plazma ADMA düzeylerini ölçmeyi ve plazma ADMA düzeyleri ile tolerans gelişimi ve bağımlılık arasındaki korelasyon olasılığını araştırmayı planladık. Araştırmamız temelde ADMA düzeylerinin üzerine kurulmuş olmasına karşın, yöntemsel ve ekonomik koşulların uygunluğu nedeniyle simetrik dimetilarginin (SDMA) ve L-arginin, L-homoarginin düzeyleri de saptanacak ve bir anlamlılık saptanırsa üzerinde tartışma yapılacaktır.

Tolerans gelişimi ve bağımlılık ile plazma ADMA düzeyleri arasında korelasyon olduğunun bulunması, opioid tolerans ve bağımlılığının halen yeteri derecede aydınlatılamamış olan etyopatogenezi ile ilgili yeni bilgilere ulaşılmasına ve ADMA düzeylerinin opioid toleransının bir göstergesi olarak kullanılabilmesine olanak sağlayabilecektir. Böylelikle, opioid ilaçların dozlarını artırmaya gerek kalmaksızın ve istenmeyen etkileri minimumda tutularak daha etkin bir şekilde klinikte kullanılabilmesinin yolu açılabilecektir.

GENEL BİLGİLER

AĞRI

İngiliz dilinde ağrı "pain" kelimesi latincedeki *ponea* (ceza, intikam, işkence) kelimesinden kökenini almıştır (16). Tanımlaması oldukça güç bir kavramdır. Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği Taksonomi Komitesi "International Association for the Study of Pain" (IASP) 1979 yılında ağrıyı; "var olan veya olası doku hasarına eşlik eden veya bu hasar ile tanımlanabilen, hoşa gitmeyen duysal ve emosyonel deneyim" olarak tanımlanmıştır.

Bu tanımlamadan da anlaşıldığı üzere ağrı çok boyutlu bir deneyimdir ve kişi bu deneyimi, yaşamı boyunca karşı karşıya kaldığı ağrılı uyaranlarla kazanır (16). Ağrı sendromunun iki komponenti vardır:

a) Sensoryel diskriminatif: Ağrının yerinin ve şeklinin algılanması

b) Affektif motivasyonel: Ağrıya karşı reaksiyon; bu da endişe, anksiyete, korku ve otonomik sistemle ilgili çeşitli bulgulardan ibarettir (17,18).

Ağrı kişiden kişiye farklılıklar gösterebildiği gibi aynı kişide farklı zamanlarda farklı olarak da algılanabilinir (17). Twycross (19) tarafından hastanede yatmakta olan hastalarda ağrı eşiği üzerine, emosyonel ve psikososyal durumun etkileri incelenmiştir Bu araştırmaya göre kişinin uykusuz, yorgun, gergin, öfkeli, depresyonda olması ağrı eşiğini düşüren faktörler olarak bulunmuş, diğer taraftan iyi bir uyku, gevşeme, ruhsal durumun düzeltilmesinin ağrı eşiğini yükselttiği gözlemlenmiştir.

Nosisepsiyon teriminin kökeni Latince *noci* (yara, zarar) kelimesinden gelmektedir. Zararlı uyaranlara (*noxious stimuli*) nöronal yanıtların tümünü anlatır (17). Yani nosisepsiyon doku harabiyeti sonrası ortaya çıkan lokal mediyatörlerin ve aljezik maddelerin nosiseptörleri uyarmasıyla oluşan stimulusun, periferden santrale iletilmesi, santralde değerlendirilen bu

zararlı iletiye karşı uygun fizyolojik, biyokimyasal ve psikolojik önlemlerin harekete geçirilmesidir (20).

Bu tanıma göre nosisepsiyon olayında belirli bir uyaran vardır ve bu uyaran santral sinir sistemi tarafından değerlendirilip ona uygun yanıtlar verilir. Bu algılama olayında hissedilen ve eski deneyimlere dayanan duyular ve buna verilen kişisel yanıtlar ise ağrı olarak adlandırılır. Yani ağrı sendromunun komponentleri olarak yukarıda bahsettiğimiz sensoryel diskriminatif, affektif motivasyonel kavramların yanına kognitif değerlendirme boyutunu da eklemek gerekmektedir (21).

Tüm zararlı uyarılar ağrıyı oluştururken, tüm ağrılar nosisepsiyon sonucu değildir. Bazen zararlı uyarılar olmadan da ağrı oluşabilmektedir(17).

AĞRININ ALGILANMA AŞAMALARI

Ağrının iletim aşamaları ve buna yönelik yanıtları kapsayan nosisepsiyon olayı dört aşamada incelenebilir:

Transdüksiyon

Nosiseptörler aracılığıyla eşik değeri aşan çeşitli uyaranların (termal, mekanik, kimyasal vb.) üst merkezlere iletilmek üzere elektriksel bir stimulusa çevrilmesi aşamasıdır (16,17,21).

Transmisyon

Bu kavram nosiseptörlerden gelen uyarıların nöral yolaklar aracılığıyla üst merkezlere iletilmesi olayıdır. Bu yolaklar üç gruba ayrılabilir; (I) nosiseptörlerden spinal korda kadar olan primer sensoryal yolaklar, (II) spinal korddan beyin sapı ve talamusa uzanan çıkıcı yolaklar, (III) beyin sapı ve talamustan korteks postsentral girusa uzanan projeksiyon yolakları (16,17,21).

Modülasyon

Nosiseptif iletinin inen yolaklar aracılığıyla spinal kord seviyesinde modifiye edilmesi olayıdır. Burada ileti zayıflatılabilir veya güçlendirilebilir (16,17,21).

Persepsiyon

Üst merkezlere iletilmiş uyarının algılanması aşamasıdır (16,17,21).

NOSİSEPTÖRLER VE AĞRI MEDİYATÖRLERİ

Nosiseptörler

Mekanik, kimyasal, termal uyarıları algılayan nörolojik reseptörlerdir. Cilt, ciltaltı, periost, eklemler, kaslar, viseral dokularda bulunurlar (16). Nosiseptörlerin bazıları tek tip uyarıya duyarlıyken, bazıları ise birçok uyarıyla (polimodal nosiseptörler) aktive olabilirler.

Nosiseptörleri mekanonosiseptörler, sessiz nosiseptörler, polimodal mekanotermal nosiseptörler olarak kabaca gruplayabiliriz. Mekanonosiseptörler sıkmaya ve iğne batırmaya duyarlıyken, sessiz nosiseptörler inflamasyona, polimodal mekanotermal nosiseptörler ise aşırı bası, aşırı ısı (>42 ^{o}C ve <18 ^{o}C) ve aljeziklere duyarlıdır (17).

Periferik sinirler sinir lifinin çapına ve myelinli olup olmadıklarına göre A (α, β, γ, δ alt grupları içerir), B ve C olarak sınıflandırılırlar. A ve B lifleri myelinli, C lifleri myelinsizdir (16). A-delta (A-δ) liflerinin uçları termal ya da mekanik nosiseptörlerle donatılmışken, C liflerinin uçları ise çeşitli uyarıları alabilen polimodal nosiseptör özelliktedir (17). A-δ lifleri myelinli ve çapları da kalın olduğu için uyarıyı oldukça hızlı iletirken (30 m/sn), C lifleri myelinsiz ve ince çaplı oldukları için yavaş (0,5-2 m/sn) olarak iletirler (16,17).

A-delta liflerindeki mekanotermal nosiseptörlerin uyarılması ile iyi lokalize edilebilen, batıcı, keskin bir ağrı oluşur. C liflerinin aksonlarının ucundaki polimodal nosiseptörlerin uyarılması ise iyi lokalize edilemeyen, künt, yaygın bir ağrı oluşturur (17,22).

Nosiseptörlerin Çevresi

Nosiseptörlerin çevresi kapiller, kas dokusu, bağ dokusu yapıları ile çevrilidir. Her nosiseptörün çevresel ortamı tamamen kendine özgüdür. Doku hasarında bu çevresel yapıların nasıl etkileneceği tam olarak belirlenemez. Dolasıyla ortaya çıkan ağrı algılaması da aynı kalite ve lokalizasyonu göstermez (17).

Doku hasarı oluştuğunda çevresel nosiseptörler uyarılır ve uyarı ilk olarak hızlı A-δ lifleriyle iletilir, keskin ve lokalize bir ağrı oluşur. Zedelenmenin şiddeti fazla ise ikincil lokalize edilemeyen ağrı ve hiperaljezi izler. Doku hasarı sonucu zedelenen hücrelerden ortama aljezik maddeler yayılır. Bu maddeler hiperaljezi, doku ödemi, vazodilatasyon oluşturarak nörojenik inflamasyona sebebiyet verirler (16,17).

Periferik Ağrı Mediyatörleri

Doku zedelenmesi sonucunda zedelenen hücrelerden, zedelenen kapillerlerden bölgeye

gelen trombositlerden, akson refleksi sonrası duyarlı hale gelen nosiseptör uçlarından ortama aljezik ve hiperaljezik mediyatörler salınır

Aljezik mediyatörler: Histamin, serotonin, bradikinin, P maddesi, anjiotensin II, K^+

Hiperaljezik mediyatörler: Prostoglandin E_2 (PGE_2), Prostoglandin I_2 (PGI_2)

MEDULLA SPİNALİS DORSAL BOYNUZ NÖRONAL SİSTEMİ

Spinal kord ağrı iletiminde ikinci duraktır (16). Ağrı iletiminde eskiden sadece bir ara durak olarak değerlendirilen medulla spinalisin ağrı modulasyonunda çok önemli rolü olduğu anlaşılmıştır. Rexed (23) 1954 yılında spinal gri madeddeki birtakım yapısal katmanları tanımlamıştır. Buna göre gri madde 10 laminaya ayrılmıştır. İlk altı lamina (Lamina I, II, III, IV, V, VI) dorsal boynuzu, VII, VIII, IX. laminalar ventral boynuzu oluştururken, lamina X ise spinal kordun santral kanalının çevresini saran nöronları içerir. Dorsal boynuzu oluşturan laminalar duyusal nöronları içerirler ve aşağıda daha detaylı olarak anlatılmışlardır.

Lamina I (marjinal tabaka)

Dorsal boynuzun yüzeye en yakın tabakasıdır. A-δ ve C lifleri gibi küçük çaplı afferent liflerden ağrılı uyaranları alır ve anterolateral spinotalamik traktus aracılığıyla üst merkezlere iletir. Ağrı eşikleri yüksek olan nöronlardır.

Lamina II (substantia gelatinosa)

Ağrılı uyaranlara yanıt veren küçük internöronlar içermektedir. Substantia gelatinosa nöronları ağrılı uyaranların iletilmesinde inhibitör etki yapmaktadır. Lamina II nöronları lamina I ve V'in hücrelerini modüle ederler.

Lamina III ve IV

Çoğunlukla non-noksiyus stimuluslara hassas düşük eşikli nöronlardan oluşur. Ağrılı uyaranlara karşı hassas değillerdir.

Lamina V

Buradaki nöronlar hem düşük eşikli mekanoseptörlerden hem de nosiseptörlerden uyarı alabilirler ve bu sebeple "Wide-dynamic-range" (geniş dinamik alan) nöronları olarak

isimlendirilirler (22,24). Buradaki bir hücre en az iki bölgeden uyarı almaktadır. Ağrılı ve ağrısız uyaranların her ikisi de merkezdeki bölgede eksitatör özellik gösterirken, çevresel bölgeye kalın liflerle gelen ağrısız uyaranlar inhibitör özellik gösterir.

Lamina VI

Genelde proprioseptif uyarıları ileten nöronlar bulunmaktadır.

Spinal kord arka boynuzda yer alan nöronları görevlerine göre eksitatör ara nöronlar, inhibitör ara nöronlar ve santral geçiş (projeksiyon) nöronları olarak gruplandırabiliriz. İnhibitör ara nöronlar genellikle myelinli A-beta (A-β) grubu afferent liflerle uyarılır ve uyarının üst merkezlere iletilmesini inhibe ederler. Eksitatör ara nöronlar A-δ, C lifleri ile gelen uyarılarla aktive olurlar ve uyarının projeksiyon liflerine iletilmesini güçlendirirler. Projeksiyon lifleri ise uyarının üst merkezlere taşınmasıyla görevli olan nöronlardır (16-18,21,24).

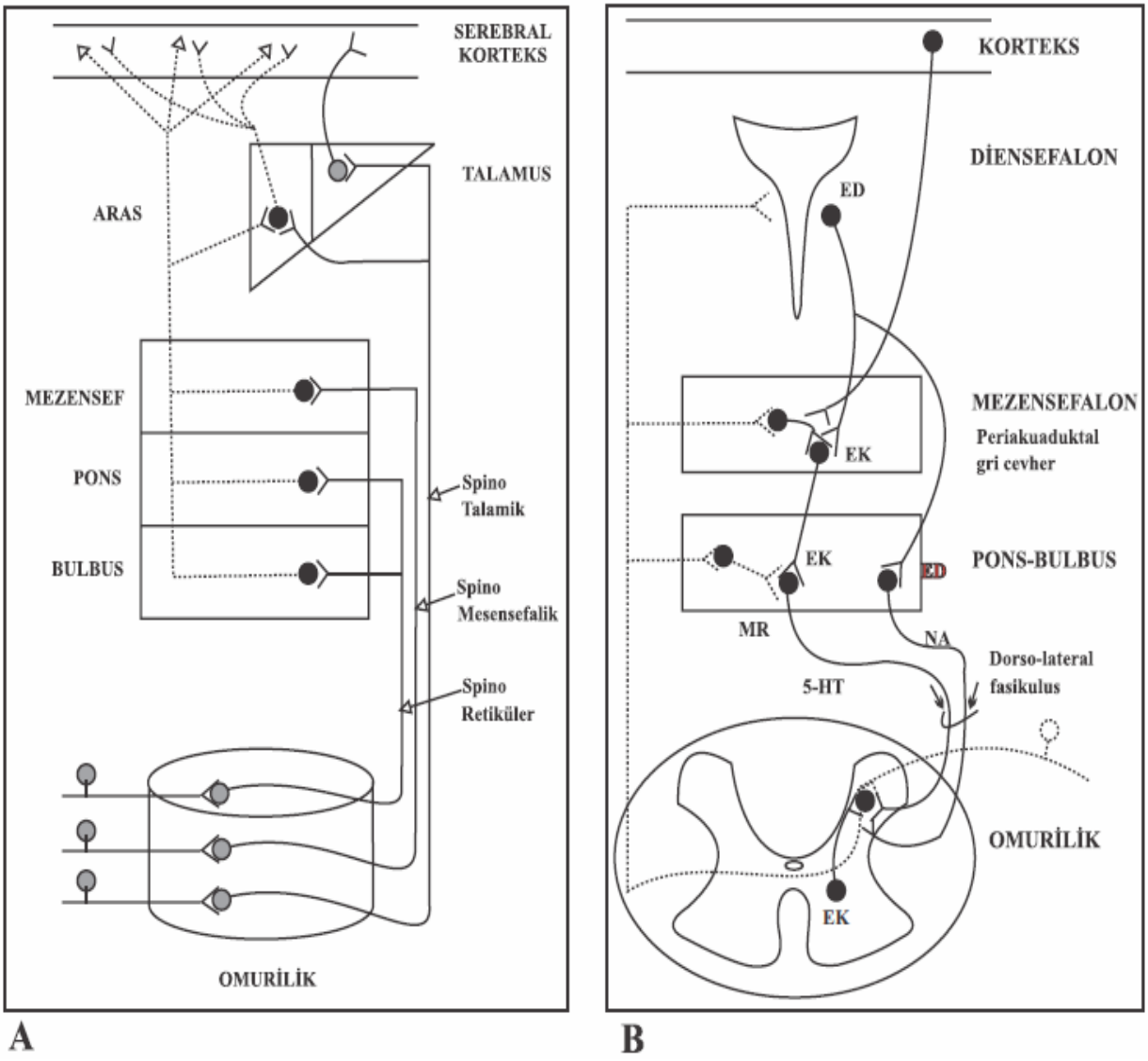
AĞRI YOLAKLARI

Ağrı yolakları, nosiseptif çıkıcı yolaklar ve antinosiseptif inici yolaklar olarak iki kısımda incelenebilir (Şekil 1).

Nosiseptif Çıkıcı Yolaklar

Spinomezensefalik yolak: Lamina I ve V'teki nöronlardan kaynağını alır. Anterolateral traktus içinde mezensefalik periakuaduktal gri cevhere kadar yükselir. Burada analjezik etkili enkefalinerjik nöronlarla bağlantılar kurar. Spinomezensefalik ve spinoretiküler yolak ön dalları birleşerek spinoretikülotalamik yolağı oluştururlar. Hipotalamus paraventriküler çekirdeklere de lifler gönderen bu yol ağrıya karşı otonomik ve hormonal yanıtlarda rol oynar (16,17).

Spinoretiküler yolak: Lamina I, V, VII'den köken alır. Karşı taraf anterolateral kadranda yükselir. Bulbus ve ponstaki retiküler formasyonda spinotalamik yolak nöronlarının bir kısmı ile birlikte sonlanır. Talamus interlaminar çekirdeklere, amigdalaya, singulat girusun ön parçası, hipotalamusa bilgiler aktarılır. Korteksin ve subkortikal yapıların zararlı etkenlere karşı uyanık tutulmasında rol oynar (24).



Şekil 1. A-Nosiseptif çıkıcı, B-Antinosiseptif inici ağrı yolakları (22)

Spinotalamik yolak: Lamina I, V, VII ve VIII nöronlarından köken alır. Aksonların çoğu anterior komisuradan geçerek karşı tarafta anterolateral kadranda yukarıya çıkar. Talamusa yaklaşımı sırasında lateral ve mediyal olarak iki kısma ayrılır.

Lateral spinotalamik yolak aksonlarının kökeni, nosiseptif lamina I ve lamina V'ten kaynaklanır. Lateral talamus ile sinaps yaparlar ve uyarının yerinin ve şiddetinin algılanmasında rol oynarlar.

Mediyal spinotalamik yolak aksonları kaynağını lamina VII, VIII'den alırlar. Bu aksonlar mediyal talamus, retiküler formasyon ve periakuaduktal gri maddeye uzanırlar. Ağrıya karşı genel uyanıklılık ve otonomik reflekslerden sorumludurlar (16,17).

Antinosiseptif İnici Yolaklar

Mezensefalik periakuaduktal gri cevherde yer alan enkefalinerjik nöronlar: Serebral korteks, diensefalon ve hipotalamusla bağlantılar içerir. Bu enkefalinerjik nöronlar bulbusta nukleus rafe magnus ve nükleus retikülaris gigantosellülaris'te bulunan serotoninerjik nöronları eksite eder. Dorsolateral fasikülüs içinde aşağıya inen serotoninerjik bu nöronlar da dorsal boynuz nosiseptif projeksiyon nöronları üzerine presinaptik ve postsinaptik inhibisyon yaparlar.

Retiküler formasyonun baz çekirdeklerinden başlayıp, omurilik arka boynuzunda sonlanan noradrenerjik nöronlar: Bu yolların başlangıcındaki opioid reseptörlerinin uyarılması ile supraspinal analjezi elde edilir.

Antinosiseptif spinal segment mekanizmaları: Üçüncü analjezi grubunu oluşturur. Enkefalin ve dinorfin içeren bu nöronlar hem C lifleri hem de A-δ liflerinden gelen uyarılarla aktive olurlar. Aktive olan bu nöronlar, presinaptik ve postsinaptik olarak projeksiyon nöronunun uyarılmasını inhibe ederler. Ayrıca spinal enkefalinerjik bu nöronlar serotonin ve noradrenalin (NA) taşıyan inici inhibitör nöronları aktive ederek projeksiyon lifleri üzerine inhibitör etki gösterirler.

ROSTRAL MERKEZLER VE AĞRI İLETİMİ

Retiküler Formasyon

Spinal korddan talamus, subtalamus, hipotalamus, pons, bulbusa uzanan derin yerleşimli nöronlar ve lifleri tarafından oluşturulur. Motor, otonomik ve sensoryal düzenlemede görev alır. Ağrıya motor ve otonomik yanıtların verilmesinde rol oynar (16).

Talamus: Ağrı iletiminde rol alan talamik çekirdekler spesifik ve non-spesifik olarak iki gruba ayrılırlar. Spesifik merkez olan ventrobazal kompleks, ventralis posterior medialis (VPM) ve ventralis posterior lateralis (VPL) olarak iki kısımdan oluşur. VPM nervus trigeminustan gelen ağrılı uyaranları alırken, VPL ise spinotalamik yolak yoluyla çıkan uyarıları alır. Non-spesifik çekirdekler ağrılı ve ağrısız uyarılara cevap veren WDR nöronları içerirler (25).

Limbik Sistem: Area subkallosa, girus singuli, parohipokampalis, formasyo hipokampi, korpus amigdaloideum, korpus mamilare ve nuklei anteriores talamiyi içeren bir sistemdir. Esas olarak ağrıya otonomik sistem yanıtlarında görev alır (16).

Korteks: Birden fazla kortikal alanın ağrı algılamasında rol oynadığı korteksin ağrıyla ilgili bölümleri şu şekilde sınıflandırılabilir:

- Primer somatosensoriyal merkezin 1 ve 2. alanları.
- Frontal lob 9-12. alanlar.
- Posterior parietal bölgeler.
- Bu merkezleri bağlayan assosiyasyon lifleri.

Posterior parietal bölgeler ve frontal lobun 9-12. alanları ağrının sembolizasyonu ile postsentral girus ise ağrının diskriminatif boyutu ile ilgilidir.

AĞRI SINIFLAMASI

Bir bütünlüğü oluşturabilmek amacıyla IASP'nin taksonomi alt birimi ağrıyı beş eksende sınıflandırmıştır:

I. Eksen

Ağrının yer aldığı vücut bölgesini tanımlar. Bu eksende bölgeler 000, 100, 200,..., 800 olarak kodlanmıştır (ör. baş, yüz ve ağız bölgesi 000, alt ekstremite bölgesi 600).

II. Eksen

Ağrının etkilediği sistemleri ele alır. II. Eksen'de sistemler 00, 10, 20,…, 80 olarak kodlanmıştır (ör. solunum ve kardiyovasküler sistem 20).

III. Eksen

Ağrının geçici özellikleri ve oluşum sürecini ele alır. III. Eksen'de ağrının geçici özellikleri 0'dan 9'a kadar kodlanmıştır (ör. sürekli 2, paroksismal 6).

IV. Eksen

Hastanın ifadesine göre ağrının şiddet değerlendirmesi ve başlangıcından beri geçen zaman ele alınır. IV. Eksen 0'dan 9'a kadar kodlanmıştır (ör. 1 ay veya daha kısa süreli hafif ağrı 1, şiddetli ve 6 aydan uzun ağrı 9).

V. Eksen

Bu eksende ağrının etiyolojisi ele alınmıştır. V. Eksen'de etiyoloji 00, 01, 02,…., 09 olarak kodlanmıştır (ör. Neoplazmlar 04, travma, operasyon, yanık 01).

Eksen sınıflandırması dışında daha basit olan ağrı sınıflandırmaları da mevcuttur. Raj tarafından yapılan sınıflama oldukça basit ve kolay anlaşılır durmaktadır (26). Raj'a göre ağrı 4 başlık altında tanımlanabilir:

Nörofizyolojik Mekanizmaya Göre

a) Nosiseptif, b) Somatik, c) Viseral, d) Nöropatik, e) Psikojenik

Süreye Göre

a) Akut, b) Kronik

Etiyolojiye Göre

a) Kanser, b) Postherpetik nevralji, c) Artrit ağrısı

Bölgeye Göre

a) Baş ağrısı, b) Yüz ağrısı, c) Bel ağrısı, d) Pelvik ağrı

Nosiseptif Ağrı

Sinir sistemi dışında tüm doku ve organlarda bulunan nosiseptörlerin uyarılması ve bu uyarının üst merkezlere iletilerek uygun cevabın verildiği ağrı türüdür. Nosiseptif sınıflama somatik ve viseral olarak iki gruba ayrılabilir. Somatik ağrı yüzeyel veya derin olabilir (21). Yüzeyel somatik ağrı iyi lokalize edilen, keskin, batıcı, zonklayıcı, yanıcı özelliktedir (17). Derin somatik ağrı künt, sızlama tarzında bir ağrıdır ve iyi lokalize edilemez. Viseral ağrı iç organlardan kaynaklanır. Yaygın, lokalize edilemeyen yansıyan tipte olabilir (16). Somatik ağrılar duyusal liflerle taşınırken viseral ağrılar ise sempatik lifler aracılığıyla taşınırlar (21).

Nöropatik Ağrı

Non-nosiseptif nitelikte bir ağrı olarak kabul edilir. Santral sinir sisteminde nosiseptörler bulunmaz. Nöropatik ağrı, sinir liflerinin yapısında veya metabolizmasındaki anormallikler sonucunda ortaya çıkar (21,27). Hücre hasarlanınca veya metobolizması bozulunca anormal uyarılar ortaya çıkarabilir ya da diğer liflerle konverjans yapabilir.

Genellikle yanıcı tarzda bir ağrıdır. Periferik veya santral sinir sistemindeki sinir hasarlanmalarına bağlıdır ve bu lokalizasyona göre de periferik ve santral olarak sınıflandırılır. İnme sonrası ağrılar merkezi nöropatik ağrıya; postherpetik nevralji, diyabette görülen nöropati, fantom ekstremite ağrısı ise periferik nöropatik ağrıya örnek verilebilir (17).

Akut Ağrı

Hemen daima nosiseptif karakterdedir. Neden olan etkenle ağrı arasında yer, zaman, şiddet bakımından ilişki vardır. Organizmayı korumaya, hasarı lokalize edip sınırlandırmaya yöneliktir. Lezyonun derecesine bağlı olarak stres, anksiyete, nöroendokrin sistem aktivasyonu gibi istenmeyen afektif yanıtlara sebebiyet verebilir. Akut ağrı 3-6 ay içinde düzelmezse kronik ağrı özellikleri göstermeye başlar (16,17,21).

Kronik Ağrı

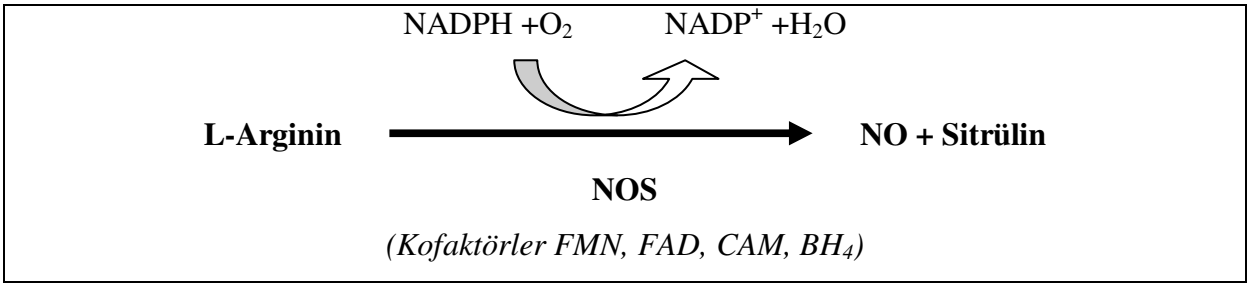
Genel olarak makul bir iyileşme sürecinde düzelmeyen ve 3-6 ayı bulan ağrılar kronik ağrı sınıflamasına alınabilir. Kronik ağrı nosiseptif, nöropatik veya her iki ağrının birlikteliğiyle olabilir (16).

NİTRİK OKSİT

Furchgott ve Zawadski (28) 1980 yılında, izole tavşan aortasında asetilkoline bağlı gevşemenin, ancak sağlam endotel hücrelerinin varlığında gerçekleşebileceğini gösterdiler ve endotelden salınan ve düz kasların gevşemesine neden olan bu maddeyi endotel bağımlı gevşetici faktör "EDRF: Endotel Derived Relaxing Factor" olarak adlandırdılar. 1986-87 yıllarında Palmar ve diğer bir araştırıcı Ignarro birbirlerinden bağımsız olarak EDRF'nin NO olabileceğini iddia etmişlerdir (29,30). Palmar ve ark. (31) tarafından 1987 yılında NO'nun L-arginin aminoasidinden sentezlendiği gösterilmiştir.

Nitrik oksit, NOS enzimi tarafından L-arginin'den üretilir. NOS'un katalizlediği bu reaksiyonda kofaktör olarak flavin mononükleotit (FMN), flavin adenin dinükleotit (FAD), kalmodulin (CAM), tetrahidrobiopterin (BH_4), kosubstrat olarak ise nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve oksijenin ortamda bulunması gerekmektedir (Şekil 2).

Nitrik oksit renksiz bir gaz olup oksijen ile oldukça hızlı reaksiyona girebilir. Hava ile temas olduğunda hızla nitrojen dioksit (NO_2) adı verilen ve toksik olan bir moleküle çevrilir. NO'nun yarılanma ömrü 3-5 saniyedir. NO, hem içeren proteinlerle reaksiyona girerek daha stabil olan nitrata (NO_3^-) dönüştürülür ve idrarla atılır (32).



Şekil 2. Nitrik oksit sentezi

BH_4: Tetrahidrobiopterin**; CAM:** Kalmodulin**; FAD:** Flavin adenin dinükleotit**; FMN:** Flavin mononükleotit**; NADP:** Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside)**; NADPH:** Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte)**; NOS:** Nitrik oksit sentaz.

Lipid membranlardan kolayca geçerek demir veya sülfür içeren proteinlere bağlanır (33). Özellikle guanilat siklaz enziminin hem grubuna bağlanarak enzimi aktif hale getirir. Bu enzim guanozin trifosfatı (GTP) siklik guanozin monofosfata (cGMP) dönüştürür. Oluşan cGMP hücre içi kalsiyum miktarını düşürerek düz kaslarda gevşeme oluşturur.

Nitrik oksit sentaz enziminin üç farklı izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlar sentezlendikleri yere ve sentezlerinin başlama şekline göre nNOS (Tip 1), iNOS (Tip 2) ve eNOS (Tip 3) olarak adlandırılırlar. nNOS ve eNOS az miktarda fakat sürekli kalsiyum bağımlı olarak üretilirken, iNOS özgül sitokinlerin indüklemesi sonucunda kalsiyumdan bağımsız olarak büyük miktarlarda üretilir. Bu nedenle nNOS ve eNOS'un ikisi birden konstitutif NOS (cNOS, yapısal NOS) olarak da adlandırılırlar (34). Tablo 1'de NOS izoenzimlerinin sınıflandırılması ve kendilerine özgü genlerin bulunduğu kromozomlar görülmektedir.

Tablo 1. Nitrik oksit sentaz izoformları (34)

NOS İzoform	Diğer adı	Salınım	Kaynak	Regülasyon	NO	Kromozom
Tip 1	nNOS	Devamlı	Sinir hücreleri	Ca^{++}'a bağımlı	Düşük	12
Tip 2	iNOS	İndüklen-diğinde	Makrofaj, damar düz kası, damar endoteli, miyokard, endokard, immun hücreler, hepatosit	Sitokinler, endotoksin ve oksidanlarla indüklenme	Yüksek	17
Tip 3	eNOS	Devamlı	Vasküler endotel hücreleri, trombositler, miyokard, endokard, mast hücreleri, nötrofiller	Ca^{++}'a bağımlı	Yüksek	7

NOS: Nitrik oksit sentaz**; eNOS:** Endotelyal nitrik oksit sentaz**; iNOS:** İndüklenebilir nitrik oksit sentaz**; nNOS:** Nöronal nitrik oksit sentaz..

Fizyolojik Etkileri

Damar endotelinden salgılanan NO'nun damar düz kasını gevşettiği gözlemlenmiştir. Kronik böbrek hastalarında endojen NOS inhibitörü dimetilarginin türevlerinin arttığı ve NO sentezini engelleyerek hipertansiyona sebebiyet verdiği gözlemlenmiştir (35). Endotelden salınan NO trombosit adezyon ve agregasyonunu, lökositlerin adezyonunu ve düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ederek aterogeneze karşı koruyucu rol oynar (33,36).

Hayvan deneylerinde NO sentezinin engellenmesinin öğrenme yeteneğini azalttığı ve NO'nun bellek oluşturmada rol oynadığı düşünülmektedir (33). NO'nun periferik liflerde iletici ve düzenleyici rollerinin olduğu düşünülmektedir (37). NO, düşük konsantrasyonlarında enfeksiyon ajanlarına karşı sinir sisteminde koruyucu bir rol oynar, yüksek konsantrasyonlara ulaştığında ise nörotoksik etki gösterir (33,38). NO'nun bu nörotoksik etkilerinin, nörodejeneratif hastalıkların oluşumunda rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Gastrointestinal sistemin mezenterik pleksustaki nöronlarında NOS enzimi bulunmaktadır (39). NO midede ve gastrointestinal sistem sfinkterlerinde gevşeme yapmaktadır (40). Sıçanlarda NOS aktivitesi engellendiğinde insanlardaki pilor stenozuna benzer bir durum oluşturulabildiği gözlemlenmiştir.

Böbrek kan akımının devamlılığı ve glomerüler filtrasyonunun oluşmasında NO önemli rol oynar (41). NO'nun penis ve klitoris ereksiyonunda görev alan önemli bir mediyatör olduğu saptanmıştır. Erektil impotans tedavisinde de kullanılmaktadır (42).

Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörleri

L-arginin yapısal analogu olan NOS inhibitörleri: L-NMMA (monometil-L-arginin), L-NA (nitro-L-arginin), L-NAME (nitro-L-arginin metilester), ADMA (asimetrik dimetil arginin).

L-arginin analogu olmayan NOS inhibitörleri: 7-NI (7-nitroindazol), L-NIO (iminoetil-I-ornitin), L-N-(1-iminoetil) lizin, merkaptoetilguanidin, aminoguanidin (43).

ASİMETRİK DİMETİLARGİNİN

Metillenmiş arginin türevleri ilk olarak 1970 yılında Kakimoto ve ark. (44) tarafından insan idrarında tespit edilmiştir. 1992 yılında Vallence ve ark. (45) insan idrar ve plazmasında ADMA molekülünü izole ettiler. ADMA, tüm NOS izoformlarının yarışmalı inhibitörüdür (46).

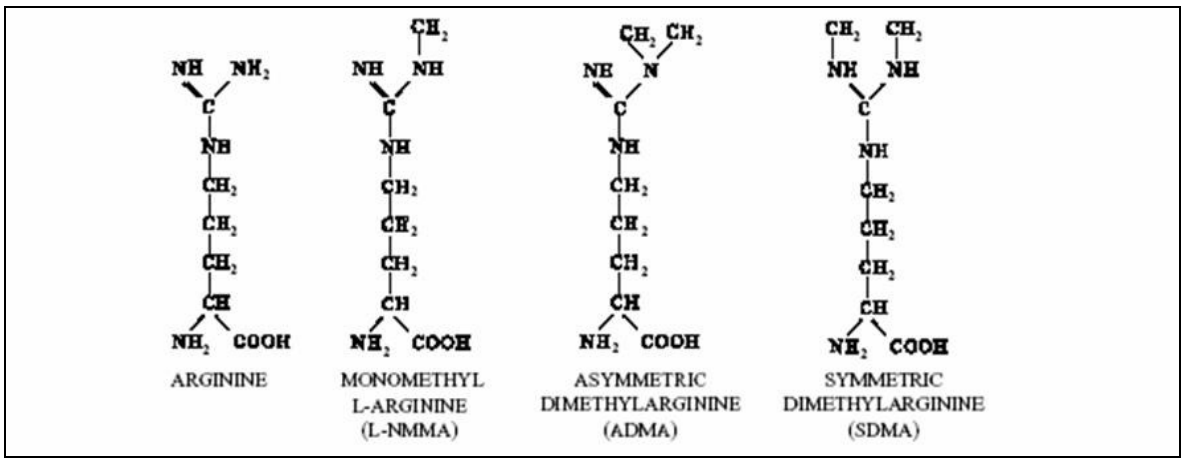
Asimetrik dimetilarginin'den başka, proteinlerdeki argininin metilenmesiyle oluşan SDMA ve monometil-L-arginin (L-NMMA) adında iki madde daha bulunmuştur. L-NMMA da tıpkı ADMA gibi NOS enzimini endojen olarak inaktive eder. Fakat L-NMMA'nın konsantrasyonu çoğu dokuda ADMA ile karşılaştırılamayacak derecede düşüktür (47).

Simetrik dimetilarginin'nin konsantrasyonu ADMA ile mukayese edilebilecek kadar yüksek olmakla birlikte SDMA, NOS inhibisyonu yapmamaktadır. Fakat yüksek konsantrasyonlarda SDMA hücre içine girişte arginin ile yarışarak indirekt olarak NO miktarını düşürebilir (48-50).

Sentez ve Metobolizması

Translasyon sırasında proteinlerin yapısına giren arginin, postranslasyonel modifikasyonla metillenebilir ve metillenmiş çeşitli arginin türleri (ADMA, SDMA, L-NMMA) oluşabilir (Şekil 3). Bu metillenme protein arginin metil transferaz (PRMT) enzimi aracılığıyla gerçekleşir (51). Bu enzim metil grubunu S-adenozil-metiyonin'den (SAM) alır ve proteinin yapısındaki arginine aktarır.

Metillenmiş bu arginin türevleri yapısında bulunduğu proteinin parçalanması (proteolizi) sonucunda serbest kalır. Arginin hangi uçlarından metillendiyse ona göre proteoliz sonucu ADMA, SDMA, L-NMMA'dan birisi ortaya çıkar.



Şekil 3. Metilenmiş arginin türevleri

Proteinlerde metillenmeyi gerçekleştiren PRMT enziminin iki tipi belirlenmiştir:

- PRMT 1 enzimi histonları ve nükleer RNA bağımlı proteinleri metiller ve proteinlerin proteolizi sonucunda ADMA ve L-NMMA ortaya çıkar.

•PRMT 2 enzimi yalnızca "myelin basic protein"i metiller ve L-NMMA ve SDMA ortaya çıkarır; ADMA oluşturmaz.

Son yıllarda PRMT1 ve PRMT 2 enzimlerinin birçok izoformunun bulunduğu gösterilmiştir (52).

Metil arginin türevleri oluştukları zaman artık organizmada demetillenemezler ve proteinlerin yapısına giremezler. Günde 300 μmol ADMA oluşmaktadır; 250 μmol'u dimetilarginin dimetil-aminohidrolaz (DDAH) enzimi tarafından sitrülin ve dimetilamin'e dönüştürülmekte (52,53), kalan 50 μmol'u böbreklerden değişmeden atılmaktadır.

Dimetilarginin dimetil-aminohidrolaz (DDAH) enziminin de iki izoformu bulumaktadır:

•DDAH 1 esas olarak nNOS bulunan dokularda sentezlenmektedir.

•DDAH 2 ise daha çok eNOS ya da iNOS enzimini içeren dokularda sentezlenmektedir.

Asimetrik dimetilarginin tüm NOS izoformlarının yarışmalı inhibitörüdür ve yüksek arginin konsantrasyonlarında bu etkisi azalır. NOS enzimi NO sentezinden başka superoksid radikali (O^{2-}) oluşturabilir. Bu olay "NOS uncoupling" olarak adlandırılır. Substrat olan arginin ve kofaktör olan tetrahidrobiopterin eksikliğinde enzim bu yola kayar. ADMA ve L-NMMA, arginin ile yarışarak "NOS uncoupling" olayına ve oksidatif strese neden olabilirler.

Asimetrik dimetilarginin düzeyinin artmasında dört mekanizma rol oynayabilir.

1. Proteinlerin PRMT ile metilasyonunda artma,
2. Proteinlerin proteolizinde artmaya bağlı olarak metillenmiş türevlerin ortaya çıkışında artış,
3. Renal atılımın bozulması,
4. Metillenmiş türevlerin DDAH enzimi ile metabolizmasının azalması.

Shear stresin PRMT ekspresyonunu ve aktivitesini artırdığı ve endotel hücrelerinde transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa-B'yi aktive ederek ADMA üretimini stimüle ettiği bilinmektedir (54).

Düşük dansiteli lipoprotein (DDL) artışı PRMT aktivitesini artırmaktadır (55). Protein sentezinin fazla olduğu üreyen hücrelerde ADMA konsantrasyonu, durağan hücrelere göre daha fazladır. Anti-DNA antikorları, protein metilasyonunu stimüle etmektedir ve belki de SLE hastalarında artmış metil argininlerin sebebidir. Hipertiroidizm, endotoksemi, musküler distrofi gibi artmış katabolik durumlarda ADMA artışının sebebi protein proteolizinin artması olabilir. Bozulmuş üriner atılım metil argininlerin böbrek hastalarında, septik şokta, hemorajik şokta

yükselmesinin bir sebebidir. Karaciğer hastalarında bozulmuş DDAH metobolizması ADMA artışının ana sebebi gibi durmaktadır (56).

Asimetrik Dimetilarginin ve Hastalıklar

Hipertansif hastaların plazmalarında yapılan ölçümlerde artmış ADMA ve azalmış NO düzeyleri saptanmıştır (57). Sağlıklı gönüllülere düşük miktarda intravenöz ADMA verilerek yapılan bir çalışmada ise kardiyak debi ve kan basıncında artma, kalp hızında azalma saptanmıştır (58).

İnsülin bağımlı, bağımsız ve gestasyonel diyabette ADMA'nın arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (59-61). DDAH aktivitesinin, glukozun neden olduğu oksidatif stres artışı sonucunda azalabileceği yönünde çalışmalar bulunmaktadır (62).

Hiperkolesterolemili hastalarda ADMA düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur (63). Bu artışın sebebi olarak native ve okside DDL kolestrolün PRMT aktivitesini modüle etmesi gösterilmektedir (55). Eid ve ark. (64) yaptıkları çalışmada obez bireylerde ADMA miktarının yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Morbid obez hastalarla yapılan bir çalışmada ise gastrik bant operasyonu yapıldıktan sonra ADMA düzeylerinde kilo kaybıyla paralel düşüş saptanmıştır (65).

Cross ve ark. (66) hemodiyalize devam eden küçük bir hasta grubunda, metilargininlerin (ADMA ve SDMA) artmış plazma konsantrasyonlarını bildirmişlerdir. Son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda görülen yüksek hipertansiyon ve ateroskleroz insidansının, kısmen azalan renal ekskresyon nedeniyle oluşan ADMA birikimine sekonder L-arginin/NO yolağı disfonksiyonu sonucu ortaya çıkabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (67).

MORFİN

Opioid analjezikler grubunda incelenen bir ilaçtır. Opioid terimi, *opium* (afyon)'dan gelir (18). Haşhaş bitkisinin kabuğunun çizilmesiyle elde edilen özüte (halk arasında afyon sakızına) *opium* (afyon) denilir.

Afyon içinde çok sayıda alkoloid bulunur. Bunlar kimyasal yapı bakımından iki ana grupta toplanabilir:

a) Fenantren türevleri: Morfin (%8-14), kodein (%0,5), tebain (%0,2),

b) Benzilizokinolein türevleri: Papaverin (%1), noskapin (%6) ve narsein. Bu grup ilaçların belirgin analjezik etkisi olmadığından opioid analjezikler grubuna girmezler (68).

Opioid analjezikler elde edildikleri kaynaklara göre de doğal, yarı sentetik, sentetik olmak üzere üç gruba ayrılırlar (68).

Morfin doğal bir opioid analjeziktir. Morfin teriminin kökeni "morpheus"dan (uyku tanrısı) gelmektedir. Morfin hidroklorür veya sülfat tuzu şeklinde kullanılır (18,68).

Farmakokinetiği

Morfin oral yoldan alındığında tam olarak emilir. Fakat karaciğerden ilk geçişte önemli oranda ve kişisel farklılıklar göstererek eliminasyona uğradığı için daha çok intravenöz, intramüsküler, ciltaltı yollarından injeksiyonla uygulanır (18). Bu yollardan uygulandığında analjezik etkisi 20 dakikada başlar ve ortalama 45-90 dakikada maksimuma erişir. %25-35 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Morfin, karaciğerde hidroksil grupları glüküronatlanarak polar metobolitlere dönüştürülür ve böbrekler yoluyla elimine olur. Safra yoluyla atılım az miktarda olup yaklaşık %10 civarındadır. Plazma yarılanma ömrü ortalama 3 saat kadardır (18,68).

Farmakolojik Etkileri

a) Analjezik etki: Morfin bilinç kaybına yol açmadan analjezi sağlar (69). Morfin ağrı algılama eşiğini yükseltir, ağrı duyusunu modüle eder (ağrıyı algılamalarına rağmen bundan rahatsızlık duymamaları), ağrıya karşı olan reaksiyonları azaltır (68). Morfin künt ve devamlı ağrılara daha etkili olmakla birlikte yeterli dozda verilirse batıcı ve intermitant ağrılara da oldukça etkilidir.

b) Öfori: Morfin hastalarda iyilik ve hoşnutluk hali oluştururken, bağımlı olmayan sağlıklı kişilerde genellikle disfori ortaya çıkarır.

c) Solunum sistemi üzerine etkileri: Morfin solunum merkezinin karbondioksite olan duyarlılığını doz bağımlı olarak azaltır. Bu durumda solunum merkezi, hipoksi sonucu stimüle olan kemoreseptörlerden gelen uyarılarla çalışır. Zehirlenme durumunda, doğrudan oksijen inhalasyonu yaptırılırsa hipoksi azalır ve solunum durabilir (oksijen apnesi). Morfin zehirlenmesinde yardımcı cihazlar olmadan doğrudan böyle bir uygulamadan kaçınmak gereklidir (18).

d) Öksürük reflekslerinin baskılanması: Morfin bulbustaki öksürük merkezini deprese ederek antitusif etki oluşturur (69).

e) Miyozis: Morfin Edinger-Westfal çekirdeğini uyararak parasempatik uyarıları artırır ve gözde miyozise (toplu iğne başı pupil) sebebiyet verir. Bu etkiye çok az tolerans gelişir. Zehirlenme tanısında kullanılır (69).

f) Emezis: Morfin kusma merkezini doğrudan uyararak emezise neden olur.

g) Gastrointestinal sistem üzerine etkileri: Morfin mide, ince ve kalın barsaklarda tonusu artırmakla birlikte itici peristaltik hareketleri azaltarak konstipasyona sebebiyet verir. Anal sfinkteri ve Oddi sfinkterinin tonusunu arttırır. Safra koliği yapar (18).

h) Kardiyovasküler sistem üzerine etkileri: Morfin yüksek dozlarda hipotansiyon ve bradikardi ortaya çıkarabilir.

Morfine Tolerans ve Bağımlılık

Morfin toleransı metabolizmasının artmasına bağlı biyokimyasal bir tolerans değil, reseptör duyarlılığının ve sayısının azalmasına bağlı farmakodinamik bir toleranstır (18). Morfinin etkilerine karşı gelişen tolerans değişiklik göstermektedir. Analjezik, sedatif, antidiüretik, antitussif, solunumu deprese edici, öfori-disföri, bulantı-kusma yapıcı etkilerine karşı ileri derecede, bradikardik etkisine orta derecede tolerans gelişirken, miyozis, kabızlık, konvülsiyon yapıcı etkilerine karşı ise hemen hemen hiç tolerans gelişmez.

Morfinin aniden kesilmesi bağımlılarda 8-12 saat sonra başlayan yoksunluk (abstinens) belirtilerine yol açar. Önce lakrimasyon, terleme ve esneme gibi ıslak belirtiler ortaya çıkar. Sonra irritabilite, tremor, midriyazis, taşikardi, kan basıncında artma, ciltte kaz derisi görünüşü, diyare, bulantı-kusma, erkekte ejekülasyon ve kadında orgazm benzeri belirtiler ortaya çıkar (18). Morfin bağımlılarına nalokson verilirse yoksunluk belirtileri çok daha hızlı 1-2 dk ortaya çıkar, fakat oldukça kısa (ortalama 30 dk) sürer.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma; IASP Etik Komitesi kurallarına uygun olarak düzenlenmiş olup, yerel etik kurul onayı alındıktan sonra (Ek 1) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Ek 2).

DENEKLER

Çalışmamızda, yaklaşık 20-30 g ağırlığında, 8-10 haftalık, 80 adet Balb-C erkek fare kullanıldı. Deneylerimizde kullanılan fareler, T.Ü. Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edildi ve daha sonra tüm deneyler boyunca Anabilim Dalımız Hayvan Laboratuvarı'nda standart koşullar altında barındırıldı. Beslenmeleri için standart fare yemi ve musluk suyu serbestçe verildi.

İLAÇLAR

Nalokson HCl (RBI, Natick, MA 01760 USA),

Morfin HCl 0,02 g/1 mL (Galen İlaç San. ve Tic. AŞ, İstanbul/TÜRKİYE),

Serum Fizyolojik %0,9 10 mL ampül (Galen İlaç San. ve Tic. AŞ, İstanbul/TÜRKİYE).

TAİL FLİCK TESTİ

Tail Flick testi ilk kez D'Amour ve Smith (70) tarafından 1941 yılında tanımlanmış olmasına rağmen hala en sık kullanılan nosisepsiyon ve analjezi değerlendirme testlerindendir. Antinosiseptif etkinin ölçümünde tail flick cihazı (MAY-9604, COMMAT, Ankara, Türkiye) kullanıldı. Bu testte, farelerin kuyruklarının dorsal yüzeyine sabit şiddette radyan ısı uygulandı

ve deneklerin kuyruklarını aniden çekene kadar geçen süre saptandı. Hayvan kuyruğunu çektiğinde ısı uygulanımı otomatik olarak sonlanmakta ve hayvanın kuyruğunu çektiği andaki değer cihaz tarafından kaydedilmektedir. Farelerin kuyruklarına uygulanacak olan radyan ısının şiddeti ortalama 2-4 sn olacak şiddete önceden ayarlandı. Doku zedelenmesini önlemek için "cut-off" değeri 10 sn olarak belirlenmiş olup, bu süre içinde teste yanıt vermeyen hayvanlar cihazdan alındılar. İlaç uygulamalarından önce, farelerin bazal değerini saptamak için her farede 3-4 kez ölçüm yapıldı. Morfin analjezisi injeksiyonundan 30 dk sonra ölçüm yapılarak değerlendirildi.

Antinosiseptif etkinin göstergesi olarak değerlendirilecek olan maksimal etki (ME) yüzdesi şu formüle göre hesaplandı:

%ME = [(test süresi - kontrol değeri) / (cut-off süresi - kontrol değeri)] x 100

HOT PLATE TESTİ

İlk kez Woolfe ve McDonald tarafından 1944 yılında tanımlanan bu metodun Eddy ve Leimbach tarafından tanımlanan modifiye şekli daha sık kullanılmaktadır (71,72). Bu metotta, deneklerin sıcaklığı 55 °C olan pleksiglas silindirik bir yüzeye bırakıldıktan sonra arka pençelerini yaladıkları ya da sıçradıkları zamana kadar geçen sürenin ölçümü yapıldı. Doku zedelenmesini önlemek için "cut-off" değeri 45 sn olarak belirlenmiş olup, bu süre içinde teste yanıt vermeyen hayvanlar cihazdan alındılar. İlaç uygulamalarından önce, farelerin bazal değerini saptamak için her farede 3-4 kez ölçüm yapıldı. Morfin analjezisi, injeksiyonundan 30 dk sonra ölçüm yapılarak değerlendirildi.

Antinosiseptif etkinin göstergesi olarak değerlendirilecek olan ME yüzdesi şu formüle göre hesaplandı:

%ME = [(test süresi - kontrol değeri) / (cut-off süresi - kontrol değeri)] x 100

TOLERANS VE BAĞIMLILIK OLUŞTURULMASI

Tolerans oluşturmak amacıyla, farelere subkutan (s.c.) olarak günde iki kez 09:00 ve 17:00 saatlerinde 10 mg/kg morfin 9 gün boyunca ve 10. gün sabah 09:00 uygulandı (73). Tolerans gelişimi, ilk injeksiyondan itibaren 1, 3, 6, 9 ve 10. günde Tail Flick ve Hot Plate testlerinde morfinin antinosiseptif etkisindeki azalma ile gösterildi. Kontrol grubu olarak kullanılacak farelere de benzer şekilde günde iki kez s.c. olarak 09:00 ve 17:00 saatlerinde serum fizyolojik (SF) verildi. Antinosisepsiyon testlerinin tamamlanmasından ve toleransın gösterilmesinden sonra 10. günde 5 mg/kg nalokson intraperitoneal (i.p.) verilerek, fareler

bağımlılığın göstergesi olan yoksunluk sendromuna sokuldular. Nalokson uygulanmasından hemen sonra fareler belirli bir platformun (30x30x30 cm) içine bırakıldı ve 20 dk süreyle yoksunluk sendromu belirtileri olarak sıçrama sayıları ve ön pençe tremorlarının sayısı belirlendi, benzeri belirtilerin olup olmadığı gözlendi (74,75).

DENEY DÜZENİ

Tolerans ve bağımlılık gelişim sürecini değerlendirmek için dört ayrı günde kan alınacağından (3-6-9-10.gün), hayvanlar rastlantısal olarak dört ana gruba ayrıldı. Her ana grup morfin tolerans grubu ve kontrol grubu olmak üzere iki alt gruptan oluşturuldu. Her alt grup 10 hayvan içermekteydi.

Grup I (3 günlük grup): 3 gün boyunca s.c. olarak günde iki kez 10 mg/kg dozunda morfin verilen 10 hayvan ve kontrol grubu olarak ayrılan, SF verilen 10 hayvan olmak üzere toplam 20 hayvandan oluşmaktadır.

Grup II (6 günlük grup): 6 gün boyunca s.c. olarak günde iki kez 10 mg/kg dozunda morfin verilen 10 hayvan ve kontrol grubu olarak ayrılan, SF verilen 10 hayvan olmak üzere toplam 20 hayvandan oluşmaktadır.

Grup III (9 günlük grup): 9 gün boyunca s.c. olarak günde iki kez 10 mg/kg dozunda morfin verilen 10 hayvan ve kontrol grubu olarak ayrılan, SF verilen 10 hayvan olmak üzere toplam 20 hayvandan oluşmaktadır.

Grup IV (10 günlük grup): 9 gün boyunca s.c. olarak günde iki kez ve onuncu gün sabah 09:00'da 10 mg/kg dozunda morfin verilen, antinosiseptif etki ölçüldükten sonra bağımlılığı değerlendirmek için 5 mg/kg nalokson verilen ve yoksunluk belirtileri 20 dk süresince sayılan 10 morfin tolerans ve bağımlılık hayvanı ve kontrol grubu olarak ayrılan 10 hayvan olmak üzere toplam 20 hayvandan oluşmaktadır.

Plazma ADMA, SDMA, L-homoarginin ve L-arginin düzeylerini ölçmek amacıyla 3, 6, 9 ve 10. günlerde hem tolerans gelişen/gelişmekte olan hem de kontrol grubu olan hayvanlardan intrakardiyak olarak kan alındı ve dekapitasyon ile ötanazi uygulandı. Plazma ADMA, SDMA, L-homoarginin ve L-arginin düzeyleri Anabilim Dalımız laboratuvarında kromatografik yöntemle saptandı.

ARGİNİN VE METİLLENMİŞ ARGİNİN TÜRLERİNİN ÖLÇÜMÜ

L-Arginin, L-homoarginin, ADMA ve SDMA ölçümleri Teerlink tarafından (47) tariflenen metoda göre "high performance liquid chromatography" (HPLC) cihazında ölçüldü.

Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3-merkaptopropionik asit, OPA (Fluka, Almanya); amonyak, asetonitril, metanol, L-arginin, HCl, Borik asit, KH_2PO_4, KOH, NaOH (Merck&Co, Inc, Darmstadt, Almanya); asimetrik dimetilarginin, homoarginin, monometilarginin, simetrik dimetilarginin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim, Almanya).

Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Elektronik tartı (Denver Instrument APX-200, ABD), guard kolon (Waters Symmetry C18 5µm 3.9x20 mm, ABD), HPLC cihazı (Waters 2690 Alliance, Seperations Module, ABD), distile su cihazı (Millipore, France), vorteks (Nüve NM110, Türkiye), manyetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001, Almanya), pH metre (Inolab WTW pH level 1, Almanya), soğutmalı santrifüj (Hettich Micro 220R, Almanya).

Yazılım ve Ekipman

Asimetrik dimetilarginin düzeyleri Waters Alliance 2690 XE, Model 474 floresan dedektör ve Millennium 32 Software kullanılarak ölçüldü. Örneklere solid faz ekstraksiyonu (20 kolon kapasiteli vakum manifoldlu SPE, Waters) uygulandı.

Kullanılan Solüsyonlar

Arginin stok solüsyon: MA: 174,20 g, 10 mM HCl. 174 mg arginin 10 mL HCl içinde çözüldü ve 100 mM stok solüsyon elde edildi. Bu solüsyon 1:100 dilüe edilerek 1 mM'a ulaşıldı.

Homoarginin stok solüsyon: MA:224,69 g, 10 mM HCl. 225 mg homoarginin 10 mL HCl içinde çözüldü ve 100 mM stok solüsyon elde edildi. Bu solüsyon 1:100 dilüe edilerek 1 mM ulaşıldı.

Asimetrik dimetilarginin stok solüsyon: MA: 275,18 g, 10 mM HCl. 50 mg ADMA 18.17 mL HCl içinde çözüldü ve 10 mM stok solüsyon elde edildi. Bu solüsyon 10 kez dilüe edilerek 1 mM'a ulaşıldı.

Simetrik dimetilarginin stok solüsyon: MA: 758,82 g, 10 mM HCl. 25 mg SDMA 33 mL HCl içinde çözüldü ve 1 mM stok solüsyon elde edildi.

Combine working Standard: Arginin, homoarginin, ADMA ve SDMA'in 1 mM'lık stok solüsyonlarından 10 mM HCl içinde 100 µM arjinin ve 10 µM homoarjinin, ADMA ve SDMA içeren bir karışım oluşturuldu.

Monometilarginin: MA: 248,28 g, 10 mM HCl. 5 mg MMA 20,1 mL HCl içinde çözüldü, 1 mM stok solüsyon elde edildi. Bu solüsyondan 50 adet eppendorf tüpüne her birine 50 µL olacak şekilde dağıtıldı, kalanı (17,5 mL) bir tüp içinde saklandı. Her yığın çalışmada 1 eppendorf alınıp üzerine 1200 µL PBS eklenerek 40 µM final konsantrasyon elde edildi (Internal Standart).

Fosfat tampon solüsyonu: 1 mM NaH_2PO_4 + 9 mM Na_2HPO_4 + 137 mM NaCl hazırlandı. pH değeri, 1M NaOH ve HCl ile 7'ye ayarlandı.

Potasyum borat buffer: 200 mM (100 mL) olacak konsantrasyonda 50 mL borik asit içinde hazırlandı. KOH eklenerek pH 9,5'a getirildi ve 100 mL'ye tamamlandı.

Orto-ftaldialdehid stok (derivatizasyon reageni): MA: 134,13 g, MeOH. 10 mg orto-ftaldialdehid (OPA) 0,2 mL MeOH içinde çözüldü, 1,8 mL 200 mM Potasyum Borat Buffer (pH: 9,5) eklendi, daha sonra 3 µL -merkaptopropionik asit eklendi böylece 0,2 mL'de 10 mg OPA içeren stok solüsyon elde edildi.

Orto-ftaldialdehid final: OPA stok türevlendirmeden hemen önce Borat buffer ile 5 kez dilüe edildi ve böylece 7,5 mM konsantrasyonda OPA final elde edilmiş oldu. 48 saat içinde kullanıldı.

Mobil faz A: 6,8 g KH_2PO_4 980 mL suda çözüldü. KOH ile pH 6,5'e ayarlandı, filtreden süzülerek ve hacim 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan tampona 95,3 mL asetonitril eklendi ve ultrasonik banyoda 30 dakika bekletildi.

Mobil faz B: Su ve asetonitrilin hacimce yarı yarıya (50/50) karıştırılmasıyla elde edildi.

Örnek Saflaştırma ve Türevlendirme

Santrifüj (3000g x 10 dakika) ile elde edilen plazma örnekleri ve standartlara SPE uygulandı. Rutin protokol, 3 mL'lik temiz bir cam tüp içine 0,2 mL örnek (veya Standart), 0,1 mL internal standart ve 0,7 mL PBS konuldu ve vortekslendi, ön koşullama yapılmaksızın Oasis MCX SPE kolondan (vakum altında, 1 mL/dk hızla) geçirildi. Örneklerin uygulanmasından sonra kolon sırayla 0,1 mL 100 mM HCl ve 1,0 mL metanol ile yıkandı. Analitler 3,0 mL'lik tüplere, 1,0 mL konsantre amonyak/su/metanol (10/40/50) ile Oasis MCX SPE kolondan elüe edildi. Tüpteki solvent 60-80 °C'de nitrojen ile uçuruldu. Tüpe 0,1 mL KH_2PO_4 (200 mM) eklenerek tüpün içinde kalan analitler çözdürüldü. Son olarak 0,1 mL OPA reageni tüpe konularak vortekslenme işlemi tekrarlandı. 3 dakika beklendi tekrar vortekslendi ve örnek otosampler viyallere aktarılıp kompartmana yerleştirildi. Kromatografide örnek kompartmanı 7 ^{o}C'ye ayarlandı.

Kromatografi

Kromatografi Symmetry C18 kolon (3,9 x150 mm; 5 µm partikül büyüklüğü; 100 Å por büyüklüğü) ve 3,9 x 20 mm Sentry Symmetry C18 guard kolon üzerinde alındı. Mobil faz A %8,7 asetonitril içeren 50 mM potasyum fosfat tampon (pH 6,5); mobil faz B ise asetonitril/su (50/50, v/v) olacak şekilde hazırlandı, seperasyon izokratik koşullarda, %100 mobil faz A ile, 1,1 mL/dak hız ve 30 °C kolon sıcaklığı değerlerinde yapıldı. Son analitin çıkışından sonra güçlü bir şekilde ratansiyona uğrayan bileşikler güçlü solvent akımı (%50 B 20-22 dakikalar arası) ile elüe edildi. 22. ve 23. dakikalar arasında gradient başlangıç değerlerine döndürülerek kolon 7 dakika daha dengelenmeye bırakıldı; böylece toplam çalışma süresi her örnek için 30 dakika olacak şekilde ayarlandı (Tablo 2). Enjeksiyon hacmi 20 µL seçilerek, fluoresans eksitasyon ve emisyon dalgaboyları sırasıyla 340 ve 455 nm olarak ölçüldü. Elde edilen pikler, pik alanlarında göre değerlendirildi.

Tablo 2. Mobil faz gradient tablosu

Zaman (dakika)	Akış hızı (ml/dk)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	1,1	100	0
18[a]	1,1	100	0
19	1,1	50	50
22	1,1	50	50
23	1,1	100	0
30[b]	1,1	100	0
35	1,1	100	0
36	1,1	0	100
50	1,1	0	100

[a]: 18-23. dakikalar arasında güçlü solvent akışı, kalan bileşiklerin çıkarılması için**; [b]:** 30. dakikada bir sonraki enjeksiyona geçildi. Tüm analizler yapıldıktan sonra kolonu temizlemek için 30. dakikadan sonraki kısım uygulandı.

Kalibrasyon

İnternal standardın eklenmesinden sonra standartlara SPE, derivatizasyon ve kromatografi uygulanarak bunlara ait pikler alındı. Plazma örneklerinin ölçümü için 100 µM arginin ve 10 µM'lık homoarginin, ADMA, SDMA ile tek-nokta kalibrasyonu yapıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

SigmaStat for Windows Version 3.5 kullanılarak yapılan kestirim sonucu örnek büyüklüğü 9'dur, ancak deney bitiminde farelerden intrakardiyak kan alınacak olup, yaklaşık %10 oranında yeterli derecede kan alınamayan fare olacağı bilindiğinden grup başına hayvan adedi 10 (n=10) olarak belirlendi. Morfin grubunda tolerans gelişimini kontrole göre karşılaştırmak için iki yönlü varyans analizi (Two-Way ANOVA), ardından (*Post hoc*) Bonferroni t-testi uygulandı. ADMA, SDMA, L-arginin, L-homoarginin plazma düzeylerinin kontrole göre karşılaştırmaları için tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA), ardından (*Post hoc*) Bonferroni t-testi uygulandı. Bağımlılık karşılaştırmaları için Student t-testi yapıldı. ADMA, SDMA, L-arginin, L-homoarginin plazma düzeyleri ile tolerans gelişiminin aşamaları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için korelasyon ve regresyon analizi ile istatistiksel değerlendirme yapıldı. $P < 0.05$ olan değerler istatistiksel yönden anlamlı kabul edildi. Örnek büyüklüğü kestirimi dışındaki istatistiksel analizler Graphpad Prism for Mac OSX Version 5.0c kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

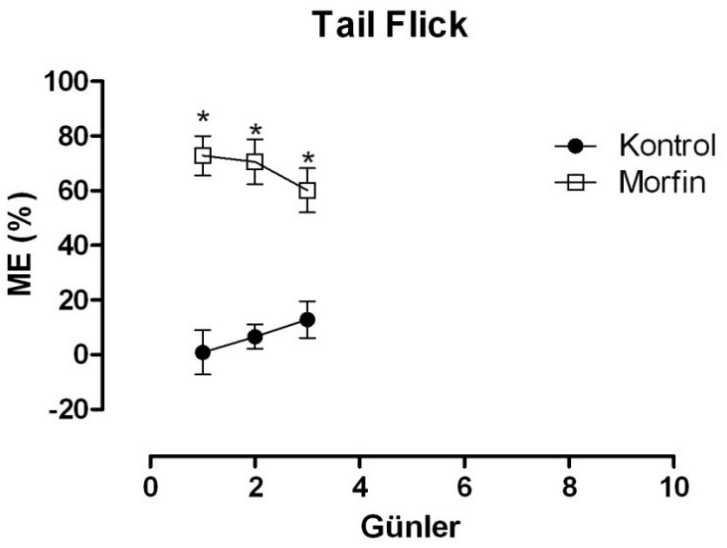
Morfinin analjezik etkisine karşı tolerans gelişmi hot plate ve tail flick testleriyle gösterilirken, morfin bağımlılığın oluştuğu, IV. Grup hayvanlara nalokson injeksiyonunu takiben ortaya çıkan çekilme sendromu bulgularının (ön pençe tremoru, sıçrama) 20 dk boyunca sayılmasıyla gösterilmiştir. Morfin tolerans ve bağımlılığının gelişiminin değişik aşamalarında farelerden intrakardiyak kan alınıp plazma ADMA düzeyi ölçülmüş ve tolerans ve bağımlılık gelişimiyle korelasyon ilişkisi değerlendirilmiştir.

MORFİNİN ANALJEZİK ETKİSİNE TOLERANS GELİŞMESİ

Morfinin analjezik etkisinde ilk günden itibaren sürekli bir azalma saptadık (Şekil 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Günde iki kez s.c. 10 mg/kg morfin uygulanması sonucunda, hot plate ve tail flick testlerinde ortalama 6-9. günlerde morfinin analjezik etkisine tam bir tolerans geliştiğini gözlemledik (Şekil 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Grup I Verileri

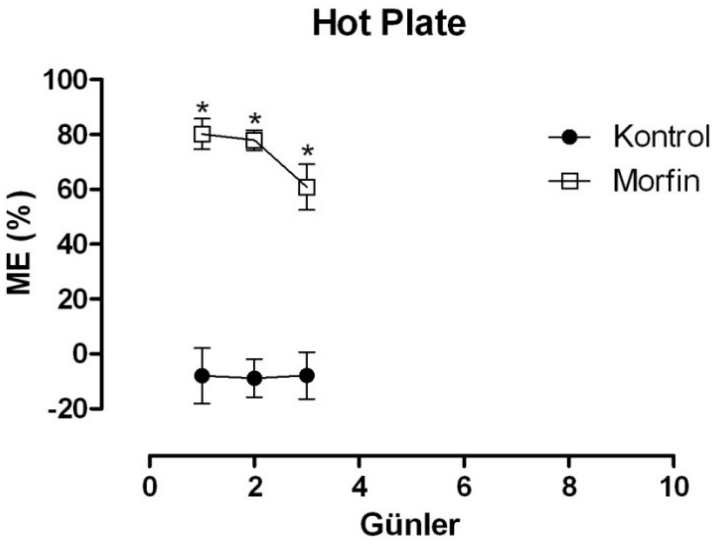
Morfinin 10 mg/kg, s.c. 2x1 uygulanmasıyla analjezik etkisinde günler ilerledikçe azalma görülmekle birlikte tam bir toleransın henüz oluşmadığı saptandı. Üçüncü günde kontrol ve morfin tolerans alt grupları arasında anlamlı farklılık olduğu görüldü (Şekil 4, 5).



Şekil 4. Grup I (3 günlük grup) morfinin analjezik etkisine tolerans gelişmesinin tail flick testinde gösterilmesi

ME: Maksimal etki.

***** p<0,05 aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.



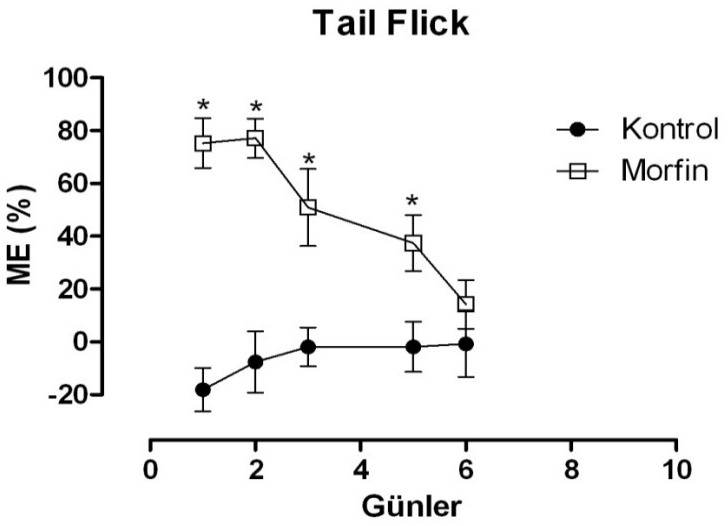
Şekil 5. Grup I (3 günlük grup) morfinin analjezik etkisine tolerans gelişmesinin hot plate testinde gösterilmesi

ME: Maksimal etki.

***** p<0,05 aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

Grup II Verileri:

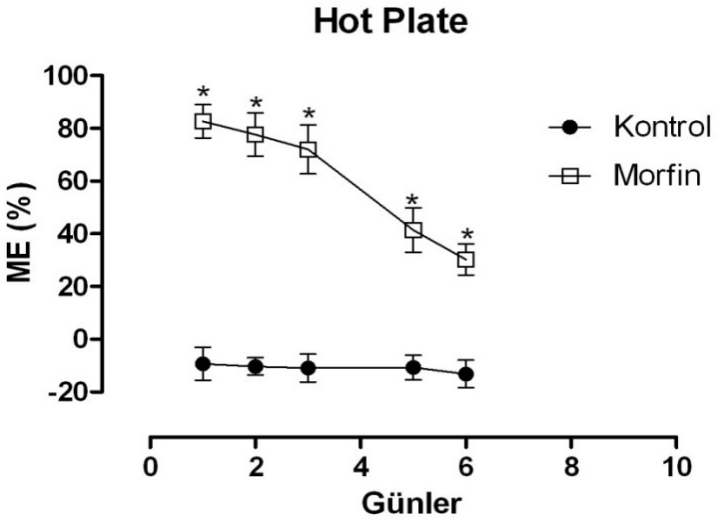
Morfinin 10 mg/kg, s.c. 2x1 uygulanmasıyla analjezik etkisine tail flick testinde 6. günde tolerans geliştiği gözlenirken, hot plate testinde toleransın henüz gelişmediği belirlendi (Şekil 6, 7).



Şekil 6. Grup II (6 günlük grup) morfinin analjezik etkisine tolerans gelişmesinin tail flick testinde gösterilmesi

ME: Maksimal etki.

***** p<0,05 aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.



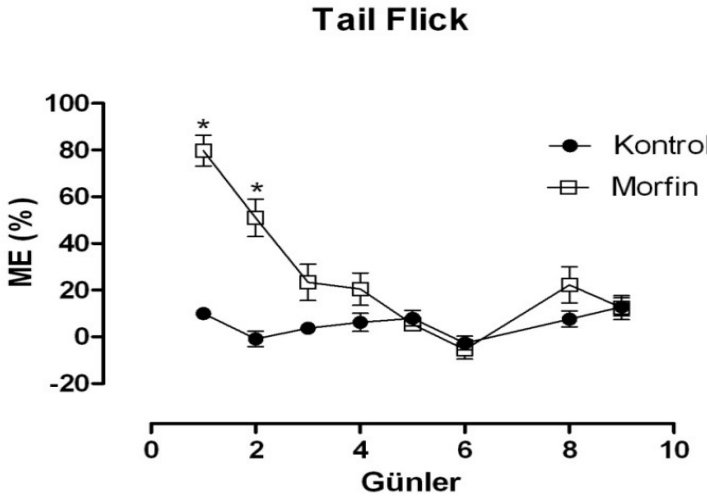
Şekil 7. Grup II (6 günlük grup) morfinin analjezik tolerans gelişmesinin hot plate testinde gösterilmesi

ME: Maksimal etki.

***** p<0,05 aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

Grup III Verileri

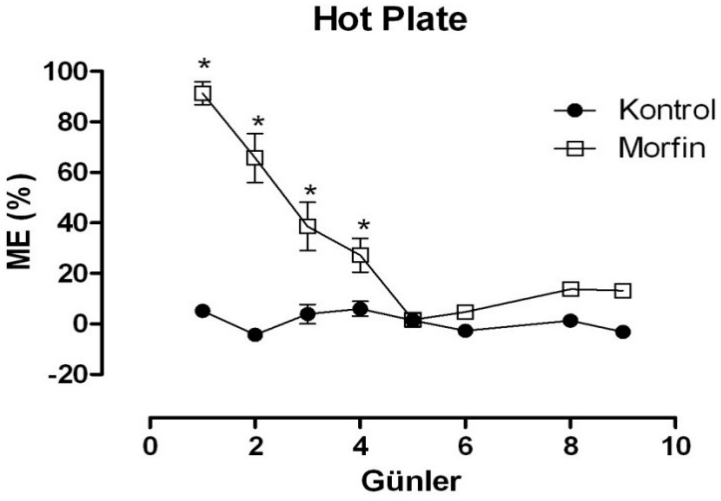
Morfinin 10 mg/kg, s.c. 2x1 uygulanmasıyla analjezik etkisine tail flick testinde 3. günde tolerans geliştiği gözlenirken, hot plate testinde 5. günde geliştiği saptandı (Şekil 8, 9). İlginç olarak üçüncü grup hayvanlarında morfinin analjezik etkisine tolerans daha erken gözlendi.



Şekil 8. Grup III (9 günlük grup) morfinin analjezik etkisine tolerans gelişmesinin tail flick testinde gösterilmesi

ME: Maksimal etki.

***** p<0,05 aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.



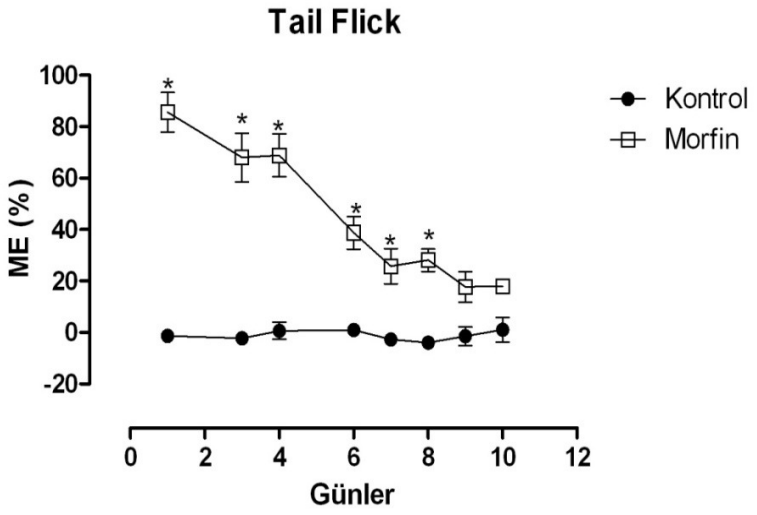
Şekil 9. Grup III (9 günlük grup) morfinin analjezik etkisine tolerans gelişmesinin hot plate testinde gösterilmesi

ME: Maksimal etki.

***** p<0,05 aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

Grup IV Verileri

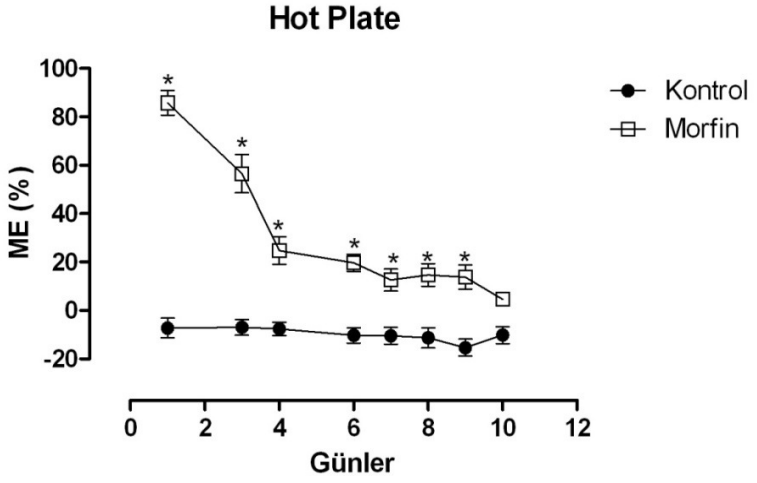
Morfinin 10 mg/kg, s.c. 2x1 uygulanmasıyla analjezik etkisine tail flick testinde 9. günde tolerans geliştiği gözlenirken, hot plate testinde 10. günde gelişmiştir (Şekil 10, 11). Grup IV hayvanlarda tolerans gelişmesi diğer gruplara göre daha geç olmuştur.



Şekil 10. Grup IV (10 günlük grup) morfinin analjezik etkisine tolerans gelişmesinin tail flick testinde gösterilmesi

ME: Maksimal etki.

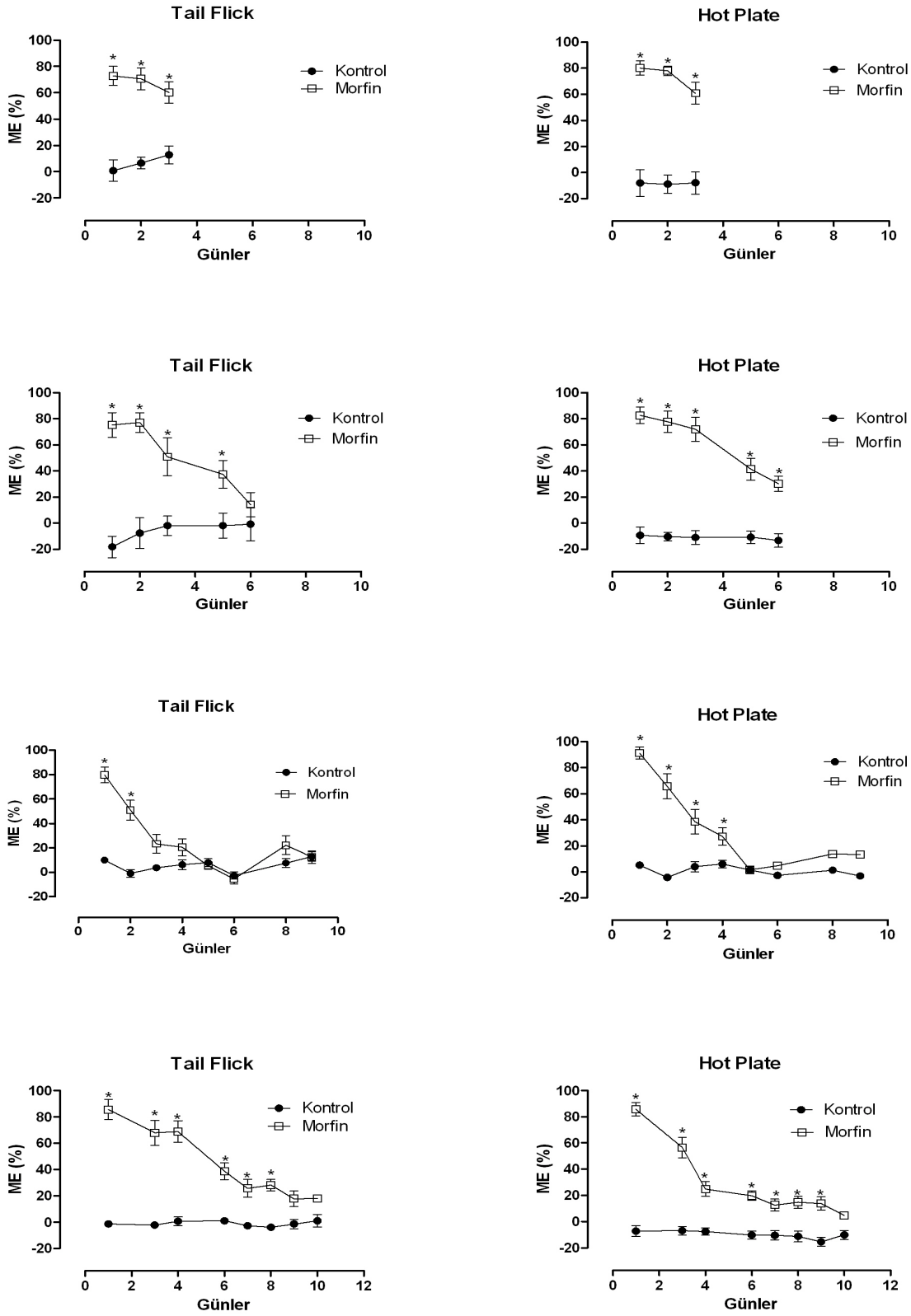
***** p<0,05 aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.



Şekil 11. Grup IV (10 günlük grup) morfinin analjezik etkisine tolerans gelişmesinin hot plate testinde gösterilmesi

ME: Maksimal etki.

***** p<0,05 aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.



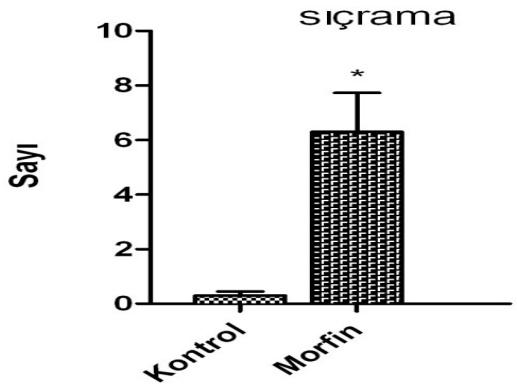
Şekil 12. Toleransın gelişim aşamalarının tüm gruplarda birden gözlemlenmesi

ME: Maksimal etki.

***** p<0,05 aynı günkü kontrol grubuna göre, Two Way ANOVA, *post hoc* Bonferroni-t test.

MORFİN BAĞIMLILIĞININ GELİŞMESİ

Antinosisepsiyon testlerinin tamamlanmasından sonra Grup IV (10 günlük grup) fareler nalokson verilerek yoksunluk sendromuna sokuldular. Yoksunluk sendromu belirtileri olan pençe tremoru ve sıçrama sayıları belirlendi, ortalama ve standart sapmaları hesaplandı (Tablo 3, 4). Kontrol ve morfin grupları arasında oldukça yüksek oranda anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi (Tablo 3, 4 ve Şekil 13, 14)



Şekil 13. Nalokson uygulamasını takiben farelerin sıçrama sayıları

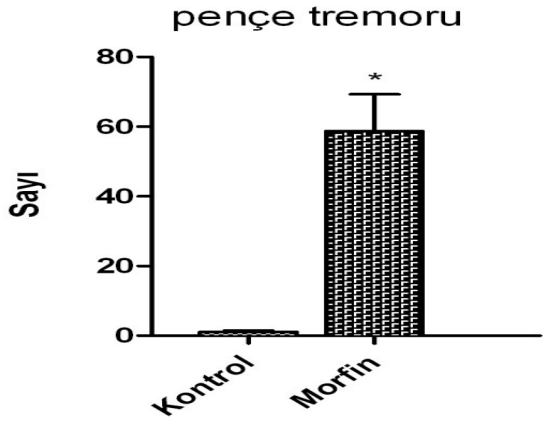
* p<0,05 anlamlı, t-test.

Tablo 3. Grup IV (10 günlük grup) kontrol ve morfin alt grubu sıçrama sayıları (ort±ss)

Kontrol	0,3000 ± 0,1528 N=10
Morfin	6,300 ± 1,430 N=10
P	**p<0,0001**

t-test.

.



Şekil 14. Nalokson uygulamasını takiben farelerin ön pençe tremorlarının sayısı

* p<0,05 anlamlı, t-test.

Tablo 4. Grup IV (10 günlük grup) kontrol ve morfin alt grubu ön pençe tremoru sayıları (ort±ss)

Kontrol	0,2000 ± 0,1333 n=10
Morfin	58,70 ± 10,62 n=10
P	**p<0,0001**

t-test.

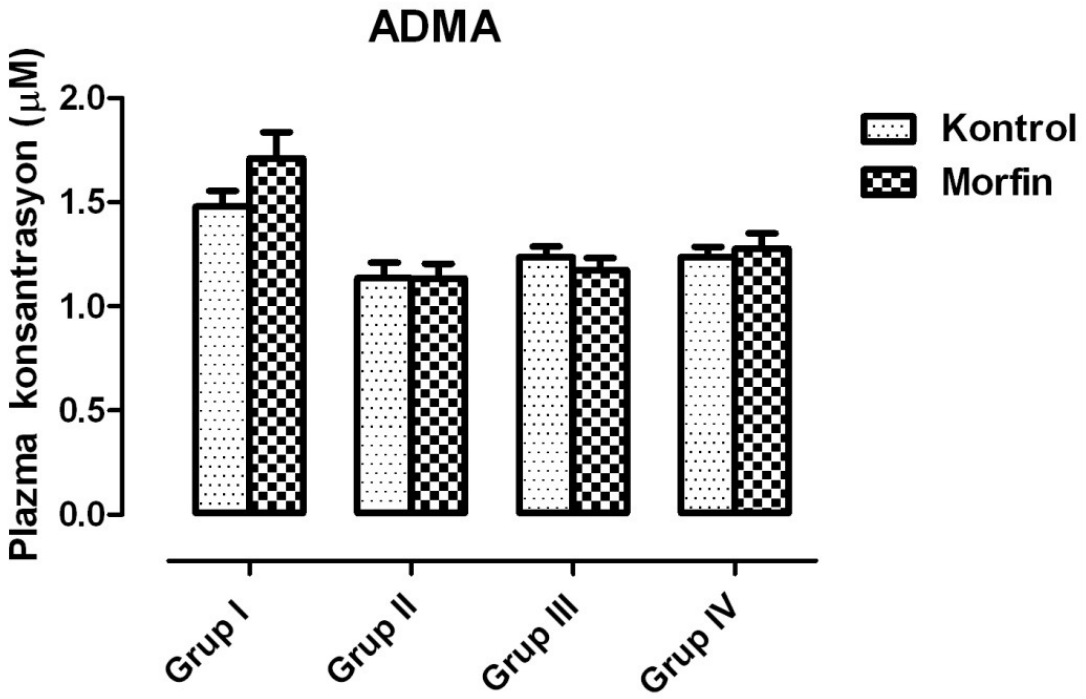
PLAZMA ASİMETRİK DİMETİLARGİNİN, SİMETRİK DİMETİLARGİNİN, L-ARGİNİN VE L-HOMOARGİNİN DÜZEYLERİ

Plazma ADMA, SDMA düzeylerinde grup I, II, III, IV'te kontrole göre anlamlı farklılık bulunmamaktadır (Tablo 5, 6 ve Şekil 15, 16). Grup I (3 günlük grup) plazma L-arginin ve L-homoarginin düzeylerinde kontrole göre anlamlı farklılık bulundu, diğer gruplar için bu farklılık bulunamadı (Tablo 7, 8 ve Şekil 17, 18).

Tablo 5. Plazma asimetrik dimetilarginin düzeyi (µM) (ort±ss)

Gruplar	I	II	III	IV
Kontrol	1,47±0,23	1,13±0,23	1,23±0,16	1,23±0,15
Morfin	1,70±0,39	1,13±0,22	1,17±0,18	1,27±0,23
P*	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**

*One Way Anova *post hoc* Bonferroni-t test.



Şekil 15. Gruplara göre plazma asimetrik dimetilarginin düzeylerinin dağılımı

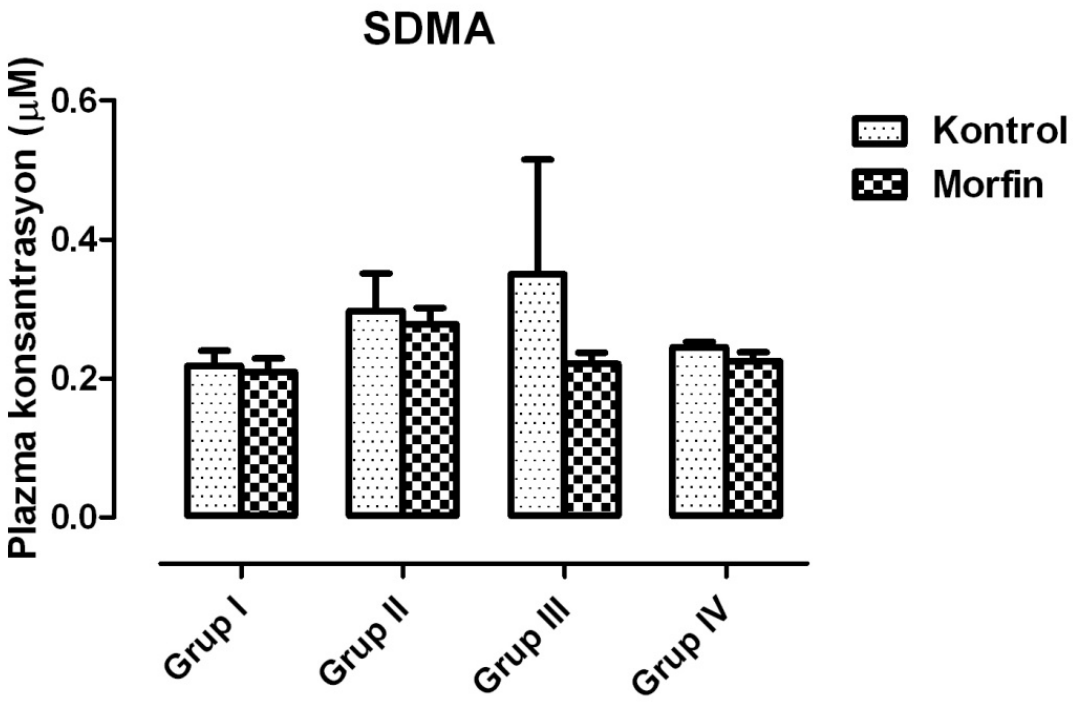
ADMA: Asimetrik dimetilarginin.

*p<0,05 kontrole karşı, One Way Anova *post hoc* Bonferroni-t test.

Tablo 6. Plazma simetrik dimetilarginin düzeyi (µM) (ort±ss)

Gruplar	I	II	III	IV
Kontrol	0,21±0,06	0,29±0,17	0,35±0,52	0,24±0,02
Morfin	0,20±0,06	0,27±0,07	0,22±0,05	0,22±0,03
P*	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**

*One Way Anova *post hoc* Bonferroni-t test.



Şekil 16. Gruplara göre plazma simetrik dimetilarginin düzeylerinin dağılımı

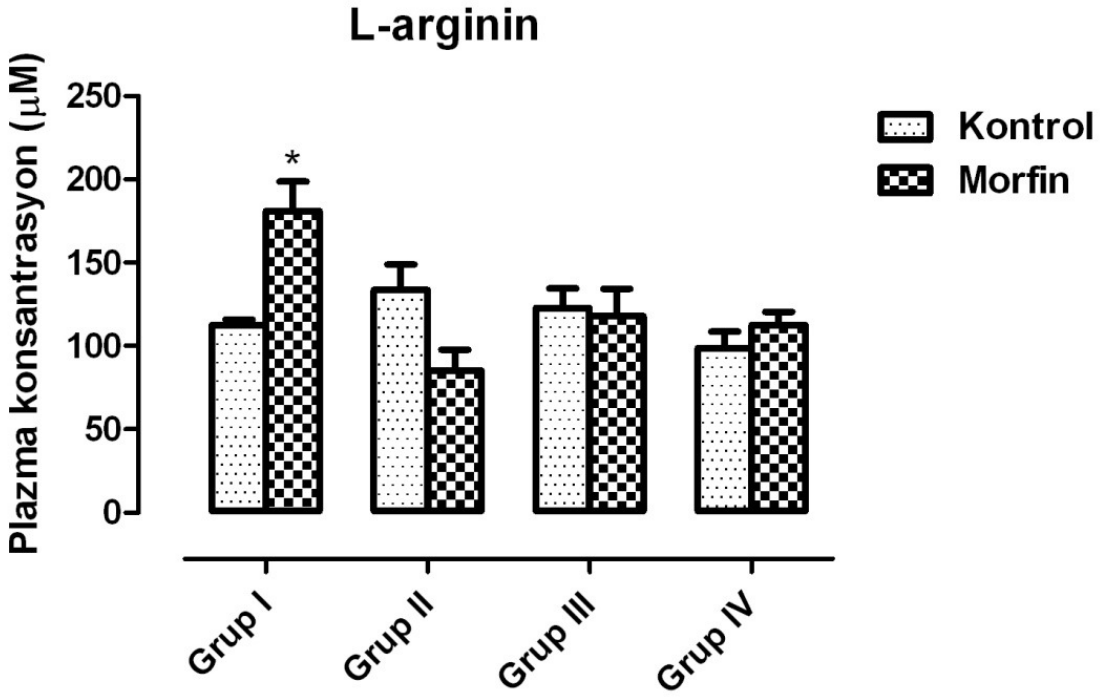
SDMA: Simetrik dimetilarginin.

*p<0,05 kontrole karşı, One Way Anova *post hoc* Bonferroni-t test.

Tablo 7. Plazma L-arginin düzeyi (µM) (ort±ss)

Gruplar	I	II	III	IV
Kontrol	112,6±10,4	133,7±48,2	122,9±36,7	98,7±31,1
Morfin	180,9±55,9	85,1±40,0	117,8±51,8	112,4±25,2
P*	**p<0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**

*One Way Anova *post hoc* Bonferroni-t test.



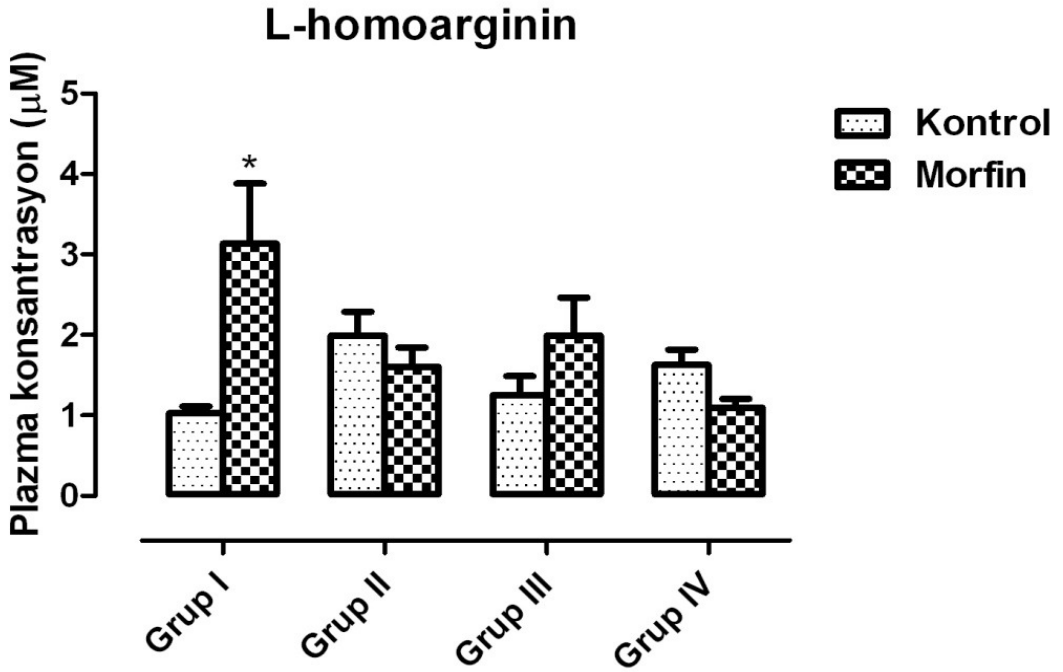
Şekil 17. Gruplara göre plazma L-arginin düzeylerinin dağılımı

*p<0,05 kontrole karşı, One Way Anova *post hoc* Bonferroni-t test.

Tablo 8. Plazma L-homoarginin düzeyi (µM) (ort±ss)

Gruplar	I	II	III	IV
Kontrol	1,022±0,27	1,99±0,94	1,25±0,74	1,62±0,60
Morfin	3,13±2,35	1,60±0,76	1,99±1,49	1,09±0,35
P*	**p<0,01**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**

*One Way Anova *post hoc* Bonferroni-t test.

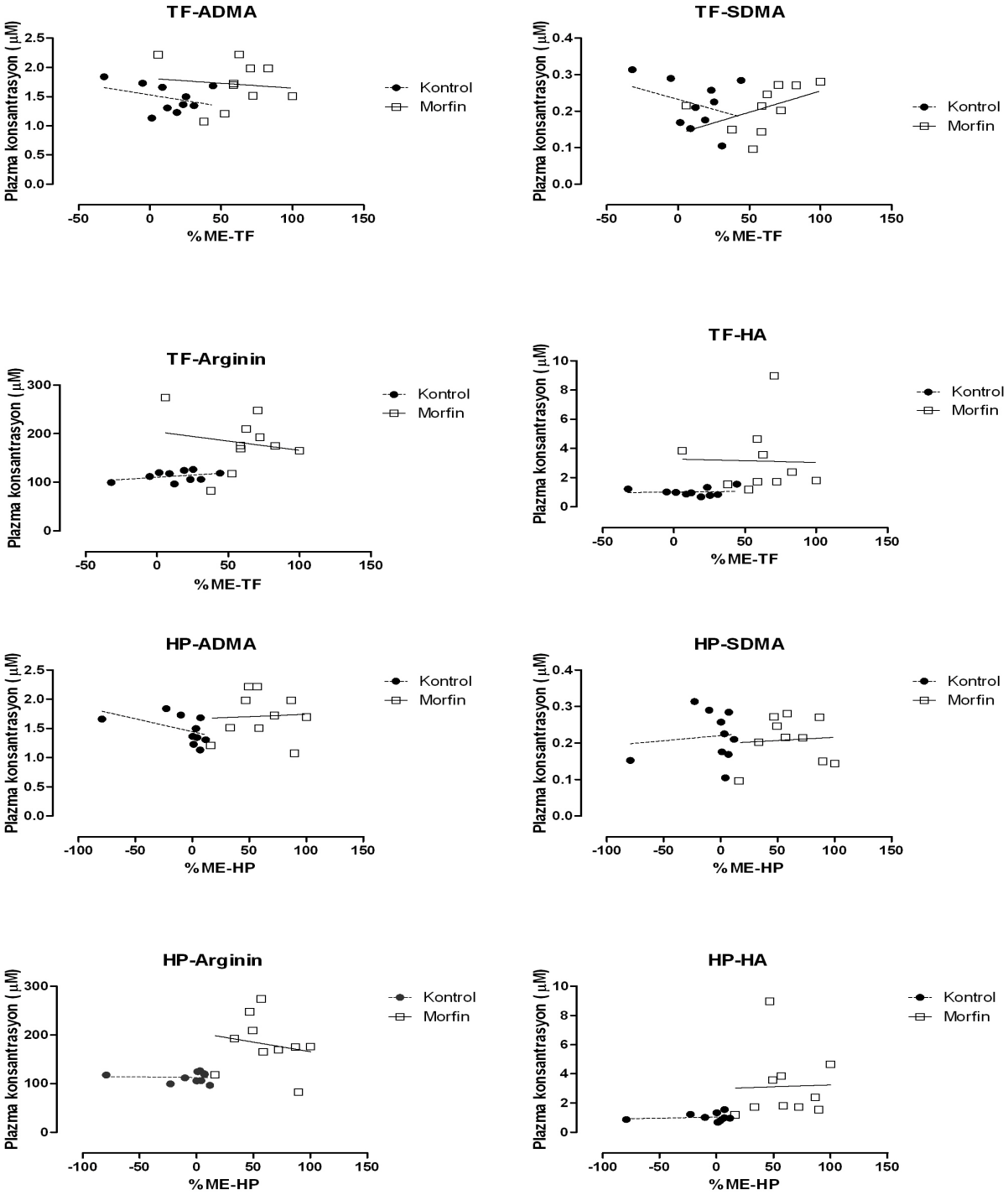


Şekil 18. Gruplara göre plazma L-homoarginin düzeylerinin dağılımı

*p<0,05 kontrole karşı, One Way Anova *post hoc* Bonferroni-t test.

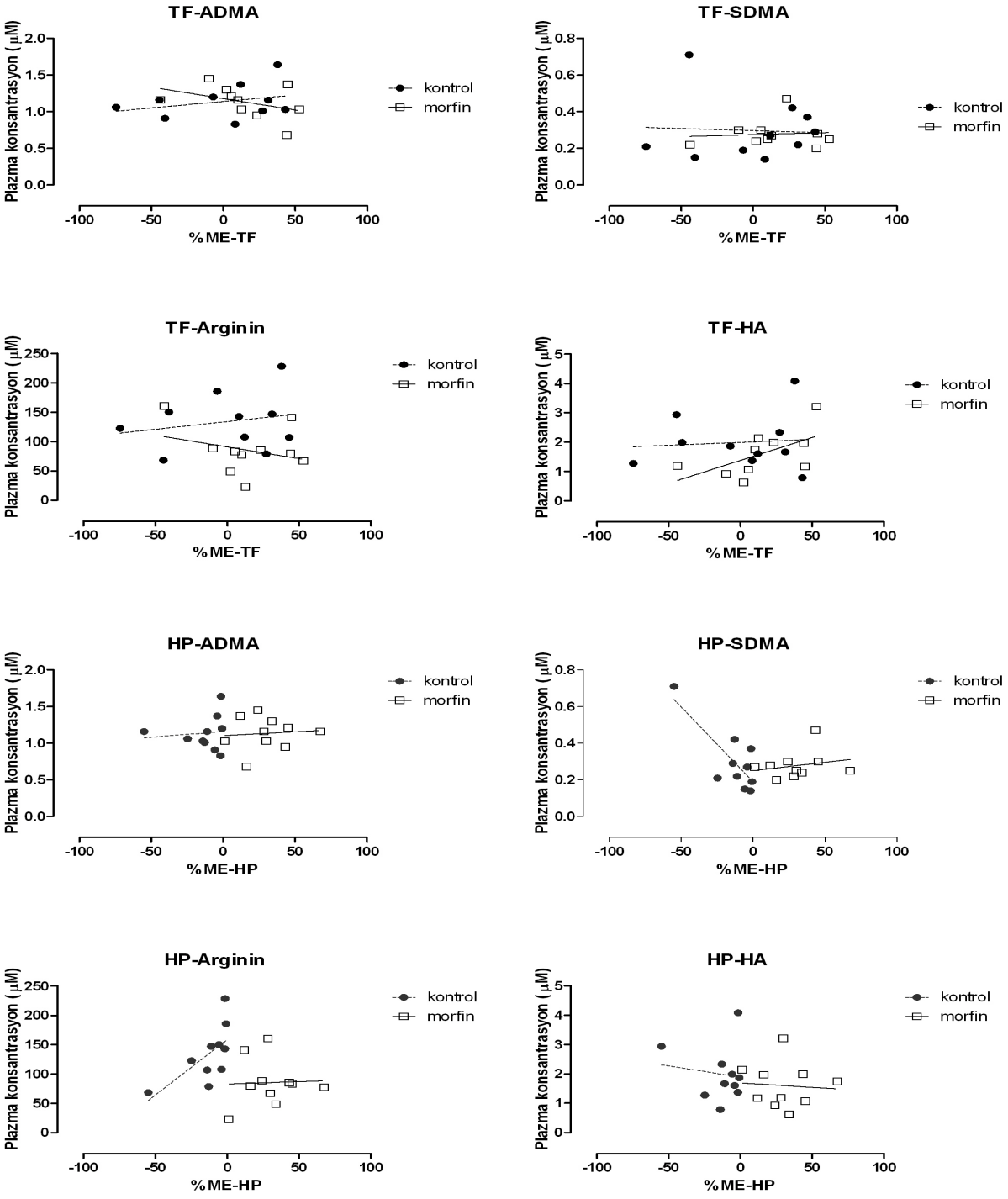
PLAZMA ASİMETRİK DİMETİLARGİNİN, SİMETRİK DİMETİLARGİNİN, L-ARGİNİN VE L-HOMOARGİNİN DÜZEYLERİ İLE MORFİN TOLERANS VE BAĞIMLILIĞI ARASINDAKİ KORELASYON

Çalışmamızda morfin bağımlılığı ve toleransı ile plazma ADMA düzeyleri arasındaki korelasyonu da inceledik. Plazma ADMA düzeyleri ile morfin bağımlılık ve tolerans gelişimi arasında bir korelasyon bulamadık. Ayrıca ek bir çalışma gerekmeden plazma düzeylerini belirleyebildiğimiz SDMA, L-arginin, L-homoarginin düzeyleri ile morfin bağımlılık ve tolerans gelişimi arasında da bir korelasyon bulamadık (Şekil 19, 20, 21, 22). Tail flick ve hot plate ile plazma ADMA, SDMA, L-arginin, L-homoarginin arasındaki korelasyon ve regresyon verileri Tablo 9, 10, 11, 12'de verilmiştir.



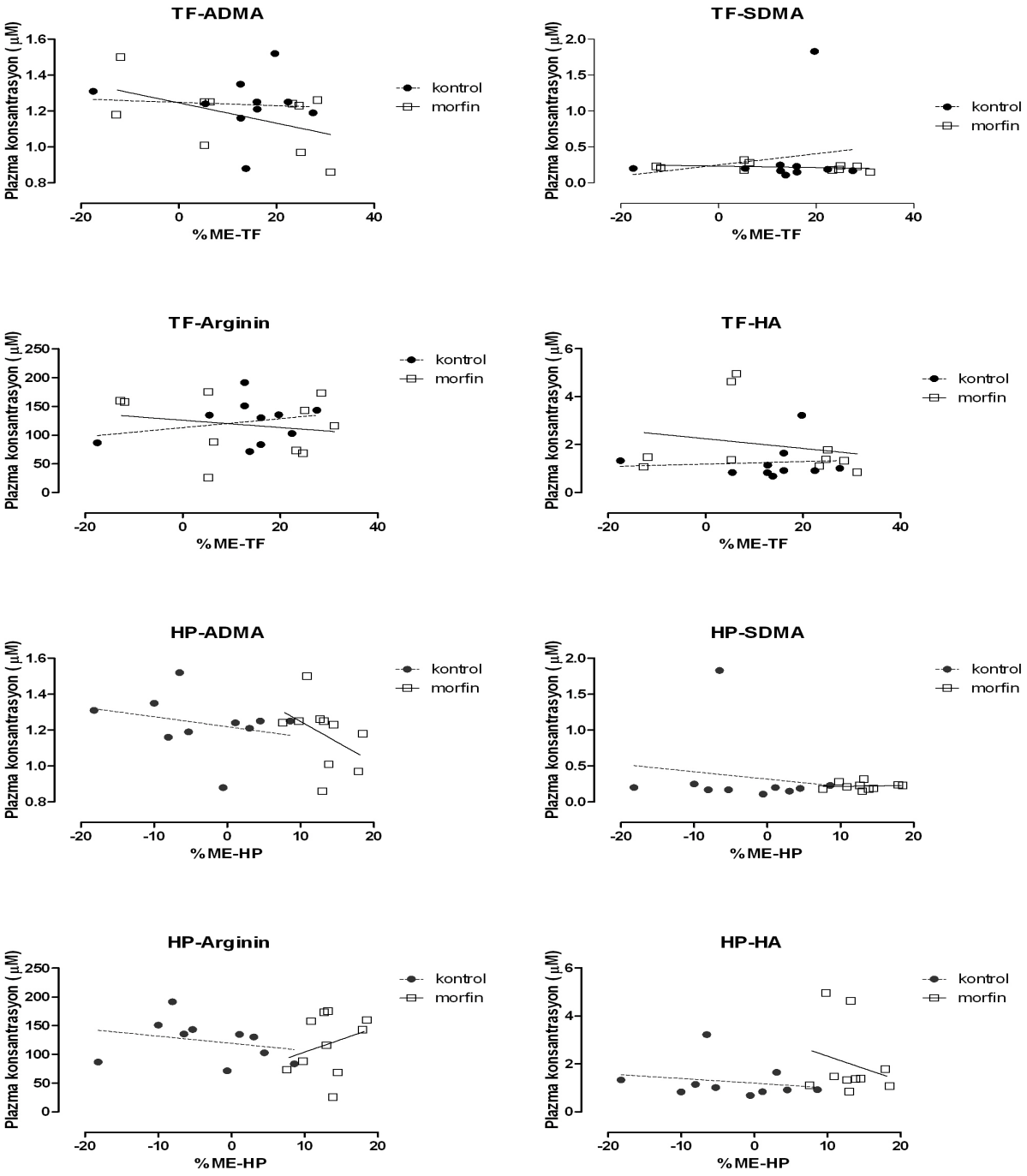
Şekil 19. Grup I (3 günlük grup) plazma asimetrik dimetilarginin, simetrik dimetilarginin, L-arginin ve L-homoarginin düzeyleri ile morfin tolerans ve bağımlılığı arasındaki korelasyon ve regresyon

TF-ADMA: Tail flick-asimetrik dimetilarginin**; TF-Arginin:** Tail flick-arginin**; TF-HA:** Tail flick-homoarginin**; TF-SDMA:** Tail flick-simetrik dimetilarginin**; HP-ADMA:** Hot plate-asimetrik dimetilarginin**; HP-Arginin:** Hot plate-arginin**; HP-HA:** Hot plate-homoarginin**; HP-SDMA:** Hot plate-simetrik dimetilarginin.



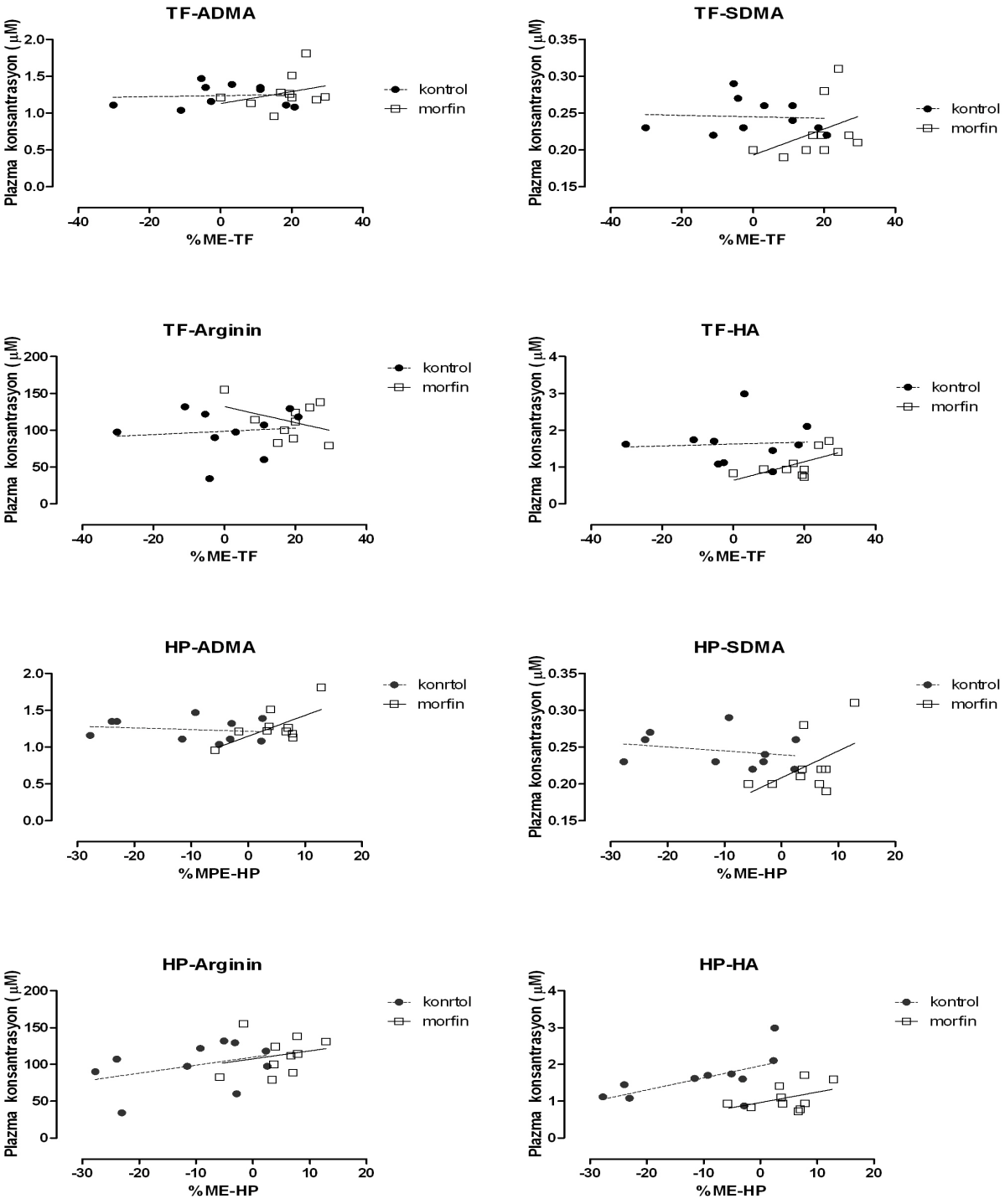
Şekil 20. Grup II (6 günlük grup) plazma asimetrik dimetilarginin, simetrik dimetilarginin, L-arginin ve L-homoarginin düzeyleri ile morfin tolerans ve bağımlılığı arasındaki korelasyon ve regresyon

TF-ADMA: Tail flick-asimetrik dimetilarginin**; TF-Arginin:** Tail flick-arginin**; TF-HA:** Tail flick-homoarginin**; TF-SDMA:** Tail flick-simetrik dimetilarginin**; HP-ADMA:** Hot plate-asimetrik dimetilarginin**; HP-Arginin:** Hot plate-arginin**; HP-HA:** Hot plate-homoarginin**; HP-SDMA:** Hot plate-simetrik dimetilarginin.



Şekil 21. Grup III (9 günlük grup) plazma asimetrik dimetilarginin, simetrik dimetilarginin, L-arginin ve L-homoarginin düzeyleri ile morfin tolerans ve bağımlılığı arasındaki korelasyon ve regresyon

TF-ADMA: Tail flick-asimetrik dimetilarginin**; TF-Arginin:** Tail flick-arginin**; TF-HA:** Tail flick-homoarginin**; TF-SDMA:** Tail flick-simetrik dimetilarginin**; HP-ADMA:** Hot plate-asimetrik dimetilarginin**; HP-Arginin:** Hot plate-arginin**; HP-HA:** Hot plate-homoarginin**; HP-SDMA:** Hot plate-simetrik dimetilarginin.



Şekil 22. Grup IV (10 günlük grup) plazma asimetrik dimetilarginin, simetrik dimetilarginin, L-arginin ve L-homoarginin düzeyleri ile morfin tolerans ve bağımlılığı arasındaki korelasyon ve regresyon

TF-ADMA: Tail flick-asimetrik dimetilarginin**; TF-Arginin:** Tail flick-arginin**; TF-HA:** Tail flick-homoarginin**; TF-SDMA:** Tail flick-simetrik dimetilarginin**; HP-ADMA:** Hot plate-asimetrik dimetilarginin**; HP-Arginin:** Hot plate-arginin**; HP-HA:** Hot plate-homoarginin**; HP-SDMA:** Hot plate-simetrik dimetilarginin.

Tablo 9. Grup I korelasyon ve regresyon verileri

Grup I Kontrol	Korelasyon			Regresyon		
	Pearson r	*R square*	*P*	*Slope*	*Y-İntercept*	*P*
TF-ADMA	-0,3480	0,1211	0,3244	-0,0038 ± 0,003707	1,528 ± 0,08890	0,3244
TF-SDMA	-0,3420	0,1170	0,3334	-0,001090 ± 0,001059	0,2322 ± 0,02539	0,3334
TF-Arginin	0,3814	0,1454	0,2769	0,1864 ± 0,1598	110,3 ± 3,831	0,2769
TF-HA	0,07709	0,005942	0,8324	0,0009789 ± 0,004476	1,013 ± 0,1073	0,8324
HP-ADMA	-0,5006	0,2506	0,1406	-0,004424 ± 0,002705	1,444 ± 0,07256	0,1406
HP-SDMA	0,1133	0,01285	0,7552	0,0002855 ± 0,0008847	0,2205 ± 0,02373	0,7552
HP-Arginin	-0,05865	0,003439	0,8722	-0,02265 ± 0,1363	112,5 ± 3,657	0,8722
HP-HA	0,1317	0,01736	0,7168	0,001322 ± 0,003517	1,036 ± 0,09433	0,7168
Grup I Morfin						
TF-ADMA	-0,1077	0,01161	0,7671	-0,001664 ± 0,005430	1,811 ± 0,3522	0,7671
TF-SDMA	0,4799	0,2303	0,1604	0,001169 ± 0,0007558	0,1385 ± 0,04902	0,1604
TF-Arginin	-0,1735	0,03010	0,6317	-0,3798 ± 0,7624	203,8 ± 49,45	0,6317
TF-HA	-0,02507	0,0006287	0,9452	-0,002307 ± 0,03252	3,277 ± 2,110	0,9452
HP-ADMA	0,05223	0,002728	0,8861	0,0007804 ± 0,005276	1,664 ± 0,3473	0,8861
HP-SDMA	0,07293	0,005318	0,8413	0,0001719 ± 0,0008311	0,1984 ± 0,05472	0,8413
HP-Arginin	-0,1849	0,03420	0,6090	-0,3917 ± 0,7359	204,8 ± 48,45	0,6090
HP-HA	0,02839	0,0008058	0,9380	0,002527 ± 0,03146	2,984 ± 2,071	0,9380

TF-ADMA: Tail flick-asimetrik dimetilarginin**; TF-Arginin:** Tail flick-arginin**; TF-HA:** Tail flick-homoarginin**; TF-SDMA:** Tail flick-simetrik dimetilarginin**; HP-ADMA:** Hot plate-asimetrik dimetilarginin**; HP-Arginin:** Hot plate-arginin**; HP-HA:** Hot plate-homoarginin**; HP-SDMA:** Hot plate-simetrik dimetilarginin.

Tablo 10. Grup II korelasyon ve regresyon verileri

Grup II Kontrol	Korelasyon			Regresyon		
	Pearson r	*R square*	*P*	*Slope*	*Y-İntercept*	*P*
TF-ADMA	0,3015	0,09091	0,3972	0,001761 ± 0,001969	1,138 ± 0,07476	0,3972
TF-SDMA	-0,05482	0,003005	0,8804	-0,0002342 ± 0,00150	0,2968 ± 0,05726	0,8804
TF-Arginin	0,2179	0,04749	0,5453	0,2628 ± 0,4160	133,9 ± 15,80	0,5453
TF-HA	0,08400	0,007056	0,8175	0,001982 ± 0,008313	1,994 ± 0,3157	0,8175
HP-ADMA	0,1060	0,01123	0,7708	0,001502 ± 0,004984	1,157 ± 0,1019	0,7708
HP-SDMA	-0,7866	0,6188	0,0069	-0,008157 ± 0,002264	0,1896 ± 0,04628	0,0069
HP-Arginin	0,6467	0,0433	0,4182	1,893 ± 0,7893	158,7 ± 16,14	0,4182
HP-HA	-0,1321	0,01745	0,7161	-0,007566 ± 0,02008	1,893 ± 0,4104	0,7161
Grup II Morfin						
TF-ADMA	-0,4057	0,1646	0,2447	-0,003127 ± 0,002490	1,178 ± 0,07724	0,2447
TF-SDMA	0,08268	0,006836	0,8204	0,0002127 ± 0,000906	0,2750 ± 0,02812	0,8204
TF-Arginin	-0,2897	0,08395	0,4168	-0,3996 ± 0,4667	90,86 ± 14,48	0,4168
TF-HA	0,5954	0,3545	0,0694	0,01564 ± 0,007461	1,380 ± 0,2314	0,0694
HP-ADMA	0,08888	0,007899	0,8071	0,001055 ± 0,004181	1,102 ± 0,1468	0,8071
HP-SDMA	0,2292	0,05255	0,5241	0,0009086 ± 0,001364	0,2506 ± 0,04789	0,5241
HP-Arginin	0,03790	0,001436	0,9172	0,08052 ± 0,7507	82,77 ± 26,35	0,9172
HP-HA	-0,07529	0,005668	0,8362	-0,003046 ± 0,01427	1,694 ± 0,5008	0,8362

TF-ADMA: Tail flick-asimetrik dimetilarginin**; TF-Arginin:** Tail flick-arginin**; TF-HA:** Tail flick-homoarginin**; TF-SDMA:** Tail flick-simetrik dimetilarginin**; HP-ADMA:** Hot plate-asimetrik dimetilarginin**; HP-Arginin:** Hot plate-arginin**; HP-HA:** Hot plate-homoarginin**; HP-SDMA:** Hot plate-simetrik dimetilarginin.

Tablo 11. Grup III korelasyon ve regresyon verileri

Grup III Kontrol	**Korelasyon**			**Regresyon**		
	Pearson r	*R square*	*P*	*Slope*	*Y-İntercept*	*P*
TF-ADMA	-0,06947	0,004825	0,8488	-0,0009175 ± 0,004658	1,248 ± 0,08074	0,8488
TF-SDMA	0,1819	0,03307	0,6151	0,007755 ± 0,01482	0,2501 ± 0,2570	0,6151
TF-Arginin	0,2610	0,06810	0,4665	0,7847 ± 1,026	112,8 ± 17,79	0,4665
TF-HA	0,08709	0,007585	0,8109	0,005314 ± 0,02149	1,185 ± 0,3725	0,8109
HP-ADMA	-0,2732	0,07461	0,4451	-0,005526 ± 0,006881	1,219 ± 0,05642	0,4451
HP-SDMA	-0,1575	0,02481	0,6638	-0,01029 ± 0,02280	0,3177 ± 0,1870	0,6638
HP-Arginin	-0,2711	0,07350	0,4487	-1,249 ± 1,568	119,0 ± 12,85	0,4487
HP-HA	-0,2075	0,04305	0,5651	-0,01939 ± 0,03232	1,192 ± 0,2650	0,5651
Grup III Morfin						
TF-ADMA	-0,5060	0,2561	0,1356	-0,005667 ± 0,003415	1,246 ± 0,06784	0,1356
TF-SDMA	-0,3350	0,1123	0,3440	-0,001046 ± 0,001040	0,2340 ± 0,02065	0,3440
TF-Arginin	-0,1998	0,03993	0,5799	-0,6356 ± 1,102	125,8 ± 21,89	0,5799
TF-HA	-0,2203	0,04855	0,5407	-0,02028 ± 0,03174	2,246 ± 0,6304	0,5407
HP-ADMA	-0,4218	0,1779	0,2247	-0,02296 ± 0,01745	1,477 ± 0,2365	0,2247
HP-SDMA	0,08707	0,007580	0,8110	0,001321 ± 0,005343	0,2036 ± 0,07242	0,8110
HP-Arginin	0,2836	0,08044	0,4271	4,384 ± 5,241	60,12 ± 71,03	0,4271
HP-HA	-0,2301	0,05294	0,5225	-0,1029 ± 0,1539	3,349 ± 2,086	0,5225

TF-ADMA: Tail flick-asimetrik dimetilarginin**; TF-Arginin:** Tail flick-arginin**; TF-HA:** Tail flick-homoarginin**; TF-SDMA:** Tail flick-simetrik dimetilarginin**; HP-ADMA:** Hot plate-asimetrik dimetilarginin**; HP-Arginin:** Hot plate-arginin**; HP-HA:** Hot plate-homoarginin**; HP-SDMA:** Hot plate-simetrik dimetilarginin.

Tablo 12. Grup IV korelasyon ve regresyon verileri

Grup IV Kontrol	**Korelasyon**			**Regresyon**		
	Pearson r	*R square*	*P*	*Slope*	*Y-İntercept*	*P*
TF-ADMA	0,07321	0,005360	0,8407	0,0007347 ± 0,003538	1,237 ± 0,05146	0,8407
TF-SDMA	-0,06573	0,004321	0,8568	-0,000101 ± 0,0005467	0,2451 ± 0,00795	0,8568
TF-Arginin	0,1079	0,01165	0,7666	0,2199 ± 0,7161	98,50 ± 10,41	0,7666
TF-HA	0,06625	0,004389	0,8557	0,002609 ± 0,01389	1,624 ± 0,2020	0,8557
HP-ADMA	-0,1672	0,02796	0,6443	-0,002308 ± 0,004812	1,215 ± 0,07048	0,6443
HP-SDMA	-0,2502	0,06260	0,4857	-0,0005334 ± 0,000729	0,2396 ± 0,01069	0,4857
HP-Arginin	0,3906	0,1526	0,2644	1,095 ± 0,9121	109,9 ± 13,36	0,2644
HP-HA	0,6066	0,3680	0,0630	0,03286 ± 0,01523	1,961 ± 0,2230	0,0630
Grup IV Morfin						
TF-ADMA	0,3054	0,09329	0,3908	0,008148 ± 0,008981	1,130 ± 0,1780	0,3908
TF-SDMA	0,3965	0,1572	0,2567	0,001779 ± 0,001457	0,1929 ± 0,02887	0,2567
TF-Arginin	-0,3748	0,1405	0,2859	-1,088 ± 0,9519	132,1 ± 18,86	0,2859
TF-HA	0,6283	0,3948	0,0517	0,02544 ± 0,01114	0,6354 ± 0,2207	0,0517
HP-ADMA	0,6437	0,4144	0,0446	0,02834 ± 0,01191	1,147 ± 0,08061	0,0446
HP-SDMA	0,4929	0,2430	0,1477	0,003650 ± 0,002278	0,2083 ± 0,01542	0,1477
HP-Arginin	0,2247	0,05050	0,5325	1,077 ± 1,651	107,6 ± 11,17	0,5325
HP-HA	0,4233	0,1792	0,2228	0,02828 ± 0,02140	0,9647 ± 0,1448	0,2228

TF-ADMA: Tail flick-asimetrik dimetilarginin**; TF-Arginin:** Tail flick-arginin**; TF-HA:** Tail flick-homoarginin**; TF-SDMA:** Tail flick-simetrik dimetilarginin**; HP-ADMA:** Hot plate-asimetrik dimetilarginin**; HP-Arginin:** Hot plate-arginin**; HP-HA:** Hot plate-homoarginin**; HP-SDMA:** Hot plate-simetrik dimetilarginin.

TARTIŞMA

Opioid ilaçlar akut ve kronik ağrının tedavisinde en etkili ilaçlar arasında yer almaktadır. Analjezik etkilerine karşı tolerans gelişmesi ve bağımlılık yapmaları bu ilaçları uzun süreli kullanmamızı kısıtlayan önemli problemlerdir (76,77). Oluşan toleransı aşmak için ilaç dozunu arttırmak gerekmektedir. Opioid ilaçların yüksek dozlarda kullanılması da özellikle tolerans gelişmeyen veya çok az gelişen kabızlık, konvulsiyon, bradikardi gibi istenmeyen etkilerinin ortaya çıkmasına sebebiyet vermektedir. Opioid ilaçların kullanımı sırasında ortaya çıkan toleransın ve bağımlılığın moleküler temeli, yapılan birçok çalışmaya rağmen henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Opioid reseptörler G-protein bağlı reseptör ailesine dahildir. Opioid reseptörlerin uyarılması nöronda hiperpolarizasyona yol açarak ağrı iletimini güçleştirir. Toleransın gelişmesinde rol oynayan ana unsurlar; erken dönemde opioid reseptörlerinin fosforilizasyonu ve ayrışma, reseptörlerin internalizasyonu, geç dönemde ise opioid reseptörlerinin down regülasyonu, siklik adenozin monofosfat (cAMP) yolağının up-regülasyonu, sinyal iletimindeki değişimlerdir (78-81). Bu moleküler değişikliklere ilaveten serotonin, NA, dopamin, gama amino bütirik asit (GABA), adenozin ve NO gibi nörotransmitter ya da nöromodülatörlerin de opioid tolerans ve bağımlılığının gelişmesinde rol oynadıkları gösterilmiştir (79,82,83).

Uzun süreli opioid maruziyetinin, μ-opioid reseptör fosforilizasyonuna sebebiyet verdiği fakat aynı zamanda reseptör salınımını da arttırdığı yönünde çalışmalar vardır (84-86). Birkaç çalışmada da farklı protein kinazların [G-protein-coupled reseptör kinaz (GRKs), Ca^{2+}/kalmodulin bağımlı protein kinazII (CaMKII), protein kinaz C (PKC), mitogen activated kinaz (MAPKs)] neden olduğu opioid reseptör fosforilasyonu ile agonistle uyarılan desensitizasyon arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir (87,88).

Agonist bağımlı olarak, opioid reseptörlerin fosforilizasyonu reseptör yapısında değişiklik meydana getirerek reseptörün sitozolik β-arrestin proteinine ilgisini arttırır (78). β-arrestin ile etkileşen reseptörde G protein ayrışması olur ve hücre içi kaskatları aktifleyemez (78). Reseptörün tekrar uyarılabilir duruma gelmesi için internalizasyonu ve β-arrestinden ayrılması gerekir (78). Reseptör fosforilizasyonu, G protein ayrışması ve takiben reseptör internalizasyonunun reseptör sayısını azaltarak toleransa katkısı olabileceği düşünülüyordu (78). Fakat internalizasyon sonrası β-arrestin bağlı reseptörün parçalanmadığı, aksine defosforilize edilerek tekrar aktif reseptör olarak hücre yüzeyine gönderildiği gösterildi (89,90). Böylece internalizasyonun opioid toleransını azalttığını gösteren çalışmalar yapılmıştır (91,92). Değişik opioid ilaçlarla tedavi sonrası opioid reseptör internalizasyonunun farklılık göstermesi de bu çalışmaları destekler yöndedir (85,93).

Kronik opioid tedavisini takiben oluşan opioid reseptör down regülasyonu geç dönem reseptör adaptif mekanizmalarındandır. Down regülasyonun oluşabilmesi için internalize edilen reseptörün parçalanması ya da yeni reseptör sentezinin azalması gerekmektedir. Böylece azalan reseptör sayısının tolerans gelişimine sebebiyet verdiği düşünülebilir. Fakat bu düşünceyi destekleyen az sayıda yayın mevcut olup (78), bu yayınların çoğunluğu da in vitro olarak planlanmıştır (94-96). İn vivo çalışmaların sonuçları ise hayli değişkendir. Kronik opioid tedavisini takiben beyindeki opioid reseptörlerin sayısının azaldığını gösteren yayınların yanında arttığını veya değişmediğini gösteren yayınlar mevcuttur (97-99).

Opioid tolerans ve bağımlılığının oluşmasında N-metil-D-aspartat (NMDA)/NO sisteminin anahtar bir rolü olduğuna yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır (8,76,83,100-102). Glutamat, ağrı iletiminde önemli bir nöromediyatördür. Glutamat, NMDA reseptörleri iyonotropik reseptörlerdir. Glutamat tarafından aktive edildiklerinde, kanalı kapatan magnezyum iyonu ayrılır ve böylece hücre içine kalsiyum girişi olur. Kalsiyum kalmoduline bağlanarak NOS aktivitesini arttırır. Sentezlenen NO nöronal plastisite ve santral sensitazyonda rol oynar (103).

Morfin ile akut tedavinin, sıçanların motor korteksinde ve serebral korteksten alınan beyin dilimlerinde ve sinaptozomlarında endojen glutamat salınımını önlediği gösterilmiştir (104,105). Ayrıca sıçan serebral korteks kültürlerinde ve serebral korteks sinir terminallerinde glutamat salınımının opioidler tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (106,107). Morfin bağımlı sıçanlara nalokson injeksiyonu glutamat salınımını arttırmaktadır. Morfin bağımlı sıçanlarda nalokson ya da naltrekson ile indüklenmiş, morfin çekilme sendromu süresince nükleus akkumbens ve lokus seruleus'da glutamat düzeylerinin arttığını in vivo mikrodializ

yöntemiyle gösterilmiştir (108). Morfin bağımlı sıçanlara glutamat injeksiyonu doz bağımlı olarak çekilme bulgularını başlatır. Bu davranışsal değişiklikler morfin reseptör antagonisti nalokson uygulamasını takiben oluşan bulgularla benzerdir.

Yarışmasız NMDA reseptör antagonisti olan MK-801 ile yapılan çalışmalarda morfin tolerans ve bağımlılığının zayıflatıldığı gösterilmiştir (109). Glutamat tarafından NMDA reseptörlerinin aktivasyonuyla meydana getirilen bulguların NOS aktivasyonu sonucu oluşan NO ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (110). Dahası NO, morfin tolerans ve bağımlılığında rol oynayan intrasellüler ulak olarak kabul edilmektedir (111).

Uzun süreli morfin tedavisinin serebral korteks ve amigdalada NOS aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (112). Leza ve ark. (113) da morfin pellet implantasyonunun ikinci gününde serebral korteks NOS aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir. Bhargava ve ark. (75), μ-(morfin) ve κ-(U50, 488H) opioid reseptör agonistlerine karşı oluşan tolerans üzerine 7-NI (nNOS inhibitörü)'nın etkisi incelemiş ve toleransı önlediğini gözlemlemişlerdir. Diğer yandan δ-(enkefalin, deltanorfin) opioid reseptör agonistlerine karşı oluşan toleransta bu etki gözlemlenmemiştir (75,114). Yapılan diğer bir çalışmada ise 7-NI'nın kan basıncı artışına sebebiyet vermeden morfin çekilme bulgularını inhibe edebildiği gösterilmiştir (100).

Nitrik oksit sentaz inhibitörlerinden farklı olarak NMDA reseptör antagonistleri δ-(enkefalin, deltanorfin) opioid reseptör agonistlerine karşı oluşan toleransa karşı da etki göstermektedirler (115). Bu farkın sebebi belki de NOS aktivasyonun NMDA reseptörünün uyarılmasıyla ortaya çıkan bulgulardan sadece birisi olmasıdır. Morfin ile NMDA reseptör antagonistlerinin veya NOS enzim inhibitörlerinin birlikte verilmesinin, NO konsantrayonunda azalma yaparak, bağımlılık ve tolerans gelişimini zayıflattığı gösterilmiştir (116). Arginin dekarboksilaz enzimi aracılığıyla L-arginin aminoasitinden sentezlenen agmatin, NMDA reseptörlerini antagonize eden ve NOS aktivitesini inhibe eden 4-aminobutilguanidin yapısındaki polikatyonik bir aminoasittir (117). Sistemik veya intratekal uygulanmasının morfin toleransını önlediği saptanmıştır (118). Agmatinin, tolerans üzerine olan etkisinin temelinde NMDA/NO yolağı ön plana çıkmakla beraber imidazolin ve alfa-adrenerjik reseptörlere olan etkisinin de rol oynayabileceği belirtilmektedir (118).

Heinzen ve Pollack NOS izoformlarından hangisinin morfin toleransında rol oynadığını araştırmışlar ve nNOS'un tolerans oluşumuna katkısının daha önemli olduğunu göstermişlerdir (76,79). Akut sınırlı stresin sıçan beyin korteksinde glutamat aktivitesini arttırarak iNOS'u aktive ettiği gösterilmiş, NMDA reseptör antagonisti MK-801'in bu aktivasyonu önlediği bildirilmiştir (119). Benzer bulgular kronik stres için de Moro ve ark. (120) tarafından

bulunmuştur. Mikroglia hücrelerinin interferon gama ve lipopolisakkarid tarafından uyarılmasının iNOS aktivitesine sebebiyet verdiği Golde ve ark. (121) tarafından gösterilmiştir. İravani ve ark. (122) ünilateral intrastriatal N-metil-D-aspartik asit uygulamasının sıçanlarda astroglial ve mikroglial hücrelerde iNOS aktivitesine sebebiyet verdiğini bulmuşlardır. nNOS'un morfin tolerans ve bağımlılığında merkezi rolüne karşın, selektif iNOS inhibitörü aminoguanidinin ile yapılan bir çalışmada iNOS'un da morfin tolerans ve bağımlılığında rol oynayabileceği gösterilmiştir (123).

Bu bilgiler ışığında, uzun süreli morfin uygulanmasına yanıt olarak, hipokampüs ve amigdalada NO üretiminin arttığı ve artan NO'nun morfinin analjezik etkisini azalttığı ileri sürülebilir (75,79,124). Diğer yandan Mayer ve ark. (125) nöropatik ağrı ve morfin toleransının hücresel mekanizması üzerine yaptıkları çalışmalarında, hiperaljezi ve tolerans oluşum mekanizmalarının hücresel düzeyde benzer olduğunu ve etki yerinin medulla spinalis dorsal boynuzu olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmaya göre kronik morfin uygulaması μ-reseptörleri sürekli uyararak protein kinaz C (PKC) translokasyonuna sebebiyet verilmektedir. Transloke olan PKC, NMDA reseptörlerindeki Mg^{2+} blokajını ortadan kaldırarak aktive eder, böylece hücre içine Ca^{2+} iyonu girer. Hücre içine giren Ca^{2+} iyonu, NOS aktivasyonunu, daha fazla PKC oluşumunu, DNA zincir kırılmasını başlatabilen peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşumunu tetikler. Oluşan PKC μ-opioid reseptörlerine etkiyerek G protein ayrışmasına sebebiyet verir. Peroksinitrit hasarına karşı nükleus tamir enzimi "poly (ADP-ribose) synthase" (PARS) aktive olur. Bu enzim de hücre disfonksiyonuna ve ölümüne sebebiyet verir.

NO nosisepsiyon oluşumu için temel nöromodülatörlerden biri olmasına karşın, diğer yandan tonik kolinerjik ağrı inhibisyonu için de önemli bir mediyatördür (126). Sonuç olarak NO birbiriyle çatışan çift yönlü etkisi olan bir molekül gibi gözükmektedir (4).

L-arginin tüm NOS izoformlarının doğal substratıdır. Beyin dokusunda NO'nun yüksek konsantrasyonlarını devam ettirmek oldukça zordur, çünkü L-arginin sentezi için gerekli olan üre siklusu enzimleri bulunmamaktadır (127). Artmış NO sentezi için serebrospinal sıvının L-arginin içeriğinin yeterli olması gerekmektedir (128). L-arginin ön tedavisinin ya da tedaviye eklenmesinin NO konsantrasyonunu arttırarak bağımlılık ve tolerans gelişimine sebebiyet verdiği gösterilmiştir (76). Kumar ve Bahargava (74) çalışmalarında L-arginin tedavisinin morfin antinosisepsiyonunu zayıflattığını göstermişlerdir. L-argininin bu etkisinin MK-801 ve L-NAME ile geri döndürülebildiği gösterilmiştir (129).

Günümüzde ADMA'nın santral sinir sistemi üzerindeki etkilerine yönelik kapsamlı bilgiler bulunmamaktadır. Biz çalışmamıza, Kielstein ve ark. (14) tarafından ileri sürülen

“ADMA’nın opioid tolerans ve bağımlılığında modülatör rolü olabilir’’ adlı hipotez yazılarını temel alarak başladık. Morfin tolerans ve bağımlılığının çeşitli aşamalarını görebilmek amacıyla 3-6-9 ve 10 gün boyunca, günde iki defa 10 mg/kg s.c. olarak morfin verilen dört grup oluşturduk. Morfin toleransının birinci günden itibaren gelişmeye başladığını tail flick ve hot plate testleriyle gösterdik. Morfinin analjezik etkisine karşı 6-9 günler arasında tam tolerans gelişti. Tolerans gelişimini tail flick testinde hot plate testine göre bir gün önce gösterebildik. Bu da iki test arasındaki duyarlılık farkına bağlı olabilir.

Çalışmamızda tolerans ve bağımlılık üzerine etkisini araştırdığımız endojen molekül olan ADMA, tüm NOS izoformlarını (nNOS, iNOS, eNOS) inhibe etmektedir. ADMA’nın plazma düzeyinin kroner arter hastalıkları, diabetes mellitus, hiperkolestrolemi, hiperhomosisteinemi, hipertansiyon, obezite, periferik arter hastalıkları, preeklampsi ve tiroid hastalıklarda arttığı gösterilmiştir (130-132). ADMA, dimetilarginin dimetil-aminohidrolaz (DDAH) enzimi tarafından metabolize edilir. Bu enzimin DDAH1 ve DDAH2 olarak adlandırılan iki izoformu bulunmaktadır (133). DDAH1, nNOS’un sentez edildiği dokularda üretilir.

Asimetrik dimetilargininin nNOS üzerine etkinliğinin eNOS’a göre daha fazla olduğu yönünde de çalışmalar vardır (134). ADMA’nın da NO oluşumunu azaltarak morfin toleransı ve bağımlılığının oluşmasında önemli bir düzenleyici olması beklenebilir. Fakat biz çalışmamızda morfin tolerans ve bağımlılığının gelişim aşamaları ile plazma ADMA, SDMA, L-arginin ve L-homoarginin düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon bulamadık. Sadece opioid tolerans gelişiminin üçüncü gününde alınan plazma örneklerinde L-arginin ve L-homoarginin düzeylerinde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit ettik. Fakat bu yükseklik çalışmamızın ilerleyen günlerinde (74,83,132) yapılan plazma ölçümlerinde devam etmedi. L-homoarginin artışı birçok patolojik ve fizyolojik durumda meydana gelebildiği için biz bu artışı göz ardı ettik (135). Plazma ADMA düzeyi yerine beyin ADMA düzeyleri ölçülerek yapılan bir çalışma ile bizim bu araştırmada gözleyemediğimiz etkileşim ortaya konulabilir.

SONUÇLAR

Opioid ilaçların kullanımı sırasında ortaya çıkan ve bu ilaçların kullanımını ciddi olarak kısıtlayan bağımlılık ve toleransın, oluşum mekanizmasına asimetrik dimetil argininin etkisini araştırdığımız çalışmamızda;

1. Morfinin subkutan olarak günde iki kere 10 mg/kg tekrarlayan injeksiyonunu takiben antinosiseptif etkisi ilk günden itibaren azalmaya başladı, ortalama 6-9. günlerde tail flick ve hot plate testlerinde tam bir tolerans oluştuğu gösterildi.

2. Antinosisepsiyon testlerinin tamamlanmasından sonra 10. günde nalokson uygulaması ise denekleri yoksunluk sendromuna soktu. Bağımlı farelerde yoksunluğun göstergesi olan sıçrama ve ön pençe tremoru kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti.

3. Tolerans ve bağımlık oluşum sürecinde, plazma ADMA ve SDMA düzeylerinde kontrole göre anlamlı bir farklılık görülmedi. L-arginin ve L-homoarginin düzeylerinde ise sadece 3. gün (Grup I) ölçümlerinde anlamlı bir yükseklik saptandı, fakat bu yükseklik tolerans gelişiminin daha ileri safhalarında (6, 9, 10. gün) devam etmedi.

Bulgularımız; plazma ADMA, SDMA, L-arginin ve L-homoarginin düzeyleri ile morfin tolerans ve bağımlılığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığını göstermektedir.

ÖZET

Asimetrik dimetilargininin artmış plazma düzeyleri birçok kardiyovasküler ve metabolik hastalıkla ilişkilidir. Bu çalışmada, endojen nitrik oksit sentaz inhibitörü asimetrik dimetilargininin, opioid bağımlılığı ve tolerans gelişiminde önemli katkısı olduğu hipotezini, farelerde morfine tolerans ve bağımlılık gelişirken plazma asimetrik dimetilarginin seviyelerinin ölçümü yoluyla araştırdık. Morfine tolerans ve bağımlılık, günde iki kez 10 mg/kg subkutan morfin injeksiyonuyla oluşturuldu. Fareler, 3, 6, 9 ve 10 gün beslenen gruplara ayrıldı. Tail flick testinde morfinin antinosiseptif etkisinin kaybı, tolerans gelişiminin derecesini belirlemek için kullanıldı. Fiziksel bağımlılık 5 mg/kg nalokson verilmesini takiben meydana gelen çekilme sendromu bulguları olan sıçrama ve ön pençe tremorlarının 20 dakika süresince sayılmasıyla belirlendi. Her beslenme periyodunun sonunda hayvanlara anestezi verilerek kalplerinden kan örnekleri alındı. Morfin tolerans ve bağımlılığı gelişen farelerde, asimetrik dimetilarginin, simetrik dimetilarginin, L-arginin ve L-homoarginin düzeyleri süre uyumlu kontrol gruplarına göre farklı değildi. Benzer olarak, tolerans ve bağımlılığın değişik aşamalarında olan fare gruplarındaki plazma asimetrik dimetilarginin ve diğer molekül konsantrasyonlarında da bir farklılık görülmedi.

Sonuçlarımız morfin tolerans ve bağımlılığının gelişimi süresince endojen asimetrik dimetilarginin, simetrik dimetilarginin, L-arginin ve L-homoarginin düzeylerinin, hipotezimizle uyumsuz olarak değişmediğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Morfin, tolerans, bağımlılık, asimetrik dimetil arginin, nitrik oksit.

MODULATORY ROLE OF THE ENDOGENOUS NITRIC OXIDE SYNTHASE INHIBITOR ASYMMETRIC DIMETILARGININE, IN MORPHINE TOLERANCE AND DEPENCE IN MICE

SUMMARY

Elevated plasma asymmetric dimethylarginine levels have been implicated in many cardiovascular and metabolic disorders. In the current work, we investigated the hypothesis that endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine is an important contributor to opioid tolerance and dependence, by determining plasma asymmetric dimethylarginine levels during the development of tolerance and dependence to morphine in mice. Tolerance to and dependence on morphine were induced by repeated injections of morphine (10 mg/kg, s.c.) twice daily to mice, divided into groups of 3, 6, 9 and 10 day feeding duration. The loss of antinociceptive effect of morphine in the tail flick test was used for evaluating the degree of tolerance. Physical dependence was assessed following the administration of a 5 mg/kg dose of naloxone, by counting the occurrence of withdrawal jumps and forepaw tremors for 20 min. At the end of each period, animals were anesthetized and blood samples were collected from the heart. The plasma levels of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, L-arginine and L-homoarginine in morphine tolerant and dependent mice were not different from duration-matched control mice. Similarly, no difference was observed in plasma asymmetric dimethylarginine and the other molecules concentrations between groups of mice with different stages of development of tolerance and dependence. Our results suggest that endogenous asymmetric dimethylarginine,

symmetric dimethylarginine, homoarginine and L-arginin levels remain unchanged during the development of morphine tolerance and dependence, and are not associated with these phenomena.

Keywords: morphine, tolerance, dependence, asymmetric dimethylarginine, nitric oxide.

KAYNAKLAR

1. Benedetti F, Vighetti S, Amanzio M, Casadio C, Oliaro A, Bergamasco B et al. Dose-response relationship of opioids in nociceptive and neuropathic postoperative pain. Pain 1998;74:205-11.

2. MacFarlane BV, Wright A, O'Callaghan J, Benson HAE. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. Pharmacol Ther 1997;75:1-19.

3. Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. Lancet 1999;353:1959-64.

4. Devulder JE. Could nitric oxide be an important mediator in opioid tolerance and morphine side effects? J Clin Anesth 2002;14:81-2.

5. Synder SH, Bredt DS. Nitric oxide as a neuronal messenger. Trends Pharmacol Sci 1991;12:125-8.

6. Ulugol A, Arikan E, Dost T, Dokmeci D, Karadag CH, Dokmeci I. The role of nitric oxide in the protective effect of insulin against pentylenetetrazole-induced seizures in mice. Neurosci Res Commun 2000;26:87-91.

7. Tsikas D, Boger RH, Sandmann J, Bode-Boger SM, Frolich JC. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. FEBS Lett 2000;478:1-3.

8. Ulugol A, Aslantas A, Karadag CH, Bulbul ED, Tuncer A, Dokmeci I. The effect of combined systemic administration of morphine and L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, on behavioral signs of neuropathic pain in rats. Neurosci Res Commun 2002;30:143-53.

9. Masuda H, Goto M, Tamaoki S, Azuma H. Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycaemia. Brit J Pharmacol 1999;126:211-8.

10. Xiong Y, Lu R, Li YJ, Deng HW. Elevation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in diabetic rat serum. Acta Pharmacol Sin 1997;18:511-4.

11. Xiong Y, Juan LW, Deng HW, Li YJ, Chen BM. Elevated serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and endothelial dysfunction in aged rats. Clin Exp Pharmacol Pysiology 2001;28:842-847.

12. Xiong Y, Lei M, Fu S, Fu Y. Effect of diabetic duration on serum concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in patients and rats with diabetes. Life Sci 2005;77:149-59.

13. Yang ZC, Xia K, Wang L, Jia SJ, Li D, Zhang Z et al. Asymmetric dimethylarginine reduced erythrocyte deformability in streptozotocin-induced diabetic rats. Microvasc Res 2007;73:131-6.

14. Kielstein A, Tsikas D, Galloway GP, Mendelson JE. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) – A modulator of nociception in opiate tolerance and addiction? Nitric Oxide-Biol Ch 2007;17:55-9.

15. Ulugol A. Modulatory role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in cannabinoid tolerance and dependence. Med Hypotheses 2009;73:213-4.

16. Özyalçın SN, Koltka K, Uyar M. Akut ağrı genel bilgiler. Özyalçın SN (Editör). Akut ağrı' da. Ankara: Güneş Kitapevi; 2005. s.1-24.

17. Önal A. Ağrı. Önal A (Editör). Algoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2004. s.1-20.

18. Kayaalp SO. Opioid analjezikler. Kayaalp SO (Editör). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, 12. Basım. Ankara: Feryal Matbaacılık; 2009. s.796-815.

19. Twycross RG. The relief of pain in far-advanced cancer. Reg Anesth 1980;5:2-11.

20. Raja SN, Meyer RA, Ringkamp M, Cambell JN. Pripheral neural mechanisms of nociception. Wall PD, Melzack R (Edited by) Textbook of Pain.4th Edition. Hong Kong: Harcourt Publisher Limited; 1999. s. 11-59.

21. Erdine S. Ağrı mekanizmaları ve ağrıya genel yaklaşım. Erdine S (Editör). Ağrı, 3. Basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2007 s.37-48.

22. Ertekin C. Ağrının nöroanatomi ve nörofizyolojisi. Yegül İ (Editör). Ağrı ve tedavisi. İzmir: Yapım Matbaacılık; 2003. s. 1-13.

23. Rexed B.A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. J Camp Neural 1954;100:297-379.

24. Aydın ON. Ağrı ve ağrı mekanizmalarına güncel bakış. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2002;3(2):37-48.

25. Arçay A. Ağrı fizyolojisi, ağrı mekanizmaları ve ağrılı hastanın değerlendirilmesi. İlaç ve Tedavi Derg 1993;6:99-104.

26. Raj PP. Ağrı taksonomisi. Erdine S (Editör). Ağrı, 3. Basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2007. s.19-26.

27. Stannard C. Nöropatik ve santral ağrı (Çeviri: İ Karacan). Karacan İ, Özaras N (Editörler). Ağrı, 1. Basım. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevi; 2007. S 293-315.

28. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980; 288:373-6.

29. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:9265-9.

30. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987;327:524-6.

31. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 1988;333:664-6.

32. Güray A, Samancı N, Ovalı F, Dağoğlu T. Nitrik oksit: Fizyolojik ve klinik önemi. T Klin Tıp Bilimleri 1997;17:115-19.

33. Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İH. Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri. T Klin Tıp Bilimleri 2000;20:107-11.

34. Özkan M, Yüksekol İ. Nitrik oksit ve akciğer. Toraks dergisi 2003;4(1):88-94.

35. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet 1992;339:572-5.

36. Lloyd-Jones DM, Bloch KD. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. Annu Rev Med 1996;47:365-75.

37. Moncada S, Higgs A. The L-arginin nitric oxide pathway. N Engl J Med 1993; 329:2002-12.

38. Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide: actions and pathological roles. Neuroscientist 1995;1:7-18.

39. Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitrice oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:7797-801.

40. Tottrup A, Glavihd EB, Svane D. Involvement of the L-arginine-nitric oxide pathway in internal anal sphincter relaxation.Gastroentrology 1992;102:409-15.

41. Elli M, Özkaya O. Böbreğin gelişiminde nitrik oksid'in fizyopatolojik rolü. T Klin Pediyatri 2003;12:252-9.

42. Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penil erection. Science 1992;257:401-3.

43. Yılmaz İ. Farlerde dipirona karşı gelişen analjezik toleransta nitrik oksidin rolü (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2008.

44. Y. Kakimoto, S. Akazawa. Isolation and identification of N-G, N-Gand N-G, N0-G-dimethyl-arginine, N-epsillon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine, J Biol Chem 1970;245:5751–8.

45. Vallence P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Endogenous dimethy-l-arginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. J Cardiovasc Pharmacol 1992;20:60-2.

46. Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, MorimatsuM et al. Regulation of cytokine induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine. Circ Res 2003;92:226–33.

47. Teerlink T, Nijveldt RJ, Jong S, van Leeuwen PAM. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological sample by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem 2002;303:131-7.

48. Vallence P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet 1992;339:572-5.

49. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: A novel marker of atherosclerosis. Circulation 1999;99:1141-6.

50. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? Arterioscl. Throm Vas Biol 2000;20:2032-37.

51. Paik WK, Kim S. Protein methylase I, purification and properties of the enzyme. J Biol Chem 1968;243:2108-14.

52. Leiper JM, Vallence P. The synthesis and metabolism of asymmetric dimethylarginine (ADMA). Eur J Clin Pharmacol 2006;62:33-8.

53. Ogawa T, Kimoto M, Sasaako K. Detection of N^G, N^G-dimethylarginine dimethyl-aminohydrolase, from rat kidney. J Biol Chem 1989;264:10205-9.

54. Mugge A, Hanefeld, Böger RH. Plasma concentration of ADMA and the risk of coronary heart disease: rationale and design of the multicenter cardiac study. Atherosclerosis Supp 2003;4:29-32.

55. Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells. Circulation Research 2000;87:99-105.

56. Siroen MPC, van der Sijp JRM, Teerlink T, van Schaik C, Nijeveldt RJ, van Leeuwen PAM. The human liver clears both asymmetric and symmetric dimethylarginine. Hepatology 2005;41:559-65.

57. Curgunlu A, Uzun H, Bavunoglu I, Karter Y, Genc H, Vehid S. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in white coat hypertension. J Hum Hypertens 2005;19:629-33.

58. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:1455-9.

59. Krzyzanowska K, Mittermayer F, Krugluger W, Schnack C, Hofer M, Woltz M et al. Asymmetric dimethylarginine is associated with macrovascular disease and total homocysteine in patients with type 2 diabetes. Atherosclerosis 2006;189:236-40.

60. Paiva H, Lehtimaki T, Laakso J, Ruokonen L, Rantalaıho V, Wırta O et al. Plasma concentrations of asymmetric-dimethylarginine in type 2 diabetes associate with glycemic control and glomerular filtration rate but not with risk factors of vasculopathy. Metabolism 2003;52:303-7.

61. Altinova AE, Arslan M, Sepici-Dincel A, Akturk M, Altan N, Toruner FB. Uncomplicated type 1 diabetes is associated with increased asymmetric dimethylarginine concentrations. J Clin Endocr Metab 2007;92:1881-5.

62. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Circulation 2002;106:987-92.

63. Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. Clin Sci Lond 2001;100:161-7.

64. Eid HM, Arnesen H, Hjerkinn EM, Lyberg T, Seljeflot I. Relationship between obesity, smoking, and the endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine. Metabolism 2004;53:1574-9.

65. Konukoglu D, Uzun H, Firtina S, Cigdem Arica P, Kocael A, Taskin M. Plasma adhesion and inflammation markers: asymmetrical dimethyl-Larginine and secretory phospholipase A2 concentrations before and after laparoscopic gastric banding in morbidly obese patients. Obes Surg 2007;17:672-8.

66. Cross JM, Donald A, Vallance PJ, Deanfield JE, Woolfson RG, MacAllister RJ. Dialysis improves endothelial function in humans. Nephrol Dial Transplant 2001;16:1823-29.

67. Zaccoli C, Böger SMB, Mallamaci F, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino SL et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. Lancet 2001;358:2113-7.

68. Dökmeci İ. Opiyoid analjezikler. Dökmeci İ (Editör). Farmakoloji-ilaçlar ve etkileri, 1.basım. İstanbul: Alfa Basım Yayım;2007. s.553-77.

69. Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC. Opioid analjezikler ve antagonistleri (Çeviri Atagündüz P). Oktay Ş, Berkman K, Onat F, Gören Z (Editörler). Lippincott's ılustrated review serisinden farmakoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi 1998. s.133-42.

70. D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. J Pharmacol Exp Ther 1941;72:74-9.

71. Woolfe G, MacDonald AD. The evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride. J Pharmacol Exp Ther 1944;80:300-7.

72. Eddy NB, Leimbach D. Synthetic analgesic. II. Diethienybutenyl- and dithienylbuthylamines. J Pharmacol Exp Ther 1953;107:385-93.

73. Raghavendra V, Kulkarni SK. Possible mechanisms of action in melatonin reversal of morphine tolerance and dependence in mice. Eur J Pharmacol 2000;409:279-89.

74. Bhargava HN, Bian JT, Kumar S. Mechanism of attenuation of morphine by chronic treatment with L-arginine. J Pharmacol Exp Ther 1997;281:707-12.

75. Bhargava HN, Cao YJ, Zhao GM. Effect of 7-nitroindazole on tolerance to morphine, U-50,488H and [D-Pen2, D-Pen5] enkephalin in mice. Peptides 1997;18:797-800.

76. Heinzen EL, Pollack GM. The development of morphine antinociceptive tolerance in nitric oxide synthase-deficient mice. Biochem Pharmacol 2004;67:735-41.

77. Martin TJ, Eisenach JC. Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. J Pharmacol Exp Ther 2001;299:811-7.

78. Koch T, Höllt V. Role of receptor internalization in opioid tolerance and depence. Pharmacol-Therepeut 2008;117:199-206.

79. Heinzen EL, Pollack GM. Pharmacodynamics of morphine-induced neuronal nitric oxide production and antinociceptive tolerance development. Brain Res 2004;1023:175-84.

80. Liu JG, Anand KJ. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. Brain Res Rev 2001;38:1-19.

81. Taylor DA, Fleming WW. Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. J Pharmacol Exp Ther 2001;297:11-8.

82. Bhargava HN. Diversity of agents that modify opioid tolerance, physical dependence, abstinence syndrome and self administrative behavior. Pharmacol Rev 1994;46:293-324.

83. Dambisya YM, Lee TL. Role of nitric oxide in the induction and expression of morphine tolerance and dependence in mice. Br J Pharmacol 1996;117:914-8.

84. Zhang L, Yu Y, Mackin S, Weight FF, Uhl GR, Wang JB. Differential μ opiate receptor phosphoryllation and desensitization induced by agonists and phorbol esters. J Biol Chem 1996;271:11449-54.

85. Arden JR, SegredoV, Wang Z, Lameh J, Sadee W. Phosphoryllation and agonist-spesific intracelluler trafficking of an epitope-tagged μ-opioid receptor expressed in HEK 293 cells. J Neurochem 1995;65:1636-45.

86. Schulz S, Mayer D, Pfeiffer M, Stumm R, Koch T, Höllt V. Morphine induces terminal μ-opioid receptor desensitization by sustained phosphoryllation of serine-375. EMBO J 2004;23:3282-9.

87. Schmidt H, Schulz S, Klutzny M, Koch T, Händel M, Höllt V. Involvement of mitogen-activated protein kinase in agonist-induced phosphorylation of the μ-opioid receptor in HEK 293 cells. J Neurochem 2000;74:414-22.

88. Mestek A, Hurley JH, Bye LS, Campbell AD, Chen Y, Tian M et al. The human μ-opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C. J Neurosci 1995;15:2396-406.

89. Celver J, Xu M, Jin W, Lowe J, Chavkin C. Distinct domains of the μ-opioid receptor control uncoupling and internalization. Mol Pharmacol 2004;65:528-37.

90. Law PY, Wong YH, Loh HH. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2000;40:389-430.

91. Koch T, Schulz S, Schröder H, Wolf R, Raulf E, Höllt V. Carboxyl-terminal splicing of the rat μ-opioid receptor modulates agonist-mediated internalization and receptor resensitization. J Biol Chem 1998;273:13652-7.

92. Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. Physiol Rev 2001;81:299-343.

93. Borgland SL, Connor M, Osborne PB, Furness JB, Christie MJ. Opioid agonists have different efficacy profiles for G protein activation, rapid desensitization, and endocytosis of μ-opioid receptors. J Biol Chem 2003;278:18776-84.

94. Law PY, Hom DS, Loh HH. Opiate receptor downregulation and desensitization in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells are two separate cellular adaptation processes. Mol Pharmacol 1983;24:413-24.

95. Zadina JE, Chang SL, Ge LJ, Kastin AJ. μ-Opiate receptor down-regulation by morphine and up-regulation by naloxone in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. J Pharmacol Exp Ther 1993;265:254-62.

96. Yabaluri N, Medzihradsky F. Down-regulation of μ-opioid receptor by full but not partial agonists is independent of G protein coupling. Mol Pharmacol 1997;52:896-2.

97. Holaday JW, Hitzemann RJ, Curell J, Tortella FC, Belenky GL. Repeated electroconvulsive shock or chronic morphine treatment increase the number of 3H-D-Ala2, D-Leu5-enkephalin binding sites in rat brain membranes. Life Sci 1982;31:2359-62.

98. Dingledine RR, Valentino RJ, Bostock ME, King ME, Chang KJ. Down-regulation of δ-but not μ-opioid receptors in the hippocampal slice associated with loss of physiological response. Life Sci 1983;33:333-6.

99. Klee WA, Streaty RA. Narcotic receptor sites in morphine-dependent rats. Nature 1974;248:61-3.

100. Bhargava HN, Thorat SN. Evidence for a role of nitric oxide of the central nervous system in morphine abstinence syndrome. Pharmacology 1996;52:86-91.

101. Kolesnikov YA, Pick CG, Pasternak GW. NG-nitro-L-arginine prevents morphine tolerance. Eur J Pharmacol 1992;221:399-400.

102. Pasternak GW, Kolesnikov YA, Babey AM. Perspectives on the N-methyl-D-aspartate/nitric oxide cascade and opioid tolerance. Neuropsychopharmacol 1995;13:309-13.

103. Elliot K, Minami N, Kolesnikov YA, Pastarnak GW, Inturrissi CE. The NMDA receptor agonists, LY 274614 and MK 801, and the nitric oxide synthase inhibitor, N^G-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the μ-opioid morphine but not to kappa opioids. Pain 1994;56:69-75.

104. Countinho-Netto J, Abdull-Ghani A, Bradfort HF. Suppression of evoked and spontaneous release of neurotransmitters in vivo by morphine. Biochem Pharmacol 1980;29:2777-80.

105. Crowder JM, Norris DK, Bradfort HF. Morphine inhibition of calcium fluxes, neurotransmitter release and protein and lipid phosphorylation in brain slices and synaptosomes. Biochem Pharmacol 1986;35:2501-780.

106. Vlaskovska M, Schramm M, Nylander I, Kasakov L, You ZB, Herrera-Marschitz M et al. Opioid effects on $^{45}Ca^{2+}$ uptake and glutamate release in rat cerebral cortex in primary culture. J Neurochem 1997;69:517-24.

107. Yang TT, Hung CF, Lee YJ, Su MH, Wang SJ. Morphine inhibits glutamate exocytosis from rat cerebral cortex nevre terminals by reducing Ca^{2+} influx. Synapse 2004;51:83-90.

108. Zhang T, Feng YZ, Rockhold RW, Ho IK. Naloxone-precipitated morphine withdrawal increases pontine glutamate levels in rat. Life sci 1994;55:25-31.

109. Trujillo KA, Akil H. Inhibition of morphine tolerance and depence by the NMDA receptor antagonist MK-801. Science 1991;251:85-7.

110. Bredt DS, Synder SH. Nitric oxide, a novel neuronal mesenger. Neuron 1992;8:3-11.

111. Buccafusko JJ, Terry AV, Shuster L. Spinal NMDA receptor-nitric oxide mediation of the expression of morphine withdrawal symptoms in the rat. Brain Res 1995;679:189-99.

112. Barjavel MJ, Bhargava HN. Effect of morphine tolerance and abstinence on nitric oxide synthase activity in brain regions and spinal cord of the mouse. Soc Neurosci Abstr 1994;20:A1234.

113. Leza JC, Lizasoain I, San-Martin-Clark O, Lorenzo P. Morphine-induced changes in cerebral and cerebellar nitric oxide synthase activity. Eur J Pharmacol 1995;285:95-8.

114. Bhargava HN. Nitric oxide synthase inhibition blocks tolerance to the analgesic action of k-opiate receptor agonist in the rat. Pharmacology 1998;52:86-91.

115. Zhao GM, Bhargava HN. Effect of antagonism of NMDA receptor on tolerance to (D-Pen^2,D-Pen^5) enkaphalin, a δ^1-opioid receptor agonist. Peptides 1996;17:233-6.

116. Pataki I, Telegdy G. Further evidence that nitric oxide modifies acute and chronic morphine action in mice. Eur J Pharmacol 1998;357:157-62.

117. Auget M, Viossat I, Marin JG, Chabrier PE. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by agmantine. J Pharmacol 1995;69:285-7.

118. Kito KF, Fairbanks CA. Supraspinally adminestered agmantine prevents the development of supraspinal morphine analgesic tolerance. Eur J Pharmacol 2006;536:133-7.

119. Madrigal JLM, Moro MA, Lizosoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Bosca L et al. Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stres is regulated by nuclear factor k β-mediated mechanism. J Neurochem 2001;76:532-41.

120. Moro MA, Lizosoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, Bosca L et al. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. J Neurochem 2000;74:785-91.

121. Golde S, Chandran S, Brown GC, Compston A. Different patways for iNOS-madiated toxicity in vitro dependent on neuronal maturation and NMDA receptor expressin. J Neurochem 2002;82:269-82.

122. Iravani MM, Lui L, Rose S, Jenner P. Role of inducible nitric oxide synthase in N-methyl-d-aspartic acid-induced strionigral-degeneration. Brain Res 2004;1029:103-13.

123. Abdel-Zeher AO, Hamdy MM, Aly SA, Abdel-Hady RH, Abdel-Rahman S. Attenuation of morphine tolerance and depence by aminoguanidine in mice. Eur J Pharmacol 2006;540:60-6.

124. Heinzen EL, Booth RG, Pollack GM. Neuronal nitric oxide modulates morphine antinociceptive tolerance by enhancing constitutive activity of the μ-opioid receptor. Biochem Pharmacol 2005;69:679-88.

125. Mayer DJ, Mao J, Holt J, Prıce DD. Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. Proc Natl Acad Sci 1999;96:7731-6.

126. Zhuo M, Meller S, Gebhart G. Endogenous nitric oxide is required for tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission. Pain 1993;54:71-8.

127. Masters BS. Nitric oxide synthase: why so complex? Annu Rev Nutr. 1994;14:131-45.

128. Brosnan CF, Battistini L, Raine CS, Dickson DW, Vall A, Lee SC. Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology. An overview. Dev Neurosci 1994;16:152-61.

129. Brignola G, Galignano A, Di Rosa M. Modulation of morphine antinociception in the mouse by endogenous nitric oxide. Br J Pharmacol. 1994;113:1372-6.

130. Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, Mclaughlin T, Reaven GM et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. Am J Cardiol 2001;88:1201-3.

131. Arikan E, Karadag CH, Guldiken S. Asymmetric dimethylarginine levels in thyroid diseases. J Endocrinol Invest 2007;30:186-91.

132. Bode-Böger SM, Scalera F, Ignarro LJ. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. Pharmacol Therapeut 2007;114:295-306.

133. Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. Genomics 2000;68:101-5.

134. Tsikas D, Boger RH, Sandmann J, Bode-Boger SM, Frolich JC. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. FEBS Lett 2000;478:1-3.

135. Valtonen P, Laitinen T, Lyyra-Laitinen T, Raitakari OT, Juonala M, Viikari JS et al. Serum L-homoarginine concentration is elevated during normal pregnancy and is related to flow-mediated vasodilatation. Circ J 2008;72:1879-84.

EKLER

EK-1

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2 **Karar Tarihi:16. 02.2009**

KARAR NO: 2009/02.16

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'ün yaptığı TÜHDYEK- 2009/023 protokol nolu "Endojen nitrik oksid sentaz inhibitörü asimetrik dimetilarginin'in (ADMA) morfin tolerans ve bağımlılığındaki modülatör rolü" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvani/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
İlyas ÖZMEN Sivil Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. S. Arzu VARDAR Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☒ var ☐ yok	☒ evet ☐ hayır	
Doç. Dr. Nilda TURGUT Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAŞ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	

EK-2

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ

SAYI : B.30.2.TRK.0.70.73.0/ 2936 -9379
KONU :

EDİRNE
20 -05- 2009

Sayın Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL
Trakya Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
EDİRNE

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz ve Arş. Gör. Dr. Özgür GÜNDÜZ'ün "Endojen Nitrik Oksid Sentaz İnhibitörü Asimetrik Dimetilarginin'in (ADMA) morfin Tolerans ve Bağımlılığındaki Modülatör Rolü " başlıklı tıpta uzmanlık projesinin, 6 (altı) ay süre ve 15.000,00 TL ile desteklenmesine, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 29.04.2009 tarih ve 2009/02 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 12. maddesi uyarınca düzenlenen ve ekte sunulan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sözleşmesi'nin tarafınızca imzalanarak 1 (bir) hafta içinde Rektörlüğe iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Beyhan KARAMANLIOĞLU
Rektör Yardımcısı ve
Komisyon Başkanı

EK: 1 adet protokol sözleşmesi

Posta Adresi
Trakya Üniversitesi Rektörlüğü
22050 Karaağaç/ EDİRNE

Tel : 0 284 223 13 85
e-mail: tubap@trakya.edu.tr

Faks : 0 284 223 08 48