



Farelerde Oluşturulan Deneysel Nöropatik Ağrıya Karşı Tramadol ve Agmatinin Etkilerinde Nitrerjik Sistemin Rolü

The Role of Nitrergic System on The Effects of Tramadol and Agmatine in An Experimental Neuropathic Pain Model

Soner Mete¹, Fazilet Aksu²

¹Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, İncekara Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, NEVŞEHİR

²Cukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, ADANA

Cukurova Medical Journal 2015;40(1):42-54.

ÖZET

Amaç: Yaşam kalitesini düşüren nöropatik ağrının tedavisinde antikonvülsanlar, antidepresanlar, lokal anestezipler, sodyum kanal blokörleri, narkotik analjezikler gibi ilaçlar kullanılmakla birlikte alternatif tedaviler üzerine de yoğun olarak çalışılmaktadır. Bu ilaçlardan birisi olan tramadol (TR)'un, nöropatik ağrı semptomlarını azalttığı bildirilmiştir. Santral sinir sisteminde yeni bir nöromedyatör olarak bilinen agmatin (AG)'in ise deneysel akut ve kronik ağrı çalışmalarında antinosiseptif etkileri olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda, siyatik sinir parsiyel sıkı ligasyonu ile oluşturulan nöropatik ağrı modelinde TR ve AG'in tek başına ve kombine kullanıldıklarında antiallodinik etkileri ile bu etkilerde nitrerjik sistemin rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışmada Balb/c türü erkek farelere anestezi altında sağ siyatik sinir bağlanarak nöropati oluşturuldu. Naive, sham, nöropati kontrol ve nöropati + ilaç grupları oluşturuldu. Nöropatik ağrı ameliyattan iki hafta sonra soğuk plaka testi ile değerlendirildi. TR ve AG'in antiallodinik etkileri incelendi. Bu etkilerde nitrerjik sistemin rolünü araştırmak üzere nitrik oksid prekürsörü L-arjinin (LA), nitrik oksid sentaz (NOS) inhibitörleri N-Nitro-L-arjinin Metil Ester (L-NAME), N-Metil-L-arjinin Asetat (L-NMMA) ve 7-Nitroindazol (7-NI) kullanıldı. Son olarak TR ve AG kombinasyonunun antiallodinik etkisi incelendi.

Bulgular: Deneylerin sonuçlarına göre TR ve AG, nöropati oluşturulan farelerde cold-plate latensini uzatarak antiallodinik etki oluşturdu. LA, TR ve AG'in antiallodinik etkisini değiştirmede. Uygulanan üç NOS inhibitörü TR'un antiallodinik etkisini artırırken, AG'in etkisini sadece L-NAME artırdı. Kombine uygulanan TR ve AG, tek başlarına göstermiş olduklarından daha yüksek bir antiallodinik etki gösterdiler.

Sonuç: Bulgularımıza göre TR ve AG'in nöropatik ağrıda ümit veren bileşikler olduğu ve iki bileşiğin kombine kullanımının daha etkili olacağı söylenebilir. Bu maddelerin antiallodinik etkilerinde NOS inhibisyonunun rolü farklı dereceldedir ve etkilerinde sadece NOS inhibisyonu değil, farklı mekanizmalar da rol oynayabilir.

Anahtar kelimeler: Agmatin, Nitrerjik sistem, Nöropatik Ağrı, Tramadol

ABSTRACT

Purpose: Anticonvulsants, antidepressants, local anesthetics, sodium channel blockers, drugs such as narcotic analgesics but also on alternative therapies has been extensively studied in the treatment of neuropathic pain (NP) which reduces quality of life. Tramadol (TR) which is one of these drugs has been reported to reduce the symptoms of neuropathic pain. Agmatine (AG) is a new neuromediators in the central nervous system and acute and chronic experimental pain studies have reported that the antinociceptive effects. In our study, TR and AG when used alone and

in combination antiallodynic effects and this effect was aimed to investigate the role of nitregeric system created by the sciatic nerve ligation model of neuropathic pain in.

Materials and Methods: Experimental mononeuropathy was developed by ligation of right sciatic nerve of mice under general anesthesia. Mice were divided into naive, sham, neuropathy control (NP) and NP + drugs groups. Neuropathic pain was evaluated by cold plate test after two weeks operation. The antiallodynic effects of TR and AG were assessed. Nitric oxide precursor L-arginin (LA), nitric oxide synthase (NOS) inhibitors L-NAME, L-NMMA and 7-NI were used to investigate the role of nitric oxide in these effects. Lastly, the combined effects of TR and AG was determined.

Results: According to the results of experiments, TR and AG, developed neuropathy in mice showed the antiallodynic effects by extending cold plate latency (CPL). LA did not changed the effects of TR and AG. All NOS inhibitors enhanced the antiallodynic effect of TR while only L-NAME enhanced the effect of AG. The combined use of TR and AG showed greater antiallodynic effect than the effects of individual drugs.

Conclusion: According to findings, TR and AG are promising drugs for treatment of NP and combined use of these drugs may be more effective. The role of inhibition of NOS in the antiallodynic effects of these two drugs were different in extent and the other possible mechanisms beside NOS inhibition may involve in the effects of these two drugs.

Key words: Agmatine, Nitregeric system, Neuropathic pain, Tramadol

GİRİŞ

Nöropatik ağrı, periferik veya santral sinir sisteminin (SSS) bir kısmının zedelenmesi, fonksiyonunun bozulması veya uyarılabilirliğinin değişmesi ile ilgili bir ağrıdır. Nöropatik ağrının patofizyolojisi henüz net olarak tanımlanamamıştır. Günümüze değin konu ile ilgili olarak birçok insan ve hayvan çalışması yapılmış, patogenez açıklanmaya çalışılmış, tedavi seçenekleri geliştirilmiştir^{1,2}.

Nöropatik ağrı, periferik veya santral sinir sisteminden kaynaklanan ve ilgili nöral yapıların uyardığı bölgelerde hissedilen ağrılara verilen genel isimdir. Normalde ağrı, oluşan doku hasarı ile ilgili olarak organizma için uyarıcı bir fonksiyona sahiptir^{1,2}. Nöropatik ağrının nosiseptif ağrıdan en belirgin farkı, sürekli bir nosiseptif uyarının bulunmamasıdır. Sorunu başlatan bir malfonksiyondur ve bu durum diyabet, immün yetmezlikler, inflamatuar süreçler, malign, travmatik ve iskemik durumlar gibi, periferik ya da santral nedenlerden de köken alabilir³. Fakat nöropatik ağrı, hala tedavisi güç ağrı sendromları arasında bulunmaya devam etmekte ve bazı durumlarda yeterli analjezi sağlanamamaktadır. Bu nedenlerden dolayı nöropatik ağrı gerek patofizyolojisi gerekse tedavisi ile uzun yıllardır klinisyenler ve araştırmacılar açısından ilgi odağı olmuştur⁴.

Allodini ve hiperaleji, nöropatik ağrının en önemli klinik belirtilerindedir. Bu davranışsal belirtilerin insanlarda oluşmasının yanı sıra deneysel nöropatik ağrı modellerinde de görüldüğü belirlenmiştir. Sıçanlarda parsiyel sinir zedelenmesine bağlı olarak ortaya çıkan nöropati modelleri, en sık kullanılan ve en geçerli yöntemler arasındadır. Bu modellerde allodini ve hiperaleji gibi nöropatik ağrının davranışsal belirtilerinin ortaya kolaylıkla çıktığı defalarca gösterilmiştir^{5,6}. Ancak nöropatik ağrının moleküler temel ve mekanizmalarının tamamen aydınlatılabilmesi için sadece sıçan modelleri yeterli değildir. Sıçanlarda genetik düzenleme yapılmasının zor olması, kronik ağrının moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasında fare modellerinin önemini artırmıştır^{7,8}.

Kronik ağrı durumlarının, özellikle nöropatik ağrının, ilaç tedavisine yanıtı oldukça yetersizdir⁹. Analjezikler, trisiklik antidepressanlar ve bazı antikönsülans ilaçların günümüzde nöropatik ağrı tedavisinde kullanılmalarına karşın, alınan yanıtlar ve ilaçların etkinlikleri belirgin değişiklikler göstermektedir^{9,11}. En güçlü analjezikler olarak değerlendirilebileceğimiz, morfin ve diğer opioid ilaçların bile nöropatik ağrıdaki etkinlikleri günümüzde tartışmalı olup, bu ilaçların ancak ciddi yan tesirlerinin belirgin olarak ortaya çıktığı yüksek dozlarıyla etkinlik gösterebildikleri kabul edilmektedir^{9,10,12}. Bu nedenlerle nöropatik ağrı

tedavisi için yeni ve etkin ilaçlara gereksinim duyulmaktadır.

Klinik çalışmalarda nöropatik ağrı tedavisinde etkin olduğu ortaya konan tramadol'un, siyatik sinir ligasyonu ile nöropatik ağrı modeli oluşturulan kemirgenlerde önemli derecede antinosiseptif etkinliği olduğu gözlenmiştir^{13,14}. Tramadol'un opioid reseptörlerine düşük afinite göstermesi, etkisinin naloksonla kısmen bloke edilmesi, noradrenerjik ve serotonerjik mekanizmaların katkısının tam aydınlatılamamış olması, bu ilacın etki mekanizmasında ağrı ve analjezi ile ilgili diğer sistemlerin de katkısının olabileceğini akla getirmektedir¹⁵. Öte yandan, son yıllarda yapılan pek çok çalışmada ağrı ve analjezinin modülasyonunda agmatin'in önemli rolünün olduğu gösterilmiştir. Memelilerde yeni bir santral nörotransmitter/nöromodülatör olabileceği ileri sürülen agmatin, imidazolin reseptörlerinin endojen ligandıdır¹⁶. Agmatin, imidazolin reseptörleri (I1 ve I2) dışında α 2-adrenoreseptörlere, serotonin (5-HT) ve nikotinic asetilkolin reseptörlerine de bağlanmaktadır. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör kanalı içindeki bir bölge ile etkileşerek bu reseptörleri bloke edebilmekte ve nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin tüm izoformlarını inhibe etmektedir¹⁷.

Daha önce yaptığımız bir çalışmada agmatin'in akut ağrı modelinde tramadol'un etkisini arttırdığını ve bu etkide nitretrjik sistemin katkısı olabileceğine dair bulgular elde ettik¹⁸. Öte yandan bir başka çalışmada nöropatik ağrı modelinde tramadol'un antinosiseptif etkisi olduğu ve hem NO prekürsörü L-arjinin hem de NO sentez inhibitörü L-NAME tarafından bu etkinin arttırıldığı gözlenmiştir¹⁹. Bu sonuçlardan hareketle nöropatik ağrı modelinde, L-arjinin yolağında yer alan ve NOS enzimlerini inhibe eden agmatin'in etkisinin araştırılmasının ayrıca tramadol'un antiallodinik etkisindeki rolünün incelenmesinin ilginç olabileceği görüşüne varılmıştır.

Çalışmamızda, bir kronik ağrı modeli olan

nöropatik ağrıda tramadol ve agmatin'in etkilerini değerlendirip, bu etkilerde nitretrjik sistemin rolünü incelemeyi ve her iki maddenin kombine kullanımında ortaya çıkacak etkiyi araştırmayı planladık.

MATERYAL ve METOD

Deney Hayvanı ve Barındırma Koşulları

Çalışmalarda deney hayvanı olarak, Çukurova Üniversitesi (Ç.Ü.) Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma Merkezinden (TIBDAM) temin edilen, 8 haftalıktan büyük, 25-30 gram ağırlıklarında Balb/C türü erkek fareler kullanıldı. Deneylerde kullanılan fareler her kafeste 10 tane olacak şekilde yerleştirilerek, standart laboratuvar koşullarına ve TIBDAM yönergesinde belirlenen etik kurallara uygun olarak barındırılmıştır. Deneylere başlanmadan önce Ç.Ü. Deney havanları etik kurulundan onay alınmıştır.

Ç.Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Davranış Farmakolojisi Laboratuvar'ında, farelere uygulanan cerrahi girişimler aseptik koşullarda gerçekleştirilmiştir. Bu fareler girişim sonrasında 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde, ses yalıtımlı, sıcaklık ve nemi sabit tutulan laboratuvarında, istedikleri kadar yiyebilip içecekleri yem ve su sağlanarak barındırılmıştır.

Cerrahi Operasyon

Farelerde nöropatik ağrı oluşturmak için siyatik sinir parsiyel sıkı ligasyonu (PSL) modeli kullanılmıştır. Siyatik sinir bağlama işlemi öncesinde anestezi altına alınan deney hayvanları, aseptik şartlar altında fare sağ bacak siyatik sinirine ulaşabilmek için biceps femorise yaklaşık 1cm'lik (siyatik sinirin arka kısmının 1/2 ila 1/3 kısmı) bir kesi uygulanıp kas diseksiyonu yapıldıktan sonra siyatik sinir uyluk düzeyinde ortaya çıkarılmıştır. Bu işlemde sonra siyatik sinir altındaki dokulardan temizlenip eğimli pens ile vücut dışına esnetilerek 8.0 emilmeyen iplik ile modele uygun düğüm atıldıktan sonra açılan kesi 4.0 ipek iplik ile kapatılmıştır²⁰.

Sham Operasyonu

Aseptik şartlar altında biceps femorise yaklaşık 1 cm'lik kesi uygulanıp kas seperasyonu yapıldıktan sonra siyatik sinir görölüp bağlanmaksızın kesi yeri 4.0 ipek ile kapatılmıştır. Bu grubun çalışmadaki önemi, deney hayvanında oluşturulması planlanan kronik ağrının, kas diseksiyonundan oluşacak ağrıdan ayırt edilmesi ve modelin etkinliğinin ölçülmesidir.

Cold Plate Testi

Allodini nöropatik ağrının en önemli bulgularındandır. Normalde ağrılı olmayan bir uyarana karşı verilen ağrı yanıtı olarak tanımlayabileceğimiz allodiniyi değerlendirmek için termal veya mekanik uyarılar kullanılabilir. Bunlardan en fazla kullanılanı hayvana soğuk uyarın uygulanması sonucu hayvanın reaksiyonunu ölçmektir²¹. Çalışmamızda farelerde oluşan mononöropatiye bağlı olarak oluşan kronik ağrıyı değerlendirmek için soğuk allodini testi, bunun için de cold-plate cihazı kullanılmıştır.

Cold Plate cihazı, etrafı şeffaf silindir plastik camla deney hayvanının ortamdaki uzaklaşmasına izin vermeyecek şekilde düzenlenmiş ve +5 °C sıcaklıkta sabitlenebilen dairesel metal plakadan oluşmaktadır. Cihaza bağlı pedal ile kontrol edilen otomatik zaman sayacı, plaka üzerine bırakılan deney hayvanının belirli davranışlarından birini sergileyene kadar geçen süreyi belirlemektedir. Gözlemsel olarak bu süreyi belirlemede kullanılan

Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar, ortalama \pm standart hata (S.E) şeklinde hesaplandı. Sonuçların istatistiksel

davranışlarından birisi mononöropati oluşturulmuş pençenin sallanması veya arka pençeleri üzerinde ayağa kalkmasıdır. Diğer bir hareket ise yine arka pençeleri üzerinde kalkıp silindir cama ön pençelerini dayayarak durmasıdır^{21,22}. Çalışmamızda, bahsedilen bu davranışlardan herhangi birini sergileyene kadar geçen süre saniye (sn) cinsinden belirtilmiş ve cold plate latensi olarak (CPL) tanımlanmıştır. Her fare bir uygulamada kullanılmıştır.

Deney Grupları ve Kimyasal Maddeler

Fareler deney protokolüne göre üç gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan birincisi sağlam farelerden oluşan, grafiklerde kontrol grup olarak kullanılan, hiçbir işlem yapılmamış gruptur. İkinci grup ise sham olarak adlandırılan, cilt ve kas dokusuna kesi uygulayarak siyatik sinire ulaşılmış fakat ipek iplikle bağlamadan kapatılmış gruptur. Üçüncü grup nöropati grubudur. Bu grup farelerde cerrahi operasyonda ayrıntılı olarak belirtildiği şekilde siyatik sinir bağlanarak mononöropati (NP) oluşturulmuştur. Bu gruplara Tablo 1 belirtilen kimyasal ajan uygulamaları ve cold plate testi yapılmıştır. Kullanılan ajanların dozları, ön denemelerimiz ve literatür bilgilerinden yararlanılarak belirlenmiştir. Tüm kimyasal ajanlar %0,9'luk sodyum klorür içerisindeki çözeltileri her bir fareye 0,1 ml/10g olarak intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonla uygulanmıştır.

olarak analizi için birden fazla grubun birbiriyle karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar Newman-Keuls testine göre yapıldı. 0,05' den küçük P değerleri anlamlı olarak kabul edildi (P<0,05).

Tablo 1. Deney grupları ve uygulanan kimyasal ajanlar.

Ağrı modeli	İyileşme süresi	Uygulanan ajan*	Bekleme Süresi	Ağrı testi	Değerlendirme
NP	2 Hafta	SF	30 dk	Cold Plate	CPL
NP	2 Hafta	SF + TR	30 dk	Cold Plate	CPL
		LA + TR			
		L-NAME + TR			
		D-NAME + TR			
		L-NMMA + TR			
7-NI + TR					
NP	2 Hafta	SF + AG	30 dk	Cold Plate	CPL
		LA + AG			
		L-NAME + AG			
		D-NAME + AG			
		L-NMMA + AG			
7-NI + AG					
NP	2 Hafta	AG + TR	30 dk	Cold Plate	CPL
L-NAME : N-Nitro-L-Arjinin Metil Ester (20mg/kg i.p.) LA : L-Ajinin Monohidroklorid (40mg/kg i.p.) D-NAME : N-Nitro-D-Arjinin Metil Ester (30mg/kg i.p.) TR : Tramadol Hidroklorür (50mg/kg i.p.) L-NMMA : N-Metil-L-Arjinin Asetat (30mg/kg i.p.) AG : Agmatin Sülfat (40mg/kg i.p.) 7-NI : 7-Nitroindazol (20mg/kg i.p.) SF : Serum Fizyolojik CPL : Cold Plate latensi NP : Mononöropati *Etken madde uygulamaları arası 30 dk'dır					

BULGULAR

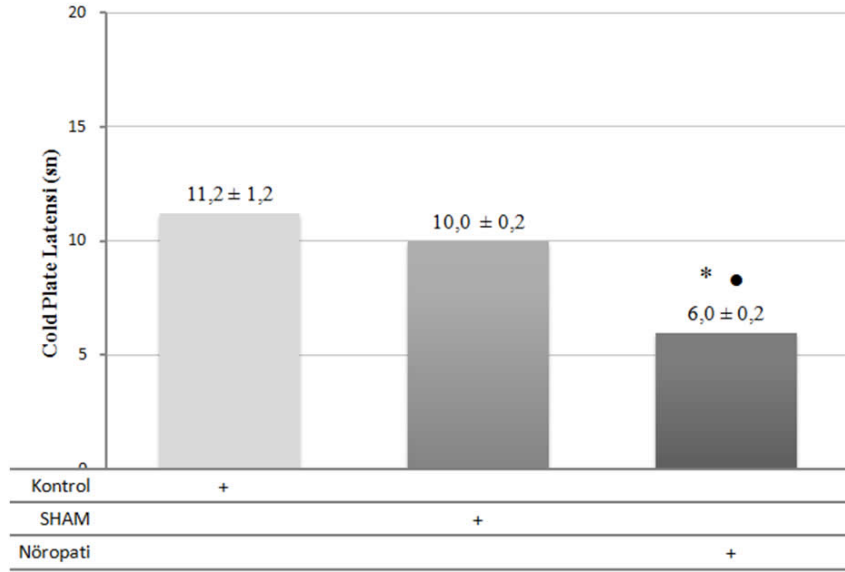
Mononöropati Yapılan Hayvanlarda Cold Plate Latensi (CPL)

Nöropatik hayvanların kiloları kontrol ve SHAM grubuna göre belirgin değişiklik göstermedi. Fiziksel görünümünde de kayda değer bir değişiklik yoktu, ancak siyatik sinir ligasyonu

yapılan taraftaki pençede dokuda değişiklikler gözlemlendi (Şekil 1). Grupların CPL, nöropati ve sham operasyonu yapıldıktan 2 hafta sonra ölçüldü. SHAM grubuna ait CPL kontrolden farklı değilken, NP grubunda CPL'nin anlamlı bir düşüş gösterdiği gözlemlendi (Şekil 2).



Şekil 1. Siyatik sinir ligasyonu yapılan ve pençelerdeki fiziksel görünüm.



Şekil 2. Kontrol, SHAM ve NP gruplarında CPL yapılmayan latensileri. *: Kontrol grubundan anlamlı olarak ($P<0,05$). • : SHAM grubundan anlamlı olarak farklı. ($P<0,05$).

TARTIŞMA

Nöropatik ağrı sinir sisteminin bir bölümünün hasarı ve/veya disfonksiyonu sonucu oluşmaktadır. Patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması ve tedavi yöntemlerinin araştırılması için günümüzde çeşitli hayvan modelleri geliştirilmiştir^{23,24}. Çalışmamızda deneysel nöropatik ağrı oluşturmak için Seltzer ve Shir tarafından tanımlanan parsiyel sıkı ligasyonu (PSL) modeli kullanılmıştır. Bu modelde hasardan sonraki ilk haftalar içerisinde gelişen belirgin ve sürekli mekanik ve soğuk allodini ile mekanik hiperaljezi altı ay boyunca devam eder. PSL modelinde hayvanlarda gözlenen ağrı davranışları nöropatik ağrı sendromlu insanlardaki pek çok semptomla benzerlik gösterir²⁰. Deneysel nöropatik ağrı modellerinde, allodini ve hiperaljezi gibi davranışsal belirtilerinin ortaya kolaylıkla çıktığı defalarca gösterilmiştir⁵. Çalışmamızda kullandığımız cold plate testi ise, farklı deneysel nöropatik ağrı modellerinde ortaya çıkan soğuk allodinin belirlenmesinde etkili bir testtir²¹⁻²⁵. Soğuk allodini, normalde ağrılı olmayan soğuk uyarana karşı artmış hassasiyet olarak tanımlanır ve klinik

nöropatik ağrı durumlarının karakteristik bir özelliğidir²⁶.

Nöropatik ağrının tedavisinde öncelikli amaç tek ilaçla ağrının hafifletilmesidir, ancak pratikte kronik nöropatik ağrıda yeterli rahatlama tek ilaç tedavisi ile çok seyrek sağlanabilmektedir. Bilinen analjeziklerin nöropatik ağrıda etkisi yoktur veya kısıtlıdır^{27,28}. Bu kompleks ve dirençli durumda, iki yada daha fazla sinerjistik etkili ilacın kombine kullanımına sıklıkla ihtiyaç duyulur.

Çalışmamızda etkisini araştırdığımız ilaçlardan birisi olan tramadol, hem opioid hem de nonopioid etki mekanizmaları aracılığıyla kuvvetli analjezik etki göstermektedir. Ayrıca opioidlere göre daha az konstipasyon, sedasyon ve immün supresyon yapması, solunum depresyonu ve bağımlılık riskinin çok düşük olması, kronik ağrının tedavisinde tramadol'un önemini artırmıştır^{29,30}.

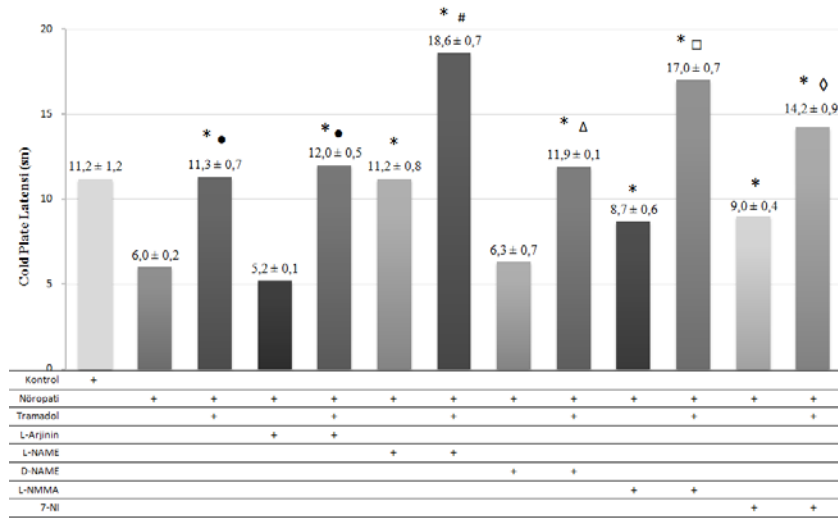
Adjuvan ilaçların terapötik açıdan faydaları, güçlü bir analjezi oluşumuna katkıda bulunmalarının yanı sıra majör ilaçların dozlarının düşürülmesine imkan tanımaları ve özellikle de opioidlere bağlı ciddi yan tesirlerin (bulantı-kusma, konstipasyon, kaşıntı, sedasyon ve solunum

depresyonu gibi) sıklığını azaltmaları şeklinde özetlenebilir³¹. nöropatik ağrıdaki etkinliklerini ayrı ayrı değerlendirdiğimiz tramadol ve agmatin'i birlikte kullanarak kısmen opiaterejik etki gösteren tramadol'un dozunu daha fazla yükseltmeden etkinliğini agmatin'le (adjuvan) artırmanın mümkün olup olmayacağını araştırdık

Araştırmamızın ilk kısmında, nöropatik ağrıda tramadol'un antiallodinik etkisi ve bu etkide nitreerjik sistemin rolü incelenmiştir (Şekil 3). Tramadol (TR), cold plate latensini (CPL) kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırmıştır (antiallodinik etki). Bu çalışmada kullandığımız tramadol dozunu ön denemelere, bu laboratuarda başka bir çalışmada yapılan doz-cevap eğrisi sonuçlarına¹⁹ ve literatürdeki dozlara göre seçtik. NP'li gruba uygulanan NO prekürsörü LA, tek başına antiallodinik etki oluşturmamıştır. Ayrıca TR'nin antiallodinik etkisini de değiştirmemiştir. Bu bulgu

bazı çalışmalarla uyumlu olmasına rağmen¹⁹, literatürdeki bazı çalışmalarla uyumsuzdur^{32,33}. Aynı yöntemle nöropatik ağrı oluşturulan farelerde LA, hot-plate latensini uzatmış, başka bir deyişle termal aljeziyi önlemiştir¹⁹. Ayrıca sözü edilen çalışmada LA, tramadol'un etkisini de artırmıştır¹⁹. Sonuçların farklı olmasının nedeni bu çalışmamızda nöropatik ağrıyı değerlendirmede soğuk allodini yöntemini seçmiş olmamız olabilir. Soğuk allodini, nöropatik ağrının önemli bir belirtisi olarak literatürde tercih edilen bir yöntemdir²¹. Öte yandan bizim bulgularımızla uyumlu olarak, LA'nın birçok ağrı testinde etkisi olmadığını bildiren çalışmalar da vardır: Örneğin, farelerde kuyruk çekme ve abdominal kıvrınma testleri ile morfin-L-arjinin etkileşmesinin incelendiği bir çalışmada, LA'nın tek başına uygulanmasının abdominal kıvrınma sayısında etkisinin olmadığı ve morfinin yanıtlarında değişiklik yapmadığı gösterilmiştir³².

Cold Plate Testinde Tramadol ve Nitreerjik Sistemin Etkileşimi



Şekil 3. Cold plate testinde tramadol ve nitreerjik sistemin etkileşimi. *: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklıdır (P<0,0001). •: Nöropati + L-arjinin grubundan anlamlı olarak farklıdır (P<0,0001). #: Nöropati + L-NAME ve Nöropati + Tramadol grubundan anlamlı olarak farklıdır (P<0,0001). Δ: Nöropati + D-NAME grubundan anlamlı olarak farklıdır (P<0,0006). □: Nöropati + L-NMMA ve Nöropati + Tramadol grubundan anlamlı olarak farklıdır (P<0,0001). ◇: Nöropati +7-NI ve Nöropati + Tramadol grubundan anlamlı olarak farklıdır (P<0,0001).

Çalışmamızda, NOS inhibitörlerinden L-NAME'in tek başına uygulanması, NP'li hayvanların CPL değerini artırarak antiallodinik etki

göstermiştir. Bulgularımıza benzer bir sonuç Yoon ve ark.'nın çalışmasında alınmıştır. Araştırmacılar spinal sinir ligasyonu yöntemi ile sıçanlarda

oluşturulan nöropatik ağrıda nitrik oksitin, mekanik ve soğuk allodini üzerine etkilerini incelemiş, çalışma sonucuna göre L-NAME tarafından mekanik allodininin baskılandığını, soğuk allodininin önlendiği sonucuna varmışlardır³⁴. L-NAME'in nöropatik ağrının davranışsal belirtilerini ortadan kaldırdığını gösteren çalışmalar olmasına karşın^{34,35}, Lee ve ark. spinal sinir ligasyonu yapılmış sıçanlarda gelişen mekanik allodini NO'nun rolü olmadığını ve L-NAME'nin terapötik etkilerinin NOS inhibisyonu aracılığıyla olmadığını bildirmişlerdir³⁶.

NP'li gruba L-NAME varlığında uygulanan TR, tek başına uygulanan TR'dan daha yüksek analjezik etki oluşturmuştur. Başka bir deyişle, L-NAME, tramadol'un antinosiseptif etkisini artırmıştır. Bu, nitrik oksidin ağrı oluşumunda rolü olduğu görüşüne uyan bir sonuçtur ve birçok deneysel çalışmayla uyumludur. Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan nöropatik ağrıdaki tramadol'un antinosiseptif etkisinde NO'nun rolünün araştırıldığı çalışmada, intratekal veya intraperitoneal uygulanan NOS inhibitörü N(omega)-nitro-L-arjinin (L-NA), tramadol'un ortalama mekanik antinosiseptif eşik değerlerini anlamlı derecede düşürdüğünü göstermişlerdir³⁷. Öte yandan, tramadol'un sıçanlarda akut ağrıdaki analjezik etkisinde nitrik oksitin rolünün araştırıldığı bir çalışmada, tramadol 10 mg/kg dozunda tek başına tail immersiyon latensi süresini artırdığı, L-NAME ve 7-NI'in tramadol ile kombine kullanıldığı grupta sırasıyla tramadol'un analjezik etkisini düşürdüğü ve artırdığı gösterilmiştir³⁸. Alınan bu farklı sonuçların akut ve kronik ağrı mekanizmaların işleyişinde nitrejik sistemin farklılık gösterdiği fikrini öne çıkarmaktadır.

L-NAME etkisinin NOS inhibisyonuna bağlı olup olmadığını anlamak için L-NAME'in inaktif izomeri D-NAME'in etkisini incelediğimizde nöropatik ağrıda ne tek başına, ne de tramadol'un antiallodinik etkisi üzerine bir etkisini gözlemedik. Aldığımız bu sonucu destekler nitelikte, Yoon ve ark. nöropatik ağrıda inaktif izomer D-NAME'in,

mekanik ve soğuk allodini üzerinde herhangi bir değişiklik yapmadığı sonucuna varmışlardır³⁴.

Deneylemizde kullandığımız bir diğer NOS inhibitörü L-NMMA, hem NP'li farelere tek başına uygulandığında anlamlı antiallodinik etki oluşturmuş hem de TR ile birlikte uygulandığında etkiyi artırmıştır. Benzer sonuçlar, farelerde kuyruk çekme ve abdominal kıvrınma testleri ile morfinin antinosiseptif etkilerinde L-NAME, D-NAME ve L-NMMA ve L-arjinin etkisinin incelendiği bir çalışmada alınmış, L-arjinin ve D-NAME'in tek başına uygulanmasının abdominal kıvrınma sayısında etkisinin olmadığı ve morfinin yanıtlarında değişiklik yapmadığı gösterilmiştir. Fakat L-NAME ve L-NMMA tek başlarına uygulandıklarında hem kayda değer bir antinosisepsiyona hem de morfinin analjezik etkisinde artışa neden olmuştur. Kuyruk çekme testinde ise tek başına hiçbir madde etki göstermezken L-NAME ve L-NMMA morfinin antinosiseptif etkisini artırmış, L-arjinin azaltmış, DNAME ise etki göstermemiştir³². Deneylemimizin sonuçlarımıza göre L-NAME'in antiallodinik etkisi, LNMMA'nın antiallodinik etkisinden daha güçlüydü. Benzer bir bulguya ulaşan Babbedge ve ark. bunun sebebinin L-NAME'nin L-NMMA'dan daha güçlü bir beyin NOS inhibitörü olmasına bağlamışlardır³⁹.

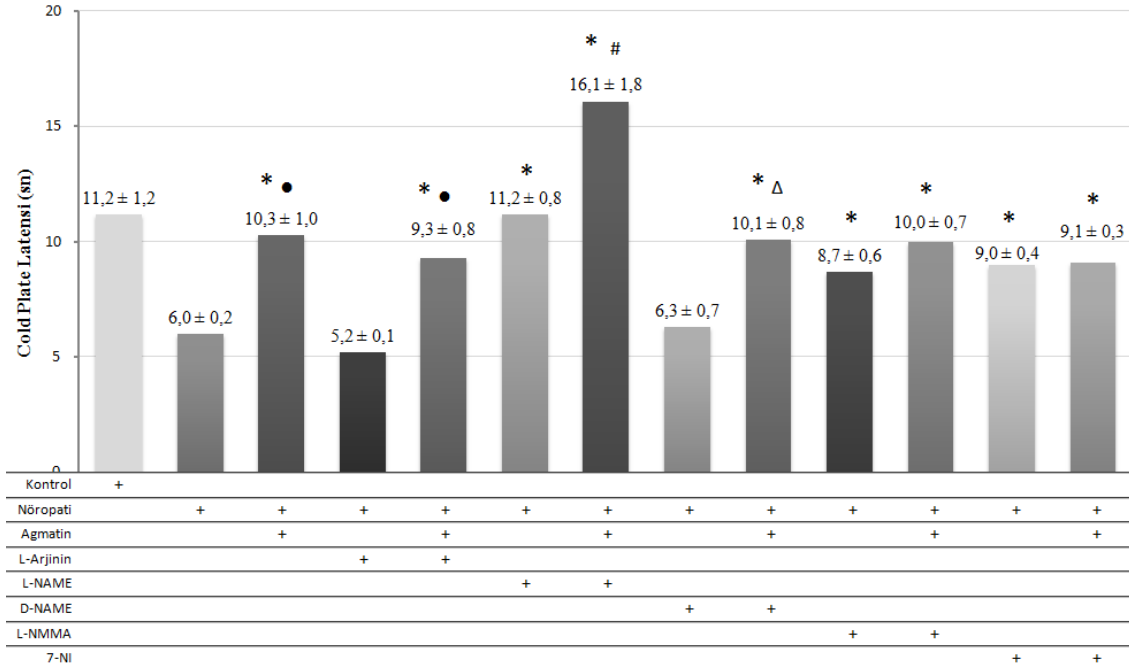
NO modülatörleri ile yaptığımız çalışmalar genel olarak NO sentez inhibisyonunun nöropatik ağrıyı azalttığı/önlediği görüşüne uygun düşmektedir. Ayrıca NOS inhibisyonunun tramadol'un nöropatik ağrıdaki etkisine aracılık ettiği de söylenebilir. Bu sonuçlar yukarıda verilen örneklerde olduğu gibi birçok literatür bulgusuyla uyumaktadır^{19,33-35,38,40,41}.

Araştırmamızın ikinci kısmında, periferik nöropatiye bağlı gelişen kronik ağrıda agmatin'in etkileri ve bu etkide NO modülatörlerinin rolü incelenmiştir (Şekil 4). Çalışmamızda NP'li farelere tek başına uygulanan agmatin, CPL latensini uzatarak antiallodinik bir etki göstermiştir. Benzer bir şekilde Arıcıoğlu ve ark. tarafından yapılan deneysel nöropati çalışmasında, agmatin, Balb/c

farelerde tail immersiyon testinde i.p. uygulandığında 40, 80 ve 100 mg/kg dozlarında anlamlı bir antinosiseptif etki göstermiş, ancak aynı testte intra serebro ventriküler (i.c.v.) uygulandığında herhangi bir etki görülmemiştir. Hot-plate testinde ise i.c.v. uygulanan agmatin doza bağlı bir antinosiseptif etki gösterirken i.p uygulandığında etkisiz bulunmuştur⁴². Sampson ve ark.'nın sıçan kullanarak yaptıkları akut ağrı çalışmasında, I2 reseptör ligandlarının

antinosiseptif etkilerini ılık su (46 °C ve 50 °C) kuyruk çekme testi ile değerlendirmişlerdir. Çalışmada kullanılan agmatin 46 °C antinosiseptif etki gösterirken 50 °C göstermemiştir. Çalışma sonucunda akut fazda etki gösteren I2 reseptör ligandlarının geliştirilerek daha etkili hale getirilmesi ve opioid tedavilerinin etkisinin artırılmasında kullanılabileceği sonucuna ulaşmışlardır⁴³.

Cold Plate Testinde Agmatin ve Nitretrjik Sistemin Etkileşimi



Şekil 4. Cold plate testinde agmatin ve nitretrjik sistemin etkileşimi. *: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklıdır (P<0,0002). •: Nöropati + L-arjinin grubundan anlamlı olarak farklıdır (P<0,0002). #: Nöropati + L-NAME ve Nöropati + Agmatin grubundan anlamlı olarak farklıdır (P<0,0003). Δ: Nöropati + D-NAME grubundan anlamlı olarak farklıdır (P<0,0006)

Deneylerimizde L-NAME varlığında uygulanan AG, tek başına uygulanan AG'den daha yüksek bir antiallodinik etkiye neden olmuştur. Güçlü NOS inhibisyonu ile ağrı iletiminde görev alan NO'nun üretiminin azaltılması sayesinde kombinasyonun yüksek antiallodinik etki gösterdiği düşünülmektedir. Diğer bir taraftan, Karadağ ve ark. iki farklı nöropati modeli üzerinde, yüksek

dozlarda agmatin'in taktik allodiniyi düşürdüğünü ve bu antiallodinik etkinin dizosilpin maleat (MK-801), N-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) ve 7-nitroindazol (7-NI) tarafından değişmediğini göstermişlerdir⁴⁴. Morfine bağlı analjezide agmatin ve L-NAME'in tail flick ve hot plate testlerinde incelendiği bir çalışmada, Agmatin ve L-NAME tail flick testinde morfine bağlı analjeziyi artırırken

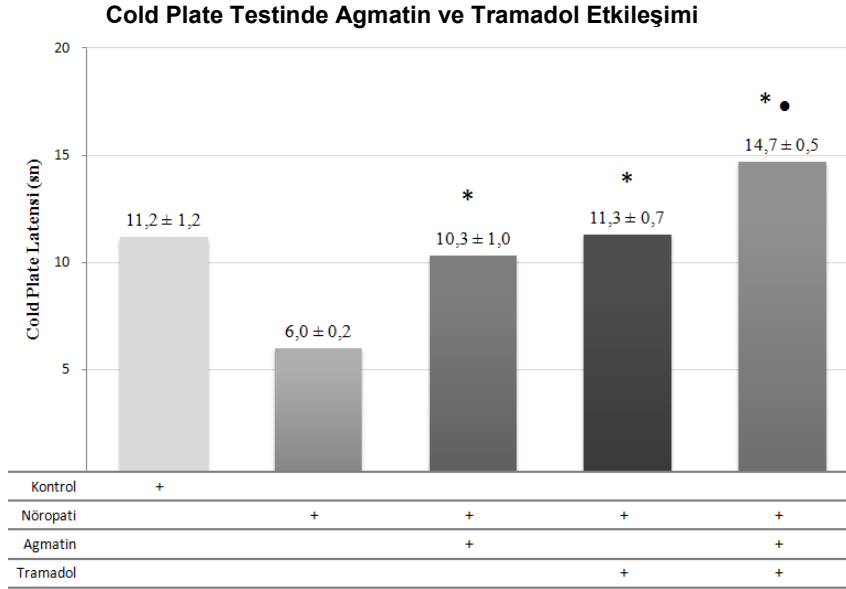
(spinal analjezi) hot plate testinde (supraspinal analjezi) değiştirmemiştir. Ayrıca agmatin'e bağlı potansiyalizasyonu L-NAME engellemiştir⁴⁵.

D-NAME uygulaması AG'nin antiallodinik etkisi üzerinde bir etkisi olmamıştır. Çalışmamızda tek başına kullanıldığında NP'li farelerde antiallodinik etki gösteren L-NMMA ve 7-NI, agmatin'in antiallodinik etkisinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu sonuçlar literatürdeki bazı sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Karadağ ve ark.'nın çalışmasında 7-NI, agmatin'nin antiallodinik etkisini değiştirmedini göstermişlerdir⁴⁴. Formalin ile oluşturulan deneysel akut ağrı çalışmasında, i.p. uygulanan L-NAME'in hem erken hem de geç fazda antinosiseptif etki gösterdiği, L-NMMA ve D-NAME'in herhangi bir değişiklik yapmadığını gözlemişlerdir. İ.c.v. uygulamada L-NAME ve nitro-L-arjinin (L-NNA) antinosiseptif etki gösterirken L-NMMA ve D-NAME etki göstermedi. Bu alınan sonuçlara göre L-NAME beyindeki NOS enzimlerini inhibe etme gücünün L-NMMA'dan daha güçlü olduğunu, son zamanlarda yayımlanan biyokimyasal verilerin desteğiyle desteklemişlerdir³⁹.

Çalışmamızın üçüncü kısmında tek başlarına kullanıldığında antiallodinik etki gösteren TR ve AG'nin kombine kullanımının sonuçları incelenmiştir (Şekil 5). Sonuç olarak, kombine uygulama hem TR'nin hem de AG'nin tek başlarına yaptıklarından daha yüksek bir antiallodinik etkinin oluşmasına neden olmuştur. İki ajanın hem farklı mekanizmalar üzerinden etki göstermesi hem de ikisinin de etkilerinde NOS

inhibisyonunun rolü olabileceği bu etkinin oluşmasına zemin hazırladığı düşünülmektedir. Thorn ve Ark.'nın morfin ve tramadol'un antinosisepsiyonunda, I2 reseptör ligandı olan agmatin'in etkilerine baktıkları ender bir çalışmada, tramadol ve morfinin ılık su kuyruk daldırma akut ağrı testinde AG'nin, tramadol ve morfinin antinosiseptif etkilerini doza bağımlı olarak artırdığını göstermişlerdir⁴⁶.

Sonuç olarak, bu çalışmada etkisini incelediğimiz tramadol ve agmatin nöropatik ağrıda ümit verici bileşikler olarak düşünülebilir. Her iki maddenin antiallodinik etkisinde NOS inhibisyonunun rolü farklı derecelerde olabilir. Bu maddelerin antiallodinik etkilerinde sadece NOS inhibisyonu değil, farklı mekanizmalar da rol oynayabilir. Tramadol ve agmatin nöropatik ağrıda kullanıma potansiyeli olan bileşikler olarak önerilebilir. Bu amaçla daha ileri çalışmalarla maddelerin olası farklı farmakolojik etkileri ve yan tesirleri de değerlendirilmelidir. Her iki madde tek başlarına kullanılabilir gibi kombine olarak da kullanılabilir. Ancak kombinasyonun antiallodinik etkisinin her iki bileşiğin tek başına kullanılmasından daha fazla olduğu gösterilmiş olsa da etkileşimler ve yan tesirler açısından kombinasyonun etkilerinin incelenmesine gereksinim vardır. Çalışmamızın sonuçlarına göre her iki maddenin antiallodinik etkisinde nitrik oksit inhibisyonunun rolü vardır. Bu sonuçlar farklı deneysel modellerle ve ileri çalışmalarla kontrol edilerek, nöropatik ağrının tedavisinde yeni yaklaşımlar için veriler elde edilebilir.



Şekil 5. Cold plate testinde ağmatin ve tramadol etkileşimi. *: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklıdır (P<0,0001). ●: Nöropati + Ağmatin ve Nöropati + Tramadol grubundan anlamlı olarak farklıdır (P<0,0001).

KAYNAKLAR

1. Woolf C. J., Salter M. V. Neuronal plasticity. Increasing the gain in pain. *Science*. 2000;288:1765-8.
2. Jensen T. S.. Mechanisms of neuropathic pain. In: Campbell J. N., editor. *Pain 1996: an updated review*. Seattle, WA: IASP Press. 1996;77-86.
3. Jensen T. S., Gottrup H.. Assesment of neuropathic pain. In: Jensen T. S., Wilson P. R., Rice A.S., editors. *Clinical Pain Management; Chronic Pain*. London: Arnold. 2003;113-24.
4. Yücel A, Çimen Y. Nöropatik ağrı. Mekanizmalar, tanı ve tedavi. *Ağrı*. 2005;17:1.
5. Bennet G.J., Xie Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33:87-107.
6. Decosterd I., Woolf C.J., Spared nevre injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*. 2000;87:149-58.
7. Malmberg AB, Basbaum AI. Partial sciatic nevre injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain*. 1998;76:215-22.
8. Shields SD, Eckert WA 3rd, Basbaum AI. Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *J Pain*. 2003;4:465-70.
9. MacFarlane BV, Wright A, O'Callaghan J, Benson HA. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. *Pharmacol Ther*. 1997;75:1-19.
10. Watson CP. The treatment of neuropathic pain: antidepressants and opioids. *Clin J Pain* 2000;16 (2 Suppl):S49-55.
11. Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 1999;353:1959-64.
12. 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.

13. Apaydin S, Uyar M, Karabay NU, Erhan E, et al. The antinociceptive effect of tramadol on a model of neuropathic pain in rats. *Life Sci.* 2000;66:1627-37.
14. Onal A, Parlar A, Ulker S. Milnacipran attenuates hyperalgesia and potentiates antihyperalgesic effect of tramadol in rats with mononeuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007;88:171-8.
15. Dayer P, Collard L, Desmeules J. The Pharmacology of Tramadol. *Drugs.* 1994;47:3-7.
16. Reis D, Regunathan S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *TIPS.* 2000;21:187-93.
17. Fairbanks CA, Schreiber KL, Brewer KL, Yu CG, Stone L. Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. *PNAS.* 2000;97:10584-15.
18. Mete S. Deneysel akut ağrı modelinde tramadol-agmatin etkileşmesi ve olası mekanizmaların araştırılması. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2008.
19. Kahrman C. Tramadol'un nöropatik ağrı üzerindeki antinociceptif etkisinde nitroerjik sistemin rolü. Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana. 2006.
20. Seltzer Z., Dubner R., Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain.* 1990;43:205-18.
21. Andrew J Allchorne , Daniel C Süpürge , Clifford J Woolf. Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats. *Mol Pain.* 2005;1
22. G. Ji, S. Zhou, M. Y. Kochukov, K. N. Westlund, S. M. Carlton. Plasticity in Intact A δ - and CFibers Contributes to Cold Hypersensitivity in Neuropathic Rats. *Neuroscience.* 2007;150:182–93.
23. Dworkin RH. An overview of neuropathic pain: Syndromes, symptoms, signs and several mechanisms. *Pain.* 2002;18:343-9.
24. Talu GK. Nöropatik Ağrı: Erdine S (editör). Ağrı. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2002:368-74.
25. Lauren E Ta, Philip A Low, Anthony J Windebank. Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli. *Mol Pain.* 2009;5
26. Jorum E, Warncke T, Stubhaug A. Cold allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: the effect of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist ketamine--a double-blind, crossover comparison with alfentanil and placebo. *Pain.* 2003;101:229–35.
27. Rice ASC, Hill RG. New treatment for neuropathic pain. *Annu Rev Med.* 2006;7:535–51.
28. Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms and treatment recommendations. *Arch Neurol.* 2003;60:1524-35.
29. Bamigbade TA, Langford RM: The clinical use of tramadol hydrochloride. *Pain Reviews* 1998;5:155-82.
30. Keskinbora K, Aydın I. Atipik opioid analjezik: Tramadol. *Ağrı.* 2006;18:5-19.
31. Ely T. Conotoxins reveal significant psychopharmacological effectiveness: the future of pain management. *Journal of Psychology and Behavioral Sciences,* 2003;17:18-33.
32. Dambisya YM, Lee TL. Effects L-NG-nitro arginine methyl ester (L-NAME), L-NGmonomethyl arginine (L-NMMA) and L-arginine on the antinociceptive effects of morphine in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1995;17:577-82.
33. Naik AK, Tandan SK, Kumar D, Dudhgaonkar SP. Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006;530:59-69.
34. Yoon YW, Sung B, Chung JM. Nitric oxide mediates behavioral signs of neuropathic pain in an experimental rat model. *Neuroreport.* 1998;9:367-72.
35. 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.
36. Lee DH, Singh JP, Lodge D. Experiments with nitric oxide synthase inhibitors in spinal nerve ligated rats provide no evidence of a role for nitric oxide in neuropathic mechanical allodynia. *Neurosci Lett.* 2005;385:179-83.

37. Okuducu H, Onal SA. Is nitric oxide involved in the antinociceptive activity of tramadol? Findings in rat model of neuropathic pain. *Agri*. 2005;17:31-40.
38. Karaaslan, Dilek; Peker, Tulay Tuncer; Karaaslan, Tamer; Ozmen, Sadik; Gultekin, Fatih; Savik, Emin. The role of nitric oxide on the analgesic effect of tramadol. *The Pain Clinic*. 2006;18:123-30.
39. Babbedge RC, Hart SL, Moore PK. Anti-nociceptive activity of nitric oxide synthase inhibitors in the mouse: dissociation between the effect of L-NAME and L-NMMA. *J Pharm Pharmacol*. 1993;45:77-9.
40. Thomas DA, Ren K, Besse D, Ruda MA, Dubner R. Application of nitric oxide synthase inhibitor, N omega-nitro-L-arginine methyl ester, on injured nerve attenuates neuropathy-induced thermal hyperalgesia in rats. *Neurosci Lett*. 1996;210:124-6.
41. Dableh LJ, Henry JL. The selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole has acute analgesic but not cumulative effects in a rat model of peripheral neuropathy. *J Pain Res*. 2011;4:85-90.
42. Arıcıoğlu F, Körçeğiz E, Bozkurt A, Özyalçın S. Effect of agmatine on acute and mononeuropathic pain. *Ann NY Acad Sci*. 2003;1009:106-15.
43. Sampson C, Zhang Y, Del Bello F, Li JX. Effects of imidazoline I2 receptor ligands on acute nociception in rats. *Neuroreport*. 2012;23:73-7.
44. Karadağ HC, Ulugöl A, Tamer M, İpçi Y, Dökmeci İ. Systemic agmatine attenuates tactile allodynia in two experimental neuropathic pain models in rats. *Neurosci Lett*. 2003;339:88-90.
45. Ruiz-Durantez E, Llorente J, Ulibarri I, Pineda J, Ugedo L. Agmatine-morphine interaction on nociception in mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1009:133-6.
46. Thorn DA, Zhang Y, Peng BW, Winter JC, Li JX. Effects of imidazoline I2 receptor ligands on morphine-and tramadol-induced antinociception in rats. *Eur J Pharmacol*. 2011;670:435-40.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:

Dr. Soner Mete
İncekara Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu
Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi
NEVŞEHİR
E-mail: sonermete@gmail.com

Geliş tarihi/Received on : 20.07.2014

Kabul tarihi/Accepted on: 25.08.2014