

**ROSMARİNİK ASİT ANALJEZİSİNE
SEROTONERJİK ve NORADRENERJİK
MODÜLASYONUN KATKISI**

Ecz. Duygu AYDIN

Yüksek Lisans Tezi

**ROSMARİNİK ASİT ANALJEZİSİNE
SEROTONERJİK ve NORADRENERJİK
MODÜLASYONUN KATKISI**

Ecz. Duygu AYDIN

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Anabilim Dalı

Eskişehir, Şubat 2016

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Nurcan BEKTAŞ

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 1305S106).

JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Duygu AYDIN'ın "Rosmarinik Asit Analjezisine Serotonerjik ve Noradrenerjik Modülasyonun Katkısı" başlıklı, Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans tezi, 16/02/2016 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Yrd. Doç. Dr. Nurcan BEKTAŞ Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Kevser EROL Osmangazi Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
08.03.2016 tarih ve10..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Dilek AK
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



ROSMARİNİK ASİT ANALJEZİSİNE SEROTONERJİK ve NORADRENERJİK MODÜLASYONUN KATKISI

ÖZET

Rosmarinik asit antioksidan, anti-inflamatuvar ve nöroprotektif özelliklere sahip bir polifenoldür. Analjezik etkinliğinin sınırlı sayıda gösterilmiş olduğu çalışmalarda etki mekanizmasının yeterince aydınlatılmamış olduğu görülmektedir.

Tez çalışmasında, 0.3, 1 ve 3 mg/kg (p.o.) rosmarinik asitin santral analjezik etkinliğinin farelerde sıcak-plaka ve kuyruk-batırma testleri ile zamana bağlı olarak, periferik analjezik etkinliğinin ise asetik asit ile indüklenen kıvranma testi ile değerlendirilmesi ve bu etkinlikte inisiyatif inhibitör yollarında yer alan serotonerjik sistemin rolünün 5HT_{2A/2C} reseptör antagonisti ketanserin (1 mg/kg, i.p.) kullanılarak ve adrenerjik sistemin rolünün α_2 -adrenerjik antanogisti yohimbin (1 mg/kg, i.p.) kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Antagonist uygulaması test maddesi uygulamasından 30 dakika önce yapılmıştır.

Sıcak-plaka testinde 1 mg/kg rosmarinik asit 45 dakikada, 3 mg/kg rosmarinik asit ise 30, 45 ve 60 dakikada, kuyruk-batırma testinde 1 ve 3 mg/kg rosmarinik asit 45 ve 60 dakikada termal uyarana karşı verilen cevabının süresini uzatmıştır. Kıvranma testinde ise, rosmarinik asit 45. dakikada tüm dozlarda kıvranma sayılarını anlamlı olarak azaltmıştır. Ketanserin, rosmarinik asitin oluşturduğu etkiyi sıcak-plaka testinde değiştirmemiş, kuyruk-batırma testinde anlamlı olarak geri çevirmiştir. Kıvranma testinde ise rosmarinik asit uygulaması ile azaltılan kıvranma sayısı üzerine etkili olmamıştır. Yohimbin, rosmarinik asitin oluşturduğu etkiyi sıcak-plaka testinde göreceli olarak, kuyruk-batırma testinde ise anlamlı olarak geri çevirmiştir. Kıvranma testinde de, rosmarinik asit uygulaması ile azaltılan kıvranma sayısını anlamlı olarak arttırmıştır. Rosmarinik asit hem inisiyatif inhibitör yolda yer alan serotonerjik ve noradrenerjik sistemi değişik düzeylerde modüle ederek hem de periferik noradrenerjik sistemi stimüle ederek santral ve periferik analjezik etki sağlamaktadır. Dolayısıyla, ağrının eşlik ettiği rahatsızlıklarda tek başına veya yardımcı ilaç olarak güvenle kullanılabilen doğal bir ajandır.

Anahtar Kelimeler: rosmarinik asit, ağrı, serotonin, noradrenalin.

The PARTICIPATION of SEROTONERGIC and NORADRENERGIC MODULATION in ROSMARINIC ACID-INDUCED ANALGESIA

ABSTRACT

Rosmarinic acid is a polyphenol which has antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties. It has been showed that rosmarinic acid has an analgesic effect, however, the mechanism of action has not been sufficiently clarified.

In the thesis, it was aimed to evaluate the central analgesic activity of 0.3, 1 and 3 mg/kg (p.o.) rosmarinic acid in mice by hot-plate and tail-immersion tests in a time depend manner, peripheral analgesic activity by acetic acid-induced writhing test and to research the role of serotonergic system by using ketanserin (1 mg/kg, i.p.), 5HT_{2A/2C} receptor antagonist, and yohimbine (1 mg/kg, i.p.), α_2 -adrenergic receptor antagonist, on antinociception of rosmarinic acid. Antagonists were administrated 30 minutes prior test material.

The enhanced withdrawal responses to thermal stimuli were observed 45 minutes after administration of 1 mg/kg rosmarinic acid; 30, 45 and 60 minutes after 3 mg/kg rosmarinic acid administration in hot-plate test; and also 45 and 60 minutes after 1 and 3 mg/kg rosmarinic acid administration in tail-immersion test. In writhing test, the number of writhing significantly decreased 45 minutes after the administration of 0.3, 1 and 3 mg/kg rosmarinic acid. The antinociception induced by rosmarinic acid was significantly reversed by ketanserin only in tail-immersion test while yohimbine reversed relatively in hot-plate and significantly in tail-immersion test. The number of writhes which is reduced by administration of rosmarinic acid were increased by yohimbine pre-treatment. Rosmarinic acid provides central and peripheral analgesic effects by modulating serotonergic and noradrenergic systems which are located in descending inhibitory pathway and also by stimulating peripheral noradrenergic system. Therefore, rosmarinic acid is a natural agent which can be used safely by one-self or as an adjuvant in pain management.

Key Words: rosmarinic acid, pain, serotonin, noradrenalin.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
Ağrı	3
<i>Ağrının sınıflandırılması</i>	3
<i>Ağrı modülasyonunda yer alan ağrı yolları</i>	4
<i>Ağrı modülasyonunda inhibitör inisiyasyon</i>	5
<i>Inhibitör serotonerjik yolak</i>	6
<i>Inhibitör adrenerjik yolak</i>	7
Ağrının Doğal Tedavisi	8
<i>Fenolik bileşenler</i>	9
GEREÇ ve YÖNTEM	14
Kullanılan Sarf malzemeleri	14
Kullanılan Cihazlar	14
Deney Hayvanları	14
Deney Gruplarının Oluşturulması	14
Deneysel Yöntemler	14
<i>Sıcak-plaka testi</i>	14
<i>Kuyruk-batırma testi</i>	15
<i>Asetik asit ile indüklenen kıvrınma testi</i>	15
<i>İstatistiksel Analiz</i>	15
BULGULAR ve TARTIŞMA	16
Sıcak-Plaka Testi	16
Kuyruk-Batırma Testi	16
Asetik Asit ile İndüklenen Kıvrınma Testi	17
Rosmarinik asitin analjezik etkisine serotonerjik sistemin katkısı	17

Rosmarinik asitin analjezik etkisine adrenerjik sistemin katkısı	18
SONUÇ ve ÖNERİLER	23
KAYNAKLAR	24

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Rosmarinik Asitin Kimyasal Formülü	10
Şekil 2 Rosmarinik Asitin Sıcak-Plaka Testindeki Olası Maksimum Analjezik Etkisi	15
Şekil 3 Rosmarinik Asitin Kuyruk-Batırma Testindeki Olası Maksimum Analjezik Etkisi	16
Şekil 4 Rosmarinik Asitin Kıvrınma Testindeki Analjezik Etkisi	16
Şekil 5 30 mg/kg Rosmarinik Asitin Sıcak-Plaka (5A), Kuyruk-Batırma (5B) ve Kıvrınma Testinde (5C) Göstermiş Olduğu Analjeziye 1 mg/kg Ketanserin Ön-Uygulamasının Etkisi	17
Şekil 6 30 mg/kg Rosmarinik Asitin Sıcak-Plaka (6A), Kuyruk-Batırma (6B) ve Kıvrınma Testinde (6C) Göstermiş Olduğu Analjeziye 1 mg/kg Yohimbin Ön-Uygulamasının Etkisi	17

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

5-HT	: 5-Hidroksitriptamin
DB	: Dorsal Boynuz
DKG	: Dorsal Kök Ganglionu (Arka Kök Ganglionu)
GABA	: γ -aminobutirik asit
HMGB1	: High-Mobility group box 1 (Yüksek Mobiliteli B1 protein grubu)
IASP	: International Association for the Study of Pain
IL	: Interlökin
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NRM	: Nucleus Raphe Magnus
NSAİİ	: Non Steroidal Anti-İnflamatuar İlaçlar
PAG	: Periakuaduktal Gri Madde
RVM	: Rostral Ventromediyal Medulla
SG	: Substantia Gelatinosa
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

GİRİŞ ve AMAC

Ağrı; var olan veya olası doku hasarı ile ilişkili duyuşsal ve emosyonel hoş olmayan bir deneyim olarak tanımlanmaktadır (Merskey ve Bogduk, 1994). Ağrı modülasyonu periferden santrale bir çok inhibitör veya eksitatör mediyatörün ve değişik reseptör gruplarının uyumlu çalışmasıyla yönetilen son derece kompleks bir süreçtir. Ağrının spinal ve supraspinal seviyelerde santral modülasyonu inici ve çıkıcı yolların ve çeşitli beyin bölgelerinin rol aldığı karmaşık bir süreçtir. Çıkıcı yollar endojen opioid, monoamin ve asetilkolin aracılı mekanizmalara sahip iken, çıkıcı ağrıyı kontrol eden, beyin sapı çekirdeğinden köken alıp dorsal boynuz (DB)' da sonlanan ve intrinsik spinal nosisepsiyonun ilerlemesini azaltmakta veya düzenlemekte olan inici inhibitör yollar sıklıkla serotonin ve noradrenalin gibi nörotransmitterlerden faydalanmaktadır (de Freitas ve ark., 2004; Pertovaara, 2006; Schaible, 2007; Kwon ve ark., 2014).

Ağrının hafifletilmesi için piyasada non steroidale anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİlar), opioidler, trisiklik antidepresanlar ve antikonvülsanlar gibi birçok ilaç bulunsa da çoğu hasta mevcut ilaçların çeşitli yan etki ve tolerabilite problemlerinden dolayı tamamlayıcı veya alternatif tedavi olarak bitkisel tedaviye başvurmakta ve olumlu yanıt almaktadır (Zareba, 2009). Dolayısıyla, son zamanlarda günümüz tıbbında daha az yan etkiye ve daha güçlü terapötik sonuçlara sahip olan bitkisel ilaçlarla tedaviye ilgi oldukça artmıştır (Süzer, 2005; Mehrotra ve ark., 2011). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2000 yılındaki raporunda, Avrupa, Avusturalya ve Kuzey Amerika' da yaşayan insanların yaklaşık % 50' sinin alternatif-destekleyici tedavi metotlarından birini kullandıklarını ve bu metotlar içinde en çok kullanılanın da bitkisel ilaçlar olduğu açıklanmıştır (Süzer, 2005). Ayrıca günümüzde ilerleyen tıp bilimi ve teknolojiler sayesinde halk arasında şifalı olduğu bildirilen bitkilerin etkileri ve bu etkilere aracı olan kimyasal ya da kimyasallar belirlenebilmektedir (Süzer, 2005). Tartışmasız bir şekilde bitkiden elde edilen bileşikler; günümüzde kullanılan çeşitli anti-inflamatuvar ve analjezik ilaçların gelişimine fazlasıyla katkıda bulunmuştur (Pragasam ve Rasool, 2013). Sentetik ilaçların ilaç endüstrisinde önemli payı olsa bile, doğal ilaç etken maddeleri ve bileşiklerden üretilen ilaçlar günümüzde kullanılan ilaçların neredeyse % 50'sini oluşturmaktadır. 1981-2006 arasında geliştirilen ilaçların % 32' si doğal ya da yarı sentetiktir, ayrıca yeni geliştirilen ilaçların % 17' si de doğal ürünlerin kromoforları esas alınarak geliştirilen ilaçlardır. Yeni ilaçların neredeyse yarısının doğal kaynakları esas alması ilaç geliştirme çalışmalarını hızla doğaya yönlendirmektedir (Harput, 2010).

Bitkilerin içinde yaygın olarak bulunan besinsel polifenoller ve fenolik asitlerin insan sağlığı için güvenli ve yararlı oldukları artık bilinen bir gerçektir ve bu özelliklerini serbest radikal süpürücü, metal şelasyonu, enzimatik aktivitenin düzenlenmesi ve sinyal transdüksiyon yollarının değişimi gibi çeşitli biyolojik etkilerine borçlu oldukları bildirilmiştir (Mattila ve ark., 2006; Pragasam ve Rasool, 2013). Çeşitli çalışmalarla fenolik asit içeren bitkilerin analjezik etkinlikleri değerlendirilmiş ve etki, içeriklerinde bol miktarda bulunan fenoliklere dayandırılmıştır (Gorzalczany ve ark., 2011; İbrahim, 2012; Liao ve ark., 2012; Sen ve ark., 2013). Saf fenolik asitlerin ise, ağrının giderilmesinde yeri olan anti-inflamatuvar etkinlikleri nispeten daha çok çalışılmış, analjezik etkinliklerine dair bilgiler kısıtlı kalmıştır. Rosmarinik asit, Laminaceae

familyasındaki çeşitli bitkilerde yaygın olarak bulunan ve antioksidan, anti-inflamatuvar, antikanser, nöroprotektif özelliklerinin yanı sıra analjezik etkileri de rapor edilmiş bir polifenoldür. Rosmarinik asitin ağrı ile ilişkili etkinliğinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma vardır (Guginski ve ark., 2009; Hasanein ve Zaheri, 2014). Bu çalışmalarda analjezik etkinlik gösterilmesine rağmen hiçbirinde rosmarinik asitin etki mekanizması yeterince aydınlatılmamıştır. Çalışmalara baktığımız zaman yalnızca opioiderjik sistemin analjezik etkinliğe katkısının araştırıldığını (Boonyarikpunchai ve ark., 2014), fakat inisi inhibitör yollarda önemli rol oynayan serotonerjik ve adrenerjik sistemin katkısının henüz gösterilmediği görülmektedir. Farmakolojik etkinlik gösteren maddelerin etki mekanizmalarının aydınlatılması etki kalıbının belirlenebilmesi ve etki profilinin ortaya koyularak ileride planlanacak çalışmalara temel oluşturması bakımından önem teşkil etmektedir.

Bu bilgilerden hareketle tez çalışmasında, farelerde oral uygulanan 0.3, 1 ve 3 mg/kg rosmarinik asitin santral analjezik etkinliğinin sıcak-plaka ve kuyruk-batırma testleri ile zamana bağlı olarak, periferal analjezik etkinliğinin asetik asit ile indüklenen kıvrınma testi ile değerlendirilmesi ve rosmarinik asitin neden olduğu antinosisepsiyona ağrı modülasyonuna önemli katkısı olduğu bilinen inisi inhibitör yollarda yer alan serotonerjik sistem rolünün 5HT_{2A/2C} reseptör antagonisti ketanserin (1 mg/kg) kullanılarak ve adrenerjik sistem rolünün α_2 -adrenerjik antanogist yohimbin (1 mg/kg) kullanılarak araştırılması amaçlanmaktadır.

KAYNAK BİLGİSİ

Ağrı

Ağrı; var olan veya olası doku hasarı ile ilişkili duyuşsal ve emosyonel hoş olmayan bir deneyim olarak tanımlanmaktadır (Merskey ve Bogduk, 1994). Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği'nin (International Association for the Study of Pain=IASP) vermiş olduğu bu tanımın dışında; nörofizyoloji'de aynı alan içinde kullanılan "nosisepsiyon" olarak da ağrıyı řu şekilde tanımlayabiliriz: "Vücudun herhangi bir bölgesinde bir doku hasarı olduğu zaman, bu bölgede lokal olarak salınan mediyatörler ve aljezikler tarafından; özelleşmiş sinir uçları olan nosiseptörlerin uyarılıp oluşun sinyalin merkezi sinir sistemine gönderilerek belirli nöral yapılarla değerlendirilip buna karşı gereken fizyolojik, biyoşimik ve psikolojik önlemlerin harekete geçirilmesidir". Bu tanım, ağrının, nosisepsiyon olayının bir unsuru olduğunu göstermektedir (Güzeldemir, 1999).

Ağrının sınıflandırılması

Ağrının değişik nedenlerle çeşitli şekillerde ortaya çıktığı bilinmekte ve ilaç ile tedavi stratejisi belirlenirken ağrının türünü ve nedenini iyi belirlemek gerekmektedir. Ağrı çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir; IASP Taksonomi Alt Komitesi; ağrıyı beş eksenli taksonomi şeklinde, eksen bazında tanımlamıştır. Bu tanımlamaya göre; birinci eksen ağrının yer aldığı vücut bölgesi ile ilgilidir. İkinci eksen ağrının etkilediği sistemleri, üçüncü eksen oluşum süresini ele almaktadır. Dördüncü eksen, hastanın ifadesine göre ağrının şiddeti ve başladığından bu yana geçen süreyi, beşinci eksen ise ağrının etiolojisini belirtmektedir (Aydın, 2002).

Ağrı sınıflandırması karmaşık olmakla beraber birçok klinisyen de bu durum ile ilgili çelişki yaşamaktadır. Sonuç olarak, pek çok klinisyen ortak olarak birkaç farklı sınıflandırma sistemi kullanmaktadır. Bu sistemler arası belirgin ayrımlar her zaman mümkün olmamaktadır. Ağrıyı başarılı bir şekilde kontrol edebilmek için klinisyenler bütün değerlendirmeleri kapsayan (örneğin zaman, anatomi, şiddet, hasta tipi ve spesifik patoloji) ağrı sınıflandırmaları ile çalışabilmeli ve hastanın özel durumlarına bağlı olarak modelden modele değişiklikler yapabilmelidirler (Cole, 2002). Klinikte ağrı genellikle ağrının oluştuğu bölgeye (bel ağrısı, baş ağrısı v.s.), ağrı şiddetine (hafif, orta, şiddetli), ağrı süresine (akut, subakut, kronik), ağrının altında yatan nedene (somatik, visseral, nöropatik ağrı) ve mekanizmasına göre (nosiseptif, nöropatik, deafferantasyon, reaktif, psikosomatik ağrı) sınıflandırılmaktadır (Aydın, 2002; Cole, 2002). Ağrı süresi yani devamlılığı ağrının altında yatan nedenini anlamaya yarayan en önemli parametrelerden biridir. Akut ağrı, kronik ağrıya göre hemen başlayan ve büyük olasılıkla süresi sınırlı olan ağrı tipidir. Genellikle akut ağrı ve nedeni arasında yer, şiddet ve zaman bakımından bir ilişki söz konusudur (Macintyre ve ark., 2010). Daima nosiseptif niteliktedir. Travma, enfeksiyon, doku hipoksisi ve inflamasyon nedeniyle oluşabilmektedir. En tipik örneği ise postoperatif akut ağrıdır (Aydın, 2002). Kronik veya kalıcı ağrı, 3 aydan 6 aya kadar süren olağan akut yaralanma veya hastalığın ötesinde, süregelen ve tekrar eden ağrı olarak tanımlanabilmektedir. Altında yatan nedenler çoklu, karışık veya belirsiz olmakla birlikte, patofizyolojisi bakımından (hastalık ya da yaralanmadan kaynaklanan veya bunlarla ilişkili olabilen fonksiyonel değişiklikler), nosiseptif (süregelen

doku hasarından dolayı) veya nöropatik (beyindeki, omurilikteki veya periferel sinirlerdeki hasardan kaynaklanan) ağrı olarak sınıflandırılabilir (Feinberg ve ark., 2013). Nöroseptif ağrı, tanımlanabilen bir lezyondan kaynaklanan ve doku hasarına neden olan, somatik ve visseral nöroseptörlerin eşlik ettiği ağrıdır. Dolayısıyla somatik ve visseral ağrı olarak iki gruba ayrılabilir (Steeds, 2009). Somatik ağrı, ya kütanoz (vücut yüzeyinde) reseptörlerin ya da derin dokudaki (kas-iskelet dokusunda) ağrı reseptörlerinin uyarılmasıyla meydana gelmektedir. Kas-iskelet dokusunda ağrı meydana geldiğinde bunun derin somatik ağrı olduğu düşünülmekte ve bazen kemik ağrısı gibi algılanmaktadır (örneğin kalçadan dize vuran ağrı). Somatik ağrının olası nedenleri arasında kemik metastazı, artrit ve kanser bulunmaktadır (Long ve Morgan, 2008). Kanser hastalarında somatik ağrı genellikle yumuşak doku inflamasyonundan veya kemiğe sıçrayan metastaz yüzünden kaynaklanmaktadır (Perron ve Schonwetter, 2001). Visseral ağrı, iç organlarda oluşan esneme, şişkinlik veya iskemi sonucu oluşabilir. Ezici, kramp ağrısı gibi hissedilmektedir (Long ve Morgan, 2008; Perron ve Schonwetter, 2001). Bu iki grup arasındaki temel farklılık ise somatik ağrının duyuşal liflerle, visseral ağrının ise sempatik liflerle taşınmasıdır (http-1). Nöropatik ağrı, sıklıkla periferel veya merkezi sinir sistemi yolağını takip eden bir ağrı tipi olup sinirlerde tümör baskılanması sonucu meydana gelen işlev bozukluğu, diyabet, kemoterapi gibi nedenlerden kaynaklanmaktadır (Long ve Morgan, 2008). Nöropatik ağrı nöronal bir eksiklik ile de ilişkili olabilir (Perron ve Schonwetter, 2001). Omurilik yaralanması, multipl sklerozis, epilepsi ve inme gibi yapısal değişikliklere bağlı ağrılar bu tip ağrıya örnektir. Nöropatik ve nörojenik ağrı karıştırılmamalıdır. Nörojenik ağrı, herhangi bir nöropati oluşturma şartı aranmaksızın periferel sinir yaralanması ile ortaya çıkan ağrıdır. Nöropatik ağrı metabolik hastalıklar sonucu ortaya çıkan ağrıyı da tanımlamak için kullanılmaktadır. Allodini (normalde ağrı oluşturmeyen bir uyarandan kaynaklanan ağrı) ve hiperaljezi (normalde ağrıya neden olan uyarana karşı verilen artmış ağrı yanıtı) şeklinde gözlenebilir (Aydın, 2002).

Ağrı modülasyonunda yer alan ağrı yolları

Ağrının modülasyonu çeşitli mediyatörler ile reseptörlerini kapsayan son derece karışık bir süreçtir. Ağrının kontrolü, bu kimyasalların ve reseptörlerin periferden merkezi sinir sistemi (MSS)' ne etkileşimi aracılığıyla geniş bir ağ üzerinden sağlanmaktadır. Kimyasalların ve reseptör çeşitlerinin modülasyona katılım oranı zararlı uyarana ve ağrı tipine göre değişebilir. Potansiyel olarak zararlı ve yıkıcı doku uyarılarını saptayan somatosensoryel sistem, birbirini etkileyen çeşitli periferel ve santral mekanizmaların da dahil olduğu ağrıya karşı önemli koruyucu bir sistemdir (Macintyre ve ark., 2010). Zararlı uyarının saptanması, nöroseptörlerin eşik seviyesine ulaşması için ve bu yolla MSS' ne aktarımının sağlanması için minimum yoğunlukta zararlı uyarı şiddeti gerektirmektedir (Macintyre ve ark., 2010). Nöroseptörler ciltte, kasta, bağ dokuda, damarlarda ve iç organlarda çok sayıda bulunmaktadır (Hudspith ve ark., 2006). İki çeşit nöroseptör vardır: mekanoreseptörler yüksek eşikle ayırt edilebilir ve mekanik deformasyona cevap verirken, polimodal nöroseptörler, çeşitli doku hasarına sebep olan hidrojen iyonları (protonlar), 5-hidroksitriptamin (5-HT), sitokinler, bradikinin, histamin, prostaglandinler, lökotrienler gibi biyokimyasallara cevap vermektedirler (Steeds, 2009). Bu reseptörler vücuttan salgılanan ve

nöromediyatör işlevi gören maddeler tarafından uyarılmaktadırlar. Reseptörün fonksiyonu; mekanik, termal ve kimyasal enerjiyi elektriksel sinyaller haline dönüştürmek, sonra bu uyarının primer afferent lifler yoluyla omuriliğe iletilmesini sağlamaktır (Saatçioğlu, 2008). Nosiseptörler bir sinir lifine çıkış noktası veren duyuşal sinir hücreleridir (Reichling and Levine, 2009). Aδ ve C lifleri olmak üzere iki ana sinir lifi vardır. Bahsedilen primer afferent sinir liflerinin hücre gövdeleri ya dorsal kök ganglionunda (DKG) ya da trigeminal ganglionunda yerleşmiştir ve DB' da sonlanmaktadır. Tüm ağrı lifleri DB' da sonlanmasına rağmen, takip ettikleri yolaklar değişebilmektedir (Steeds, 2009). Aδ lifleri, aksiyon potansiyelini hızlı ileten büyük çaplı liflerdir. Bu lifler ani değişiklikleri, keskin ve iyi lokalize olan ağrıyı düzenlemektedir. Diğer taraftan C lifleri aksiyon potansiyelini yavaş ileten küçük çaplı liflerdir. Yavaş, yakıcı, devamlı ve kronik ağrıyı iletmektedirler (Stucky ve ark., 2001; Guyton and Hall, 2007). Nosiseptörler omuriliği projekte etmektedir. Omurilik santral nosiseptif sistemin en altta kalan kısmıdır. Omurilikte nöronların düzenlenmesi ile spesifik dokulara ağrının yansması gibi ağrının karakteri belirlenmektedir. Omurilik, zararlı uyarın nedeniyle periferden gelen sinyalin ulaştığı omurilikteki nosiseptif nöronların uyarılabilirliğini değiştirerek spinal nosiseptif süreci etkin biçimde amplifiye etmektedir. Nosiseptörler, DB'un gri cevher kolonunda ikinci dereceden nöronlarla sinaptik bağlantı yapmaktadırlar. İkinci sıra nöronların bir kısmının yukarı çıkan aksonları vardır ve beyin sapını veya zararlı uyarın ile başlayan bilinçli ağrı yanıtı sağlayan talamokortikal sistemi projekte etmektedirler. (Schaible, 2007). Spinal projeksiyon nöronlarının yan dalları nucleus reticularis gigantocellularis gibi karmaşık olan üst merkezleri aktive etmektedir ve aynı zamanda raphe magnus (NRM) çekirdeği ve PAG (periakvaduktal gri madde)'ın da dahil olduğu orta beyini uyarmaktadır (Hudspith ve ark., 2006). Beyin sapının bu nöral ağları, ağrının kontrolünde katılan endojen opioid- monoamine- ve asetilkolin- aracılı mekanizmalara sahiptir (de Freitas ve ark., 2004). Omurilikten orta beyin, ön beyin ve kortekse bilgi taşıyan paralel çıkıcı yolaklar, spinotalamik, spinoretikuler, spinomesensefalik ve spinohipotalamik-limbik yolaklardır (Macintyre ve ark., 2010; Skirven ve ark., 2011). Bunlara ek olarak omurilik, inisi yolakların da etkisi altındadır. İnisi sistem intrinsik spinal nosisepsiyonun ilerlemesini azaltmakta veya düzenlemektedir (Schaible, 2007).

Ağrı modülasyonunda inhibitör inisi yolak

Beyin sapının omurilik düzeyinde ağrı ile ilişkili sinyalleri düzenlemede önemli bir rolü olduğu iyi bilinmektedir. Bu düzenleyici beyin sapı-spinal yolağın çoğunlukla ağrıyı inhibe ettiği görülmektedir. Anlaşıldığı üzere inisi inhibitör yolaklar beyin sapından köken almaktadır. Beyin sapı çekirdeğinden köken alan (özellikle periakvaduktal gri madde (PAG) ve rostral ventromediyal medulla (RVM)) yolaklar spinal düzeye inmektedir ve DB' daki ağrı sinyallerinin transmisyonunu etkilemektedir. PAG inisi inhibisyonun anahtar bölgesidir. PAG; NRM, nucleus reticularis gigantocellularis pars alfa ve nucleus paragigantocellularis lateralis'i de içeren RVM'yi projekte etmektedir ve limbik sistem, kortikal alan ve hipotalamustan girdi almaktadır. RVM'deki nöronlar dorsolateral funiculus boyunca DB'u projekte etmektedir (Hudspith ve ark., 2006; Schaible, 2007). İnisi inhibisyon ve fasilitasyon arasındaki denge uyarının türü ve

şiddeti ve ayrıca hasarı takip eden zamana göre değişebilmektedir (Macintyre ve ark., 2010). Birçok mekanizma spinal DB seviyesinde inisi inhibitör etkinin düzenlenmesinde yer almaktadır (Pertovaara ve Almeida, 2006). Elektrofizyolojik çalışmalar RVM'den gelen GABAerjik ve glisinerjik projeksiyonların da antinosisepsiyona aracılık ettiğini öne sürmektedir (Ossipov ve ark., 2010). Omurilik DB' un yüzeysel laminaları GABA (γ -aminobutirik asit), glisin ve enkefalin gibi inhibitör nörotransmitterleri içeren internöronlara sahiptir. Yolaklar bu inhibitör internöronları uyarmakta ve spinal ağrı iletim nöronlarının inisi inhibisyonu için ek mekanizmalar olarak nitelendirilmektedir (Pertovaara ve Almeida, 2006). İnhibitör inisi yolak özellikle patolojik koşullar altında aktive olan endojen ağrı baskılayıcı bir yolaktır. Bu sistemin anahtar bölgesi daha önce bahsedildiği gibi PAG olarak adlandırılan ve orta beyinde yer alan bir bölgedir. Enkefalin içeren nöronların bol bulunduğu PAG; hipotalamus, korteks ve talamus gibi diğer beyin bölgelerinden inputlar almaktadır. PAG nöronlarının aktivasyonu NRM ' nin yer aldığı RVM'deki nöronların aktivasyonuna neden olmaktadır. NRM' den serotonin ve enkefalin içeren nöronlar omuriliğin DB' unun substantia gelatinosa (SG)'na projekte olmakta ve nosiseptif transmisyona inhibitör etkiler oluşturmaktadır. Ayrıca DB'da nosiseptif transmisyona inhibitör etki oluşturan ve locus ceruleus' dan köken alan noradrenerjik yolak da bulunmaktadır (Offermanns ve Rosenthal).

İnhibitör serotonerjik yolak

İnhibitör serotonerjik inisi yolakların varlığı ilk olarak, serotonerjik antagonistlerin RVM'den başlayarak stimülasyon ile üretilen antinosisepsiyonu bloke ettiğini gösteren çalışmalarca ortaya konmuştur. Bu çalışmalar, inisi ağrı inhibisyonunun RVM' den projekte olan serotonerjik nöronlar aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir. PAG veya RVM'nin stimülasyonunun omurilikte serotonin salımına sebep olduğu ve 5-HT agonistlerinin intratekal uygulanmasının antinosisepsiyona neden olduğu, ve de RVM'den doğan antinosisepsiyonu intratekal 5-HT antagonistlerinin zayıflattığı da çalışmalar tarafından bildirilmektedir. Retrograd etiketleme çalışmaları ise nucleus paragigantocellularis ve nucleus gigantocellularis ventral kısmının yanı sıra RVM'de yer alan raphe magnus çekirdeğinden doğarak omurilik DB' na projekte olan serotonerjik yolakların varlığını göstermiştir. Çoğu çalışma birlikte değerlendirildiğinde RVM'nin buradan inen serotonerjik ağrı yolakları ile ağrıyı modüle ettiğini ifade etmesine rağmen, RVM'de ağrıyı modüle edebilen non-serotonerjik nöronların da bulunduğu bilinmektedir. Örneğin RVM'den doğan spinal projeksiyonların sadece % 20' sinin serotonerjik olup çoğunun glisinerjik ve GABAerjik kaynaklı olduğu gösterilmiştir. Serotonerjik RVM nöronlarının bu nöronların aktivitelerini modüle ettiği ileri sürülmektedir. 5-HT reseptörlerinin alt tiplerinin çeşitliliği ve omurilik DB' un kompleks anatomik yapısı ağrı modülasyonunda serotoninin rolünün yorumlanmasını zorlaştırmaktadır (Ossipov ve ark., 2010). Tek bir hücre seviyesinde bakıldığında serotoninin genellikle inhibitör bir nörotransmitter olduğu düşünülmektedir. Örneğin omurilik DB 5-HT_{1A} reseptörlerinin yer aldığı raphe magnus çekirdeğinin stimülasyonu ya da serotoninin iyontoforezi ağırlı uyarana verilen cevabı azaltmaktadır (Zemlan ve ark., 1994), ancak internöronlarda serotoninin eksitator olabileceğine dair kanıtlar da vardır (Todd ve ark., 1983). Anlaşıldığı üzere aktive edilen reseptör alt tipine

göre omurilik serotoninin etkisi inhibitör veya fasilitatör nitelikte olabilmektedir. İnhibitör 5-HT₇ reseptörünün antagonistinin spinal uygulaması RVM'ye enjekte edilen morfinin antinosiseptif etkisini bloke etmiştir aynı zamanda, fasilitatör 5-HT₃ reseptörlerinin antagonizması RVM'ye uygulanan kolesistokinin ile indüklenen hiperaljeziyi bloke etmiştir. 5-HT₇ reseptörlerine omuriliğin dorsal boynuzundaki GABAerjik internöronların yanı sıra primer afferent liflerin santral terminallerinde ve DKG' de (arka kök gangliyonda) rastlanmaktadır (Ossipov ve ark., 2010). Serotonin reseptörlerin lokalizasyonu da inhibitör veya fasilitatör etkinlik göstermesinde rol oynamaktadır. Örneğin spinal 5-HT_{2A} reseptörlerinin stimülasyonu pronosiseptif, spinal inhibitör internöronlardaki 5-HT_{2A} reseptörleri antinosiseptif özellik göstermektedir. Benzer şekilde spinal internöronlardaki 5-HT_{2C} bölgeleri de serotoninin potansiyel antinosiseptif etkisine aracılık etmektedir (Silveira ve ark., 2010).

İnhibitör adrenerjik yolak

Antinosisepsiyon sağlamak için PAG veya RVM'nin elektriksel uyarılması ile serebrospinal sıvıda noradrenalin seviyelerinin artması ve bu artışın spinal adrenerjik antagonistlerle bloke edilmesi inisiyasyonla ilişkili antinosisepsiyonda noradrenalinin güçlü bir katkısı olduğunu göstermektedir. PAG ve RVM'nin her ikisi de noradrenerjik nöronları kapsamazken, ağrı modülasyonu için önemli olan A5 (locus coeruleus), A6 ve A7 (Kölliker-Füse) çekirdekleri de dahil olmak üzere noradrenerjik bölgelerle bağlantılara sahiptir. Bu noradrenerjik çekirdekler omuriliğe kadar doğrudan noradrenerjik projeksiyonların başlıca kaynağıdır ve presinaptik ve postsinaptik spinal ağrı transmisyon nöronlarının inhibisyonuna katkı sağlamaktadır (Pertovaara ve Almeida, 2006; Ossipov ve ark., 2010). Spinotalamik sistem nöronlarının hücre gövdelerinin doğrudan katekolaminerjik inervasyonu spinal ağrı iletim nöronlarının postsinaptik noradrenerjik inhibisyonu için yapısal bir temel sağlamaktadır. Ayrıca, spinal DB yüzeysel laminalarında noradrenalin, inhibitör internöronlar olması muhtemel olan küçük, alçak eşikli bir popülasyonunu aktive etmektedir. İnhibitör internöronların noradrenerjik aktivasyonu SG' da GABAerjik ve glisinerjik inhibitör sinaptik transmisyonun artışına yol açmaktadır (Pertovaara ve Almeida, 2006). Bu mekanizmalara ek olarak adrenerjik aktivasyonun postsinaptik bölgelerin yanı sıra, primer afferent terminallerden eksitator nörotransmitterlerin salınımını inhibe ederek presinaptik aktivite aracılığıyla omurilik düzeyinde nosiseptif transmisyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Ossipov ve ark., 2010). Çalışmalar spinal α_2 -adrenerjik reseptörlerin noradrenalinin antinosiseptif etkisine aracılık ettiğini göstermektedir (Pertovaara, 2006). Örneğin, α_2 -adrenerjik reseptörler agonisti klonidinin spinal uygulanması sağlıklı gönüllülerde termal ve kapsaisinindüklediği ağrıyı bloke etmiştir. Omurilik dilimlerinde gerçekleştirilen kayıtlar α_2 -adrenerjik reseptör aktivasyonunun nöronları hiperpolarize ederek inhibisyon sağladığını göstermiştir (Ossipov ve ark., 2010). Noradrenalin presinaptik α_2 -adrenoseptörlerdeki (özellikle adrenoseptör alt tipi α_{2A}) etkisinden dolayı omurilikte nosiseptif sinyallerin transmisyonunu inhibe etmektedir. Bir diğer reseptör alt tipi olan α_{2C} -adrenoseptör alt tipleri de, spinal dorsal boynuzda bulunmaktadır fakat dağılımı α_{2A} -adrenoseptörlerinkinden çok farklıdır. Şöyle ki, α_{2C} -adrenoseptörler, eksitator olması muhtemel olan ve büyük ihtimalle medullaya çıkan projeksiyonlarla

nosisieptif nöronları innerve eden spinal internöronların akson terminallerinde yerleşmiştir. Bu anatomik bulgular, spinal α_{2C} -adrenoseptörlerin presinaptik olarak pronosisieptif spinal internöronların inhibisyonunu sağlayarak ağrı baskılayıcı etkilere sahip olduğu hipotezini desteklemektedir (Pertovaara ve Almeida, 2006). İnhibitör internöronların noradrenerjik aktivasyonu substantia gelatinosada GABAerjik ve glisinerjik inhibitör sinaptik transmisyonun artışına yol açmaktadır (Pertovaara ve Almeida, 2006). Yakın zamanlarda, α_1 -adrenerjik reseptörlerin aktivasyonunun da GABA internöronlarının depolarizasyonuna neden olduğu kanıtlanmıştır ve bu mekanizma inhibisyondaki artışın bir başka mekanizması olarak sunulmuştur. Spinal α_1 -adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu ayrıca DB nöronlarının zararlı inputlara cevabını arttırmaktadır (Ossipov ve ark., 2010).

Ağrının Doğal Tedavisi

Ağrı tedavisi için piyasada NSAİİlar ve opioidler gibi birçok ilaç bulunmasına rağmen, NSAİİlar ile; gastrik ve intestinal problemler, ülser, kanama, ve opioidler ile; fiziksel bağımlılık, yoksunluk sendromu, tolerans gelişimi, sedasyon, kabızlık gibi yan etkilerin ortaya çıkmasından dolayı çoğu hasta tamamlayıcı veya alternatif tedavi olarak bitkisel tedaviye başvurmakta ve olumlu yanıt almaktadır (Benyamin ve ark., 2008; Zareba, 2009; Pragasam ve Rasool, 2013). Ayrıca artık günümüzde ilerleyen tıp bilimi ve teknolojiler sayesinde halk arasında şifalı olduğu bildirilen bitkilerin etkileri ve bu etkilere aracı olan kimyasal ya da kimyasallar belirlenebilmektedir (Süzer, 2005). Tartışmasız bir şekilde bitkiden elde edilen bileşikler; günümüzde kullanılan çeşitli anti-inflamatuvar ve analjezik ilaçların gelişimine fazlasıyla katkıda bulunmuştur (Pragasam ve Rasool, 2013). Örneğin; opioid ismi afyonun bileşenleriyle aynı etki mekanizmasına sahip tüm bileşiklere verilen ortak bir isimdir. *Papaver somniferum*'dan elde edilen afyonun ağrı için kullanımı tarih yazılmadan önce de bilinmektedir. Tüm opioidler günümüzde dört alt tipi olan endojen opioid reseptör sistemiyle etkileşerek ağrının giderilmesini sağlamaktadır (McCurdy ve Scully, 2005). Fakat belirtildiği gibi opioidlerin kullanımını da kısıtlayan birçok yan etkisi vardır. Dolayısıyla son zamanlarda günümüz tıbbında daha az yan etkiye ve daha güçlü terapötik sonuçlara sahip olan bitkisel ilaçlarla tedaviye ilgi daha da artmıştır (Süzer, 2005; Mehrotra ve ark., 2011). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2000 yılındaki raporunda, Avrupa, Avustralya ve Kuzey Amerika' da yaşayan insanların yaklaşık % 50'sinin alternatif-destekleyici tedavi metotlarından birini kullandıklarını ve bu metotlar içinde en çok kullanılanın da bitkisel ilaçlar olduğu açıklanmıştır (Süzer, 2005). Sentetik ilaçların ilaç endüstrisinde önemli payı olsa bile, doğal ilaç etken maddeleri ve bileşiklerden üretilen ilaçlar günümüzde kullanılan ilaçların neredeyse % 50' sini oluşturmaktadır. 1981-2006 arasında geliştirilen ilaçların % 32'si doğal ya da yarı sentetiktir, ayrıca yeni geliştirilen ilaçların % 17'si de doğal ürünlerin kromoforları esas alınarak geliştirilen ilaçlardır. Yeni ilaçların neredeyse yarısının doğal kaynakları esas alması ilaç geliştirme çalışmalarını hızla doğaya yönlendirmektedir (Harput, 2010).

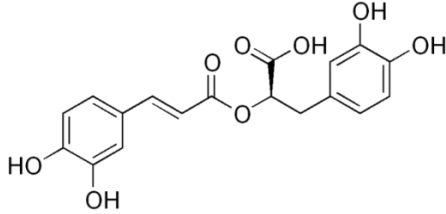
Bitkilerin içinde yaygın olarak bulunan antioksidan etkili besinsel polifenoller ve fenolik asitlerin insan sağlığı için güvenli ve yararlı oldukları artık bilinen bir gerçektir ve bu özelliklerini serbest radikal süpürücü, metal şelasyonu, enzimatik aktivitenin düzenlenmesi ve sinyal transdüksiyon yollarının değişimi gibi çeşitli

biyolojik etkilerine borçlu oldukları bildirilmiştir (Mattila ve ark., 2006; Pragasam ve Rasool, 2013). Ayrıca antioksidan özellik gösteren fenolik maddelerin analjezik etkinliğe sahip olduğu görülmektedir (Güvenç ve ark., 2010; Rabelo ve ark., 2013). Çeşitli çalışmalarla fenolik asit içeren bitkilerin analjezik etkinlikleri değerlendirilmiş ve etki, içeriklerinde bol miktarda bulunan fenoliklere dayandırılmıştır (Gorzalczyk ve ark., 2011; İbrahim, 2012; Liao ve ark., 2012; Sen ve ark., 2013). Saf fenolik asitlerin ise, ağrının giderilmesinde yeri olan anti-inflammatuar etkinlikleri nispeten daha çok çalışılmış, analjezik etkinliklerine dair bilgiler kısıtlı kalmıştır.

Fenolik bileşenler

Fenolik bileşenler veya polifenolikler, benzen halkasına bir veya daha fazla hidroksil grubunun bağlanmasıyla karakterize olan kimyasal bileşenlerdir. Polifenoller bitkilerde doğal olarak bulunan antioksidan özellikli ikinci metabolizma ürünleridir. Antioksidan aktivitelerini geçiş metallere şelasyonu ve serbest radikallerin süpürülmesi de dahil enzimlerin inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla göstermektedirler. Doğal antioksidanlar olması yeni ilaçlar olarak geliştirilmelerine öncülük eden aktiviteleridir (Liao ve ark., 2012). Bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan ve çok çeşitli olan fenolikler son zamanlarda özellikle sağlığı iyi yönde etkileyen (health-promoting) takviyelerde de yer almaktadır. Bunun yanı sıra bitkilerden elde edilen şarap, çay ve kahve gibi bazı içeceklerde de bulunmaktadır (dos Santos ve ark., 2006). Polifenollerin, antioksidan özelliklerinin yanı sıra çoklu biyolojik aktivitelerinin olduğu bilinmektedir ve bu özelliklerinden dolayı bu bileşiklere ve etkilerinin aydınlatılması üzerine artan bir ilgi vardır. Söz konusu biyolojik aktivitelerine örnek vermek gerekirse; epidemiyolojik kanıtlara göre polifenolce zengin besinlerin tüketiminin, kanser görülme sıklığını, koroner kalp hastalığını ve inflamasyonu azaltması söylenebilmektedir (dos Santos ve ark., 2006). Ayrıca, fenolikleri içeren bitkilerin ve bazı fenoliklerin analjezik etki gösterdiği de rapor edilmektedir (Güvenç ve ark., 2010; Rabelo ve ark., 2013). Bu fenoliklerden bir tanesi de rosmarinik asittir. Örneğin; geleneksel olarak diyabet, kemik ve kas ağrısında kullanılan *Orthosiphon stamineus* bitkisinin ana aktif bileşenlerinden bir tanesi rosmarinik asittir (Pan ve ark., 2011). Yine birçok ağrılı durumda etkili olduğu çoklu randomize kontrollü deneylerle gösterilen Comfrey preparatının içeriğinde kafeik ve klorojenik asit gibi başka fenoliklerin yanı sıra daha çok rosmarinik asitin yer aldığı ve bitkinin farmakodinamik etkilerinden sorumlu olan majör bileşenlerinden birinin rosmarinik asit olduğu bildirilmektedir. Söz konusu bildiride rosmarinik asitin prostaglandin sentezini inhibe ettiğinin gösterildiği bir çalışmaya (Gracza ve ark., 1985) atıfta bulunulmuş fakat söz konusu çalışmaya tarafımızca ulaşılamamıştır (Staiger, 2012). Yapılan çeşitli çalışmalar ile ise bitkilerden izole edilen rosmarinik asitin analjezik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Guginski ve ark., 2009).

Rosmarinik asit



Şekil 1. Rosmarinik Asitin Kimyasal Formülü

Rosmarinik asit [(2"R") -2- [[(2"E") -3- (3,4-Dihidroksifenil) -1- okso -2-propenil]]oksi] -3- (3,4-dihidroksifenil)propanoik asit]; kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asidin esteridir. Yaygın olarak Boraginaceae ve Lamiaceae familyasının alt familyası olan Nepetoideae türlerinde bulunan antioksidan özellikli rosmarinik asitin ayrıca Araliaceae, Cucurbitaceae, Rubiaceae, Tiliaceae, Blechnaceae, Anthocerotaceae gibi birçok başka familyadaki bitkilerde de mevcut olduğu gösterilmiştir. Bu fenolik asit, ilk defa Scarpati ve Oriente tarafından 1958 yılında saf bileşen olarak *Rosmarinus officinalis* bitkisinden sentezlendiği için ismini rosmarinik asit olarak almıştır. Rosmarinik asit bitkilerde esas olarak savunma bileşeni olarak davranmaktadır. Rosmarinik asitin tıbbi bitkiler, şifalı otlar ve baharatlarda yer alması bu bitkilerin sağlık açısından faydalı etkiler göstermesini sağlamaktadır. Ayrıca çok düşük toksisteye sahiptir. Farelerde *i.v.* uygulamadan sonra LD₅₀ değeri 561 mg/kg olarak belirlenmiştir. Rosmarinik asit; antioksidan, antiviral, antibakteriyel, antimutajen ve anti-inflamatuvar etki gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Anti-inflamatuvar etkinliğinin lipoksijenaz ve siklooksijenaz inhibisyonuna bağlı gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Aynı zamanda kansere karşı koruma sağladığı ve kozmetik sektöründe de antioksidan özelliğinden dolayı yer alan bitkilerde bulunduğu bilinmektedir (Petersen ve Simmonds, 2003). Rosmarinik asitin 2014 yılına kadar çalışılan biyolojik ve farmakojik aktiviteleri Al-Dhabi ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bir derlemede aşağıdaki şekilde rapor edilmiştir.

1. Sisplatin ile böbreklerde oluşan oksidatif stresi, inflamasyonu ve apoptozisi hafifletmektedir.
2. Oksidatif stresin baskılanmasıyla böbreklerde gelişen iskemi/reperfüzyon zedelenmesini önlemektedir.
3. Stres genlerini değiştirerek ve intraselüler antioksidan yeteneğini artırarak hiperterminin neden olduğu kas hücreleri hasarına ve selüler apoptozise karşı koruma sağladığı bildirilmiştir.
4. Diyabete bağlı hasarlara karşı aortik endotelial fonksiyonu ve nanoölçümsel yapıyı koruduğu ve korumada rosmarinik asitin hem antioksidan hem de anti-inflamatuvar özelliğinin rol oynadığı bildirilmiştir.
5. Cd²⁺-aracılıklı hücre toksisitesini, reaktif oksijen türleri oluşumunu, interlökin (IL)-6 ve IL-1 β üretimini, hücreye apoptozis indükleyici faktör translokasyonunu, kaspaz-3 aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.

6. Diyabetik iskemi/reperfüzyon zedelenmesini hafifleterek ve kan-beyin bariyerinin bozulmasını azaltarak beyini iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruma sağladığı bildirilmiştir.
7. Rosmarinik asitin HMGB1 (high-mobility group box 1/ yüksek mobiliteli B1 protein grubu) sinyal yolağının inhibisyonu üzerinden çeşitli inflamatuvar hastalıkların tedavisinde olası terapötik bir ajan olduğu savunulmuştur.
8. 1,2-dimetilhidrazin-aracılıklı sıçan kolon karsinogenesizine karşı kemopreventif etkinlik göstermiştir.
9. Solunum yolu alerjisi modelinde terapötik potansiyel göstermiştir.
10. Liposakkaritle indüklenen akut akciğer zedelenmesi modelinde anti-inflamatuvar etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.
11. 7,12-dimetilbenz(a)antrasen-aracılıklı deri karsinogenesizinde anti-lipit peroksidatif, anti-kanser ve apoptotik etkili bulunmuştur.
12. Etanol ile indüklenen DNA hasarının seviyesini azalttığı bildirilmiştir.
13. 6-hidroksidopamin ile indüklenen nigrostriatal dopaminerjik sistemin dejenerasyonuna karşı nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir.
14. Antioksidan özelliğinden dolayı kardiyoprotektör ve vazoaaktif madde olarak davrandığı bildirilmiştir. Dolayısıyla insülin rezistansı ile ilişkili kardiyovasküler riskleri azaltma yönünde etkili bir ajan olabileceği iddia edilmiştir.
15. Kanamayı durdurucu etkisinin olduğu bildirilmiştir.
16. Tümör ve akciğer nodüllerinin ağırlığını düşürdüğü için tümör metastazını inhibe ettiği bildirilmiştir.
17. Foto-protektif etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir.
18. Atopik dermatite karşı kullanılabileceği bildirilmiştir.

Görüldüğü üzere rosmarinik asitin anti-inflamatuvar etkinliği ve mekanizması birçok çalışma ile ortaya koyulmuştur. Anti-inflamatuvar ajanların ağrı kesici etkinlik gösterdiği bilinmektedir (Ballou ve ark., 2000). Nitekim, rosmarinik asitin analjezik etkinlik gösterdiğine dair raporlar da mevcuttur. Guginski ve arkadaşları (2009) swiss albino (25-35 gr) cinsi farelerde (her iki cinsiyetten de) Lamiaceae familyasına ait *Melissa officinalis* (melisa) yapraklarından elde edilen etanol ekstresinin neden olduğu antinosisepsiyonda yer alan mekanizmayı çeşitli yöntemler kullanarak incelemiştir. Ekstrenin (3-1000 mg/kg) oral uygulamasından 1 saat sonra herhangi bir motor disfonksiyon yapmadan, asetik asitin indüklediği visseral nosisepsiyonda, doza-bağımlı ve belirgin antinosisepsiyon yaptığı gözlenmiştir. Formalin testinde de ekstrenin (30-1000 mg/kg, *p.o.*) hem nörojenik (erken faz) hem de inflamatuvar ağrıda (geç faz) anlamlı bir inhibisyon oluşturduğu bildirilmiştir. HPLC analizine göre ekstraktın ana bileşeninin rosmarinik asit olduğu belirtilmiştir (% 4.37). Glutamatın indüklediği nosisepsiyonda hayvanların intraplantar sağ arka pençe ventral yüzeyine 20µL glutamat verilmeden 1 saat önce, 10-1000 mg/kg, *p.o.* ekstre veya 0.3-3 mg/kg, *p.o.* rosmarinik asit uygulamasının glutamatın indüklediği nosisepsiyonda doza-bağımlı ve anlamlı inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca santral analjezik aktivite hakkında fikir veren glutamat testinde rosmarinik asitin ekstraktan 75 kat daha güçlü olduğunun görüldüğü belirtilmiştir. Dolayısıyla rosmarinik asitin *M. officinalis* ekstresinin gösterdiği antinosiseptif özellikle

katkısının olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, glutamat testinde ekstrenin antinosiseptif etkisi *i.p.* atropin, mekamilamin ve L-arjinin ile geri çevrilmiş fakat nalokson ile geri çevrilemediği gözlenmiştir.

Lamiaceae familyasından başka bir bitki olan *R. officinalis* L. sulu ekstresinin sıçanlarda analjezik etkisinin değerlendirildiği başka bir çalışmada formalin ve kıvranma testleri kullanılmıştır. Bitkinin ana bileşeni olması nedeniyle 10, 20 ve 40 mg/kg rosmarinik asit de test edilmiştir fakat çalışmada kıvranma testinde anlamlı bir etki görülmemiştir. Formalin testinin ise ilk fazında etkili olmayıp sadece 20 mg/kg dozda geç fazı inhibe ettiği gözlenmiştir (Lucarini ve ark., 2013).

Boonyarikpunchai ve arkadaşları (2014), *Thunbergia Laurifolia* Lindl. yapraklarının etanol ekstresinden izole edilen rosmarinik asitin erkek ICR farelerde inflamasyon ve nosisepsiyondaki etkilerini incelemiş ve rosmarinik asitin bu etkilerin altında yatan mekanizmasını sıcak-plaka, formalin ve asetik asitle indüklenen kıvranma testi kullanarak değerlendirmişlerdir. Sıcak-plaka testinde rosmarinik asitin (12.5, 25, 50, 100 ve 150 mg/kg) etkisi, *p.o.* uygulamadan sonra 15, 30, 45, 60, 90, 120 ve 240. dk.larda ölçülerek değerlendirilmiş ve 50, 100 ve 150 mg/kg dozların kullanıldığı gruplarda kontrol gruplarıyla kıyaslandığında gecikme sürelerinde anlamlı derecede artış gözlemlendiği belirtilmiştir. En etkili dozunun 100 mg/kg olduğu gözlenmiştir. Ayrıca antinosiseptif etkisi spesifik opioid reseptör antagonisti olan nalokson tarafından inhibe edilebildiği için rosmarinik asitin morfin gibi etki gösterdiği bildirilmiştir. Asetik asitin indüklediği kıvranma testinde farelere % 0.6 asetik asit (*i.p.*) enjeksiyonundan 1 saat önce *p.o.* rosmarinik asit (12.5, 25, 50, 100 ve 150 mg/kg) uygulanmış ve kıvranma sayıları asetik asit enjeksiyonundan sonra 5. dk itibarıyla 30.dk'ya kadar sayılmıştır. 50 ve 100 mg/kg dozlarının asetik asitin indüklediği kıvranma sayılarını anlamlı derecede azalttığı gözlenmiştir. Rosmarinik asitin bu etkisinin inflamatuvar mediatörlerin açığa çıkmasının azaltılmasıyla veya reseptörlerin direk blokajıyla ilgili olabileceği belirtilmiştir. Formalin testinde, *p.o.* rosmarinik asit (12.5, 25, 50, 100 ve 150 mg/kg) uygulamasından 1 saat sonra, % 2.5 formalin solüsyonu (20µL) *s.c.* olarak sol arka pençe yüzeyine enjekte edilmiş ve cam silindir içine alınan hayvanların yalama ve ısırma süreleri 0-5 ve 15-30 dk.larda kaydedilmiştir. 100 mg/kg rosmarinik asitin kontrol grubuyla kıyaslandığında formalinin indüklediği nosisepsiyonun her iki fazında da sırasıyla anlamlı olarak inhibisyon gösterdiği ve geç faz boyunca formalinin indüklediği nosisepsiyonda da aynı dozun inhibitör etkisinin NSAİİ olan indometazin etkisiyle kıyaslanabilir olduğu bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada, 10 ve 30 mg/kg dozlarda 8 hafta süresince *p.o.* uygulanan rosmarinik asit diyabet ile oluşturulan nöropatik ağrı çalışmalarında formalinin her iki fazını da inhibe etmiş ve kuyruk-çekme testinde termal ağrı eşiğini yükselterek pençe çekme testinde mekanik ağrı eşiğini yükselterek anlamlı etki göstermiştir (Hasanein ve Mohammad Zaheri, 2014).

Connelly ve arkadaşlarının (2014) yapmış olduğu randomize çift-kör çalışmada ise, yüksek rosmarinik asit içeren nane çayının 16 hafta süresince günde 2 kez tüketilmesinin osteoartrit ağrılarında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.

Bu bilgilerden hareketle tez çalışmasında, farelerde oral uygulanan 0.3, 1 ve 3 mg/kg rosmarinik asitin santral analjezik etkinliğinin sıcak-plaka ve kuyruk-batırma testleri ile zamana bağlı olarak, periferik analjezik etkinliğinin asetik asit ile indüklenen kıvrınma testi ile değerlendirilmesi, ve rosmarinik asitin neden olduğu antinosisepsiyona ağrı modülasyonuna önemli katkısı olduğu bilinen inisi inhibitör yollarda yer alan serotonerjik sistem rolünün 5HT_{2A/2C} reseptör antagonisti ketanserin (1 mg/kg) kullanılarak ve adrenerjik sistem rolünün α_2 -adrenerjik antanogist yohimbin (1 mg/kg) kullanılarak araştırılması amaçlanmaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kullanılan Sarf malzemeleri

Rosmarinik asit, ketanserin, yohimbin (Sigma, St. Louis, A.B.D.), asetik asit, Tween 80, (Merck, Almanya).

Kullanılan Cihazlar

Sıcak-plaka (Hot-Plate: Ugo-Basile, 7280, İtalya), Dijital Fırın Termometresi (TFA, LT-101, Reicholzheim, Almanya), Ultrasonik Su Banyosu (Heto, Allerod, Danimarka), Hassas Terazı (Ohaus, E12140, İsviçre).

Deney Hayvanları

30-35 g ağırlığında balb-c erkek fareler kullanılmıştır. 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsüne ayarlanmış 22 ± 1 °C sıcaklığındaki iyi havalandırılan odalarda barındırılan hayvanlar deneylerden birkaç gün önce deney yapılacak odaya alınarak deney ortamına alışması sağlanmıştır. Beslenmeleri amacıyla standart yem pelletleri ve çeşme suyu verilmiş, test maddeleri ile oluşabilecek olası etkileşimlerden dolayı deneyler uygulanmadan 12 saat önce aç bırakılmışlardır. Hayvan deneyleri için Anadolu Üniversitesi (Karar No:2014-03, 11.04.2014) ve Osmangazi Üniversitesi Yerel Etik Komitesi (Karar No:475-1, 19.08.2015) tarafından Etik Kurul Onayı alınmıştır.

Deney Gruplarının Oluşturulması

Oluşturulan deney gruplarına ayrı ayrı: eşit hacim çözücü (kontrol grubu-salin), 0.3, 1 ve 3 mg/kg rosmarinik asit gavaj iğnesi yardımıyla oral yolla (*p.o.*) uygulanmıştır. Maddeleri uygulamadan önce (baseline) 0. dk.' da ve uygulandıktan sonra 30, 45, 60, 90 ve 120 dk.' larda, santral analjeziyi değerlendirmek için kullanılan sıcak-plaka ve kuyruk-batırma deneyleri uygulanmıştır. Daha sonra aynı uygulamaları içeren farklı deney grupları oluşturulmuş ve bu gruplara ise madde verilmesinden 45 dk. sonra periferik analjeziyi değerlendirmek için kullanılan kıvrınma testi uygulanmıştır. Etki mekanizmasının analizi için oluşturulan gruplara ise ayrı ayrı çözücü, 30 mg/kg rosmarinik asit, çözücü + 1 mg/kg ketanserin (*i.p.*), 30 mg/kg rosmarinik asit + 1 mg/kg ketanserin, çözücü + 1 mg/kg yohimbin (*i.p.*), 30 mg/kg rosmarinik asit + 1 mg/kg yohimbin uygulanmış ve tüm analjezi test prosedürleri 45. dk.' da uygulanmıştır. Antagonist uygulaması çözücü veya test maddesi uygulamasından 30 dk. önce gerçekleştirilmiştir.

Deneyel Yöntemler

Sıcak-plaka testi

Sıcak-plaka (sıcak-zemin) testi, en sık kullanılan termal analjezi ölçüm yöntemlerinden biridir. Bu test kapsamında kullanılan ve etrafı pleksiglas bir silindirik ile sınırlandırılmış olan Ugo Basile (No: 7280) ısı tablası, 55 °C' ye kadar ısıtılmıştır. Hayvanın sıcak zemine bırakıldığı andan, arka ayaklarını çekme, yalama, bacakları üzerinde yükselme veya sıçrama hareketlerinden birinin gözlemlendiği ana kadar geçen zaman ölçülmüş ve reaksiyon süresi olarak kaydedilmiştir (Eddy ve Leimback, 1953). Hayvanların ayaklarının sıcaktan zarar

görmesini engellemek için deneyin bitirilme süresi (cut-off time) 20 sn. olarak belirlenmiştir.

Kuyruk-batırma testi

Analjezi çalışmalarında kullanılan termal uyarının uygulandığı bir diğer metottur. Hayvanın kuyruğunun ucundan itibaren yaklaşık 3 cm' lik kısım bir beher içerisinde bulunan 52.5 ± 0.2 °C sıcaklığındaki suya (su banyosu kullanılarak sıcaklığı ayarlanmıştır) daldırılmıştır. Kronometre yardımı ile hayvanın kuyruğunun suyun içine daldırıldığı andan, suyun dışına doğru hızlıca çekmesine kadar geçen süre ölçülmüştür (Schmauss ve Yaksh, 1984). Hayvanların kuyruklarının sıcaktan zarar görmesini engellemek için deneyin bitirilme süresi (cut-off time) 15 sn. olarak belirlenmiştir.

Asetik asit ile indüklenen kıvranma testi

Kimyasal uyarının kullanıldığı analjezi ölçüm yöntemidir. Hayvanlarda güçlü visseral ağrı oluşturabilmek için asetik asit solüsyonu kullanılmıştır. Hayvanlarda, asetik asitin *i.p.* olarak uygulanmasından sonra karın kaslarında kasılma ile başlayıp daha sonra arka ayakların geriye doğru gerilmesi ve karnın yere sürünmesi ile karakterize bir kıvranma hareketi sayısı ölçülmüştür (Koster ve ark., 1959). % 0.6' lık asetik asit solüsyonu, hayvanlara maddelerin enjeksiyonundan 45 dk. sonra (diğer yöntemlerle ortalama bu dk. da analjezik etki gösterdikleri saptandığı için bu dk. seçilmiştir) *i.p.* yolla verilmiştir. 5 dk.' lık bekleme süresinin sonunda, her hayvanda bahsedilen kıvranma hareketleri 10 dk. süresince sayılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Aktivite deneylerinde, sıcak-plaka ve kuyruk-batırma testlerinden elde edilen verilerin analizleri çift-yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Benferronni testi uygulanarak yapılmıştır. Kıvranma testinden elde edilen verilerin analizleri ise tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak yapılmıştır. Etki mekanizmasının değerlendirildiği çalışmaların sonuçları tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak yapılmıştır.

Sıcak-plaka ve kuyruk-batırma testlerinden elde edilen sürelerden hareketle sonuçlar maksimum olası etkinin yüzdesi (% MPE) şeklinde aşağıdaki formülden hareketle hesaplanmıştır (Coelho ve ark., 2005):

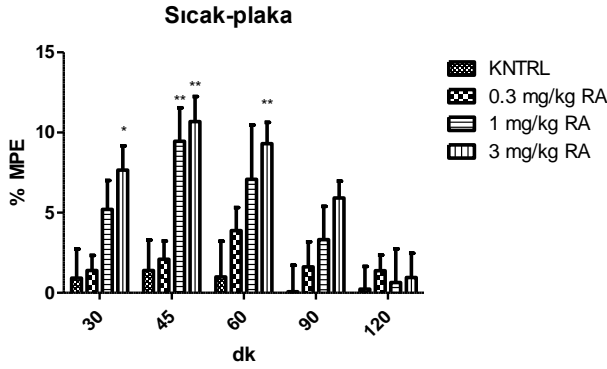
$$\text{MPE}\% = \frac{[(\text{ilaç sonrası ölçülen süre}) - (\text{ilaç öncesi ölçülen süre}) / (\text{deneyi kesme süresi}) - (\text{ilaç öncesi ölçülen süre})] \times 100}$$

Tüm istatistiksel analiz sonuçları Graphpad Prism ver. 5.0 paket programı kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm analiz sonuçları ortalama \pm standart hata (S.H.) olarak ifade edilmiş ve istatistiksel anlamlılık düzeyi başlangıcı olarak $P < 0.05$ kabul edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Sıcak-Plaka Testi

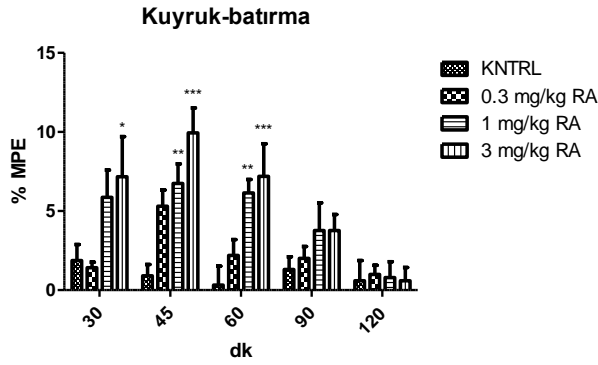
Şekil 2’de 0.3, 1 ve 3 mg/kg (*p.o.*) rosmarinik asitin 30, 45, 60, 90 ve 120 dk.’ larda sıcak-plaka testinde verdiği cevap sürelerinden hareketle hesaplanan olası maksimum etkileri görülmektedir. 1 mg/kg rosmarinik asitin sadece 45 dk. da sıcak-plaka ile pençelerine uygulanan termal uyarana karşı verilen cevabın süresini uzattığı ve 3 mg/kg dozun ise 30, 45 ve 60 dk. da etkili olduğu belirlendi (1 mg/kg; 45 dk: $P<0.01$ - 3 mg/kg; 30 dk: $P<0.05$, 45 dk: $P<0.01$, 60 dk: $P<0.01$). Ayrıca rosmarinik asitin etkisinin 30. dk’ da belirip 30 dk kadar devam ettiği gözlemlendi.



Şekil 2. Rosmarinik Asitin Sıcak-Plaka Testindeki Olası Maksimum Analjezik Etkisi KNTRL; Kontrol Grubu, RA; Rosmarinik Asit, MPE; Olası Maksimum Etki. * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Kontrol Grubuna Göre Anlamlı Fark, Değerler Ortalama \pm S.H. (Standart Hata)

Kuyruk-Batırma Testi

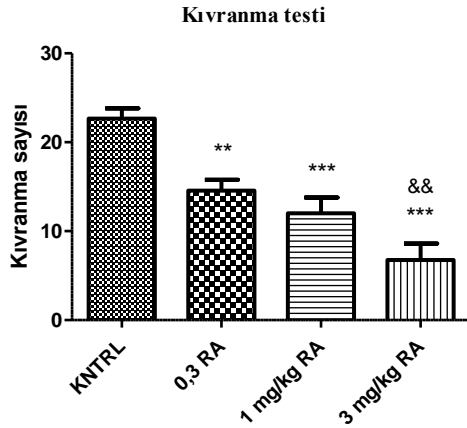
Şekil 3’de 0.3, 1 ve 3 mg/kg (*p.o.*) rosmarinik asitin 30, 45, 60, 90 ve 120 dk.’ larda kuyruk-batırma testinde verdiği cevap sürelerinden hareketle hesaplanan olası maksimum etkileri görülmektedir. 1 ve 3 mg/kg rosmarinik asitin 45 ve 60 dk. da kuyruk-batırma testi ile kuyruklarına uygulanan termal uyarana karşı verilen cevabın süresini uzattığı, ayrıca 3 mg/kg dozun etkisinin 30. dk. da başladığı ve 30 dk. kadar devam ettiği belirlenmiştir (1 mg/kg; 45 ve 60 dk: $P<0.01$ - 3 mg/kg; 30 dk: $P<0.05$, 45 ve 60 dk: $P<0.001$).



Şekil 3. Rosmarinik Asitin Kuyruk-Batırma Testindeki Olası Maksimum Analjezik Etkisi KNTRL; Kontrol Grubu, RA; Rosmarinik Asit, MPE; Olası Maksimum Etki. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; Kontrol Grubuna Göre Anlamli Fark, Değerler Ortalama \pm S.H. (Standart Hata)

Asetik Asit ile İndüklenen Kıvrınma Testi

Şekil 4' de 0.3, 1 ve 3 mg/kg (*p.o.*) rosmarinik asit uygulanan gruplarda ölçülen kıvrınma sayıları grafiksel olarak görülmektedir. Bu sonuçlara göre 0.3, 1 ve 3 mg/kg rosmarinik asit (sırasıyla, $P<0.01$; $P<0.01$; $P<0.001$) uygulanan hayvanlarda asetik asit ile oluşturulan kıvrınma hareketi sayıları anlamlı olarak azaltdı. Ayrıca 3 mg/kg rosmarinik asitin etkisinin 0.3 mg/kg rosmarinik asitin etkisine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($P<0.01$) gösterdiği belirlendi.



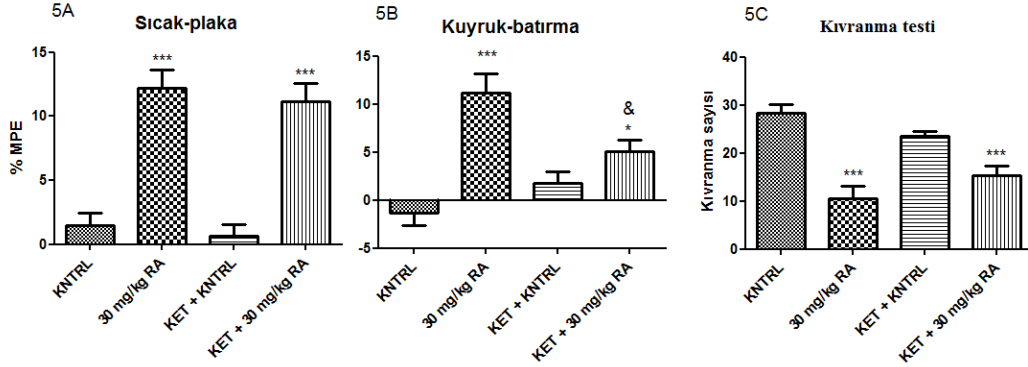
Şekil 4. Rosmarinik Asitin Kıvrınma Testindeki Analjezik Etkisi

KNTRL; Kontrol Grubu, RA; Rosmarinik Asit. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; Kontrol Grubuna Göre Anlamli Fark, && $P<0.01$; 0.3 mg/kg Rosmarinik Asite Göre Anlamli Farklılık, Değerler Ortalama \pm S.H. (Standart Hata)

Rosmarinik asitin analjezik etkisine serotonerjik sistemin katkısı

Şekil 5' de sırasıyla sıcak-plaka (5A), kuyruk-batırma (5B) ve kıvrınma testlerinde (5C) serotonerjik antagonist 1 mg/kg (*i.p.*) ketanserinin 30 dk. öncesinde ön-uygulamasının 30 mg/kg rosmarinik asitin analjezik etkisini ne şekilde değiştirdiği görülmektedir. Ketanserinin ön-uygulaması, 30 mg/kg rosmarinik asitin

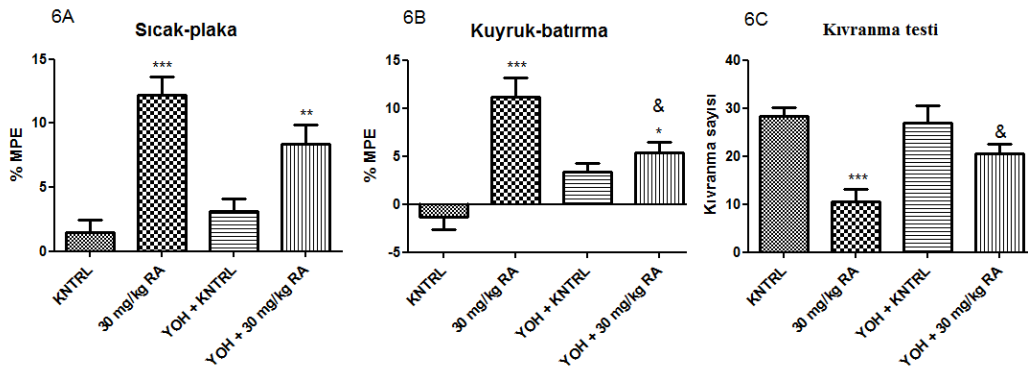
oluşturduğu termal uyarana karşı verilen cevap süresindeki artışı sıcak-plaka testinde değiştirmemiş, kuyruk-batırma testinde ise anlamlı olarak ($P<0.05$) geri çevirmiştir. Kıvrınma testinde ise ketanserin, 30 mg/kg rosmarinik asit uygulaması ile azaltılan kıvrınma sayısı üzerine etkili olmamıştır.



Şekil 5. 30 mg/kg Rosmarinik Asitin Sıcak-Plaka (5A), Kuyruk-Batırma (5B) ve Kıvrınma Testinde (5C) Göstermiş Olduğu Analjeziye 1 mg/kg Ketanserin Ön-Uygulamasının Etkisi KNTRL; Kontrol Grubu, RA; Rosmarinik Asit. KET; Ketanserin. * $P<0.05$, *** $P<0.001$; Kontrol Grubuna Göre Anlamlı Fark, & $P<0.05$; 30 mg/kg Rosmarinik Asite Göre Anlamlı Fark, Değerler Ortalama \pm S.H. (Standart Hata)

Rosmarinik asitin analjezik etkisine adrenerjik sistemin katkısı

Şekil 6'da sırasıyla sıcak-plaka (6A), kuyruk-batırma (6B) ve kıvrınma testlerinde (6C) adrenerjik antagonist 1 mg/kg (*i.p.*) yohimbin 30 dk. öncesinde ön-uygulamasının 30 mg/kg rosmarinik asitin analjezik etkisini ne şekilde değiştirdiği görülmektedir. Yohimbin ön-uygulaması, 30 mg/kg rosmarinik asitin oluşturduğu termal uyarana karşı verilen cevap süresindeki artışı sıcak-plaka testinde anlamlı olarak değiştirmese de göreceli olarak azaltmıştır. Kuyruk-batırma testinde ise anlamlı olarak ($P<0.05$) geri çevirmiştir. Kıvrınma testinde yohimbin, 30 mg/kg rosmarinik asit uygulaması ile azaltılan kıvrınma sayısını anlamlı olarak ($P<0.05$) arttırmıştır.



Şekil 6. 30 mg/kg Rosmarinik Asitin Sıcak-Plaka (6A), Kuyruk-Batırma (6B) ve Kıvrınma Testinde (6C) Göstermiş Olduğu Analjeziye 1 mg/kg Yohimbin Ön-Uygulamasının Etkisi KNTRL; Kontrol Grubu, RA; Rosmarinik Asit. YOH; Yohimbin. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; Kontrol Grubuna Göre Anlamlı Fark, & $P<0.05$, && $P<0.01$; 30 mg/kg Rosmarinik Asite Göre Anlamlı Fark, Değerler Ortalama \pm S.H. (Standart Hata)

Tez çalışmalarında analjezik aktiviteyi değerlendirmek için 3 farklı yöntem kullanılmıştır. Sıcak-plaka ve kuyruk-batırma testleri santral analjezik aktiviteyi değerlendirmek için seçilmiştir. Bu yöntemler spinal ve supraspinal refleksleri ayırt etmeye yaramaktadır. Şöyle ki; kuyruk batırma cevabı basit bir spinal reflektir ve spinal kord transeksiyonundan sonra ortaya çıkmaktadır. Sıcak-plaka ise nosisepsiyon için bir davranış modelidir ve pençe yalama veya sıçrama gibi daha organize davranışlar gözlenmektedir. Reaksiyonlar ise supraspinal mekanizmalarca kontrol edilmektedir (Flores ve ark., 2004). Kullanılan diğer bir yöntem olan asetik asit ile indüklenen kıvrınma testi ise periferel orjinli ağrıyı indüklemek için kullanılan kimyasal bir yöntemdir. Normalde periferel analjezik etkiyi çalışmak için kullanılsa da non-spesifik bir yöntemdir ve antikolinerjikler ve antihistaminikler gibi başka ajanlar da bu yöntemde etkili çıkmaktadır (Chang ve ark., 2011). Ayrıca morfin gibi santral analjezikler de bu yöntemde etkili bulunmaktadır. Bu yöntem bir bileşiğin diğer modellerde inaktif olan dozlarda antinosiseptif potansiyelini saptayacak kadar hassas olmasından dolayı, periferel antinosiseptif aktiviteyi değerlendirmek için oldukça sık kullanılan bir metottur (Mehrotra ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasında fenolik bir madde olan rosmarinik asitin 0.3, 1 ve 3 mg/kg dozlarda oral uygulamasının kuyruk-batırma ve sıcak-plaka testlerinde termal uyarana karşı farelerin eşiğini anlamlı derece yükselterek ve kimyasal ile oluşturulan ağrı (kıvrınma davranışı) davranışını anlamlı derecede azaltarak hem santral (supraspinal ve spinal seviyede) hem de periferel analjezik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Rosmarinik asitin analjezik aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, *M. officinalis* yaprak ekstresinden elde edilen rosmarinik asitin (0.3-3 mg/kg) pençe içi glutamat uygulamasından 1 saat önce verildiğinde (*p.o.*) glutamatın neden olduğu nosiseptif cevapta anlamlı ve doza-bağımlı bir inhibisyon sergilediği görülmüştür (Guginski ve ark., 2009). Glutamat nosiseptif sinyal iletimindeki majör eksitator nörotransmitterdir ve pençe içi glutamat injeksiyonu DB' da yine glutamat gibi birçok eksitator madde salınımına neden olmaktadır. Ayrıca glutamat periferel, spinal ve supraspinal reseptörleri aracılığıyla ağrı yanıtı oluşturmaktadır (Brandão ve ark., 2013). Dolayısıyla rosmarinik asitin bu test modelinde aktif olması santral analjezik etkiye sahip olabileceğini akla getirmektedir. Analjezik aktiviteyi değerlendirmek için kullanılan birçok test yöntemi bulunmakta ve yöntemlerin her biri farklı mekanizmaların yer aldığı ağrı davranışını değerlendirebilmektedir. Dolayısıyla bir test modelinde etkili bulunan ajan başka bir yöntemde etkili bulunmayabilmekte veya da yaygın bir analjezik etki profili mevcutsa çoğu yöntemde etkili çıkabilmektedir. Bir test yöntemi ile etkisi ortaya koyulan bileşiğin diğer yöntemlerle de etkisinin olup olmadığının araştırılması ve etkide rol oynayan mekanizmaların aydınlatılması farmakolojik etki profilini belirleyebilmek için gereklidir. Ağrı ile ilgili çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir diğer yöntem formalin testidir. Yöntemde test edilen ağrı davranış yanıtı 2 aşamalıdır ve ağrının farklı tiplerinin tanımlanmasını sağlamaktadır. Bu aşamalardan, erken veya ilk faz non-inflamatuvar ağrı olarak bilinen kısımır. Geç veya ikinci faz, inflamatuvarlı ağrı olarak bilinmektedir ve serotonin, histamin, bradikinin ve prostaglandinlerin salımından dolayı periferel inflamasyonla ilişkilendirilmektedir. Morfin gibi santral etkili analjeziklerin her iki fazda da antinosiseptif potansiyelde olduğu, NSAİİların ve steroidlerin

yalnızca son fazı inhibe ettiği bildirilmiştir (Shin ve ark., 2004). Rosmarinik asitin analjezik etkisi başka çalışmalarda formalin testi kullanılarak da değerlendirilmiştir. 10, 20 ve 40 mg/kg rosmarinik asitin kullanıldığı çalışmalardan birinde ilk fazda etki görülmemiş rosmarinik asitin sadece 20 mg/kg dozda geç fazı inhibe ettiği gözlenmiştir (Lucarini ve ark., 2013). Başka bir çalışmada ise formalin testinde, *p.o.* rosmarinik asit (12.5, 25, 50, 100 ve 150 mg/kg) uygulamasından 1 saat sonra, 100 mg/kg rosmarinik asitin kontrol grubuyla kıyaslandığında formalinin indüklediği nosisepsiyonun her iki fazında da sırasıyla anlamlı olarak inhibisyon gösterdiği ve geç faz boyunca formalinin indüklediği nosisepsiyonda da aynı dozun inhibitör etkisinin NSAİİ olan indometazinin etkisiyle kıyaslanabilir olduğu gözlenmiştir (Boonyarikpunchai ve ark., 2014). Benzer bir şekilde nöropatik ağrı modeli oluşturulan bir çalışmada rosmarinik asit 10 ve 30 mg/kg dozlarda 8 hafta süresince *p.o.* uygulanmış ve formalin testinin her iki fazında da anlamlı analjezik etki göstermiştir (Hasanein ve Mohammad Zaheri, 2014). Formalin testi ile yapılan çalışma sonuçları her ne kadar farklılık gösterse de daha çok santral analjezik aktivite gösteriyor olabileceği yönündedir. Santral analjezik aktiviteyle ilgili olarak yukarıda bahsedilen çalışmalarda rosmarinik asitin analjezik aktivitesi sıcak-plaka testi ile de değerlendirilmiştir. Rosmarinik asitin 50, 100 ve 150 mg/kg dozların kullanıldığı gruplarda kontrol gruplarıyla kıyaslandığında termal uyaran verilen cevabın gecikme sürelerinde anlamlı derecede artış gözlendiği belirtilmiştir (Boonyarikpunchai ve ark., 2014). Hasanein ve Mohammad Zaheri'nin (2014) nöropatik ağrı modeli oluşturulan hayvanlarda ise ayrıca kuyruk-çekme testi kullanılmış ve rosmarinik asit termal ağrı eşiğini yükselterek anlamlı etki göstermiştir. Kuyruk-çekme testinin de kuyruk-batırma testi gibi spinal seviyedeki ağrı modülasyonunu değerlendirmeye yarayan yöntemlerden biri olduğu göz önünde bulundurulursa rosmarinik asitin supraspinal ve spinal düzeyde etkili olan bir analjezik olduğu görülmekte ve tez çalışmalarından elde edilen sonuçlar bu veriler ile örtüşmektedir. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalardan farklı olarak analjezik etkinliği zamana bağlı olarak ölçülmüştür. Böylelikle en etkin olduğu zaman aralığı ve etki süresi belirlenmeye çalışılmıştır. Etkisinin yaklaşık 1 saat devam ettiği gözlenmiştir. 45. dakika ise en etkin olduğu zaman olarak belirlenmiştir. Tez çalışmalarında kullanılan bir diğer yöntem olan asetik asit kıvrınma testinde etki analizi en etkin olduğu 45. dakikada yapılmıştır.

Rosmarinik asitin supraspinal ve spinal seviyede orta düzeyde santral analjezi gösterdiği belirlenirken periferik analjezik etkisinin daha güçlü olduğu gözlenmiştir. Daha önce rosmarinik asitin periferik analjezik etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda bu tez çalışmasında da kullanılan asetik asit ile indüklenen kıvrınma testi kullanılmıştır. Lucarini ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada 10, 20 ve 40 mg/kg rosmarinik asitin anlamlı bir etki göstermediği bildirilirken, Boonyarikpunchai ve arkadaşları (2014) 50 ve 100 mg/kg dozlardaki rosmarinik asitin tez çalışmalarıyla uyumlu olarak asetik asitin indüklediği kıvrınma sayılarını anlamlı derecede azalttığını bildirmiştir. Deneysel çalışmalarda ortam koşulları, kullanılan yöntem, hayvan ırkı, uygulama yolu, kullanılan doz farklılıkları olabildiğinden dolayı aynı etken madde için farklı sonuçların alınması durumu ile karşılaşılabilmektedir. Dolayısıyla etki potansiyeli olan maddelerin etkinlikleri açısından daha kesin yargıya ulaşabilmek için

etkilerinin aynı deneysel koşullarda farklı yöntemler ile de araştırılıp etki mekanizmalarının ortaya koyulması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Bu amaçla daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında rosmarinik asitin analjezik etkisine aracılık eden mekanizmalarda yalnızca opioidderjik sistemin katkısının araştırıldığı görülmektedir (Boonyarikpunchai ve ark.1, 2014). Söz konusu çalışmada sıcak-plakada gözlenen analjezik etkinin spesifik opioid reseptör antagonisti olan nalokson tarafından inhibe edilebildiği için rosmarinik asitin morfin benzeri etki gösterdiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada asetik asit kıvrınma testinde etkili bulunması ile de rosmarinik asitin etkisinin inflamatuvar mediyatörlerin açığa çıkmasının azaltılmasıyla veya reseptörlerin direk blokajıyla ilgili olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca glutamat ile indüklenen ağrı modeli ile analjezik etkinin araştırıldığı çalışmada (Guginski ve ark., 2009) rosmarinik asitin etkili bulunması, rosmarinik asitin glutamerjik sistemle etkileştiğini akla getirmektedir. Opioderjik ve glutamerjik sistemin ağrı modülasyonunda rol oynadığı bilinen sistemlerden olmasına rağmen ağrı birçok modülatör mekanizmanın yer aldığı oldukça karmaşık bir süreçtir. Bu bakımından tez çalışmalarında etkisi saptanan rosmarinik asitin analjezik etkisine, ağrı modülasyonunda etkin rol oynadığı bilinen inisi inhibitör serotonerjik ve adrenerjik sistemin katkısı araştırılmıştır.

Rosmarinik asit ile indüklenen analjezide, spinal düzeyde serotonerjik ve adrenerjik sistemin katkısı olduğu belirlenirken periferik düzeyde ise sadece adrenerjik sistemin katkısının olduğu gözlenmiştir. Supraspinal seviyede ise her iki sistemin rosmarinik asit analjezisine katkı sağlamadığı belirlenmiştir.

Inhibitör serotonerjik inisi yollarının varlığı ilk olarak, serotonerjik antagonistlerin RVM'den başlayarak stimülasyon ile üretilen antinosisepsiyonu bloke ettiğini gösteren çalışmalarca ortaya konmuştur. Bu çalışmalar, inisi ağrı inhibisyonunun RVM'den projekte olan serotonerjik nöronlar aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir. 5-HT reseptörlerinin alt tiplerinin çeşitliliği ve omurilik DB'un kompleks anatomik yapısı ağrı modülasyonunda serotoninin rolünün yorumlanmasını zorlaştırmaktadır (Ossipov ve ark., 2010). Tez çalışmasında serotonerjik sistemin rolünü aydınlatmak adına 5-HT_{2A/2C} antagonisti ketanserin kullanılmıştır. Spinal inhibitör internöronlardaki 5-HT_{2A} reseptörleri antinosiseptif özellik göstermektedir. Benzer şekilde spinal internöronlardaki 5-HT_{2C} bölgeleri de serotoninin potansiyel antinosiseptif etkisine aracılık etmektedir (Silveira ve ark., 2010). Tez çalışmasında ketanserin ön-uygulamasının sadece kuyruk-batırma testinde rosmarinik asit etkisini geri çevirdiği görülmüştür. Dolayısıyla rosmarinik asitin etkisinin spinal inhibitör internöronlardaki reseptörleri etkileyerek spinal seviyede bir analjezi sağladığı, supraspinal seviyede göstermiş olduğu analjezik etkinliğe ise başka mekanizmaların katkısının olduğu düşünülmüştür.

Antinosisepsiyon sağlamak için PAG veya RVM'nin elektriksel uyarılması ile serebrospinal sıvıda noradrenalin seviyelerinin artması ve bu artışın spinal adrenerjik antagonistlerle bloke edilmesi inisi inhibisyonla ilişkili antinosisepsiyona noradrenalinin de güçlü bir katkısı olduğunu göstermektedir (Pertovaara ve Almeida, 2006; Ossipov ve ark., 2010). Çalışmalar spinal α_2 -adrenerjik reseptörlerin noradrenalinin antinosiseptif etkisine aracılık ettiğini

göstermektedir (Pertovaara, 2006). Dolayısıyla tez çalışmasında bu sistemin rosmarinik asitin analjezik etkisine katkısını değerlendirmek için α_2 -adrenerjik reseptör antagonisti yohimbin kullanılmıştır. Yohimbin ketanserin ön-uygulamasına benzer şekilde supraspinal etkide bir geri dönüş sağlamaz iken spinal düzeyde rosmarinik asit ile indüklenen analjeziyi geri çevirmiştir. Dolayısıyla rosmarinik asitin analjezik etkinliğine inisiyatif inhibitör yolakta yer alan α_2 -adrenerjik reseptör stimülasyonunun katkısı olduğu düşünülmüştür.

Asetik asit ile kıvrınma testinde ise rosmarinik asitin analjezik etkisinde ketanserin ile geri dönüş gözlenmez iken yohimbin ile anlamlı bir geri dönüş olmuştur. Dolayısıyla α_2 -adrenerjik reseptör aktivasyonunun rosmarinik asitin periferik analjezisine de katkı sağladığı düşünülmüştür. Bir takım çalışmalarda noradrenalinin α_2 -adrenerjik reseptörler aracılığıyla periferde ağrıya neden olduğu bildirilse de, bir takım diğer çalışmalarda periferik α_2 -adrenerjik reseptörlerin ağrıyı suprese etmedeki rolü bildirilmektedir (Pertovaara, 2006). Örneğin α_2 -adrenerjik reseptör agonistinin periferik uygulamasının kontrol hayvanlarında ağrı yanıtını hafiflettiği gösterilmiştir (Dogrul and Uzbay, 2004). Ayrıca, başka bir çalışmada, noradrenalinin inflamatuvar hücrelerdeki α_2 -adrenerjik reseptörleri stimüle ederek periferik opioid reseptörleri uyaran β -endorfin salınımına neden olduğu ve noradrenalinin bu şekilde periferde analjezi sağladığı bildirilmiştir (Binder ve ark., 2004).

Sonuç olarak tez çalışması göstermektedir ki; rosmarinik asit hem inisiyatif inhibitör yolakta yer alan serotonerjik ve noradrenerjik sistemi modüle ederek hem de periferik noradrenerjik sistemi stimüle ederek santral ve periferik analjezik etki sağlamaktadır. Dolayısıyla, ağrının eşlik ettiği rahatsızlıklarda tek başına veya yardımcı ilaç olarak güvenle kullanılabilir doğal bir ajandır. Fakat hangi ağrı tiplerinde etkin olabileceğini gösteren ve etki mekanizmasını daha detaylı aydınlatılacak olan çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, daha önce yapılmış çalışmalarda antioksidan, antiviral, antibakteriyel, antimitojen ve anti-inflamatuvar etki gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip rosmarinik asitin deneysel ağrı modelleri ile farelerdeki analjezik etkinliği, santral seviyedeki analjeziyi test etmeye yarayan sıcak-plaka ve kuyruk-batırma yöntemleri ve periferik analjeziyi test etmeye yarayan asetik asit ile indüklenen kıvrınma test yöntemleri ile araştırılmıştır. Çalışma sonuçları rosmarinik asitin hem santral hem de periferik analjezik etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir. Akut uygulanan (tek doz) rosmarinik asitin santral analjezik etkinliği zamana bağlı ölçülmüş ve etkisinin ilk yarım saat içerisinde başlayıp 1 saat kadar sürdüğü belirlenmiştir. Rosmarinik asitin analjezik etkisinin belirlenmesinden sonraki aşama, bu etkinin altında yatan olası mekanizmaların aydınlatılması olmuştur.

Ağrı kontrolünde birçok modülatör sistemin yer almasına rağmen tez çalışmasında inisiyatif inhibitör yolakta ağırlıklı rolü olan serotonerjik ve noradrenerjik modülasyona odaklanmıştır. Bu modülatörlerin periferde de ağrı modülasyonuna katıldığı bilinmektedir. Bu iki modülatör sistemin kuyruk-batırma testinden elde edilen sonuçlardan hareketle spinal seviyede rosmarinik asit analjezisine aracılık ettiği, periferde ise yalnızca noradrenerjik modülasyonun rosmarinik asit analjezisine aracılık ettiği belirlenmiştir. Rosmarinik asitin supraspinal analjezisinin kullanılan antagonistlerle geri dönmemesinden hareketle bu seviyede farklı modülatör sistemlerin işin içinde olduğu düşünülmektedir. Fakat bu düşüncelerin doğruluğunun gösterilebilmesi için daha detaylı ve farklı araştırmaların yapılması gerekmektedir. Ayrıca periferik analjezinin sadece veya ağırlıklı olarak noradrenerjik modülasyonla yönetilip yönetilmediğinin belirlenebilmesi içinde yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Nitekim rosmarinik asit ile ağrının hem santral hem de periferik düzeyde kontrolünün yalnızca serotonerjik ve noradrenerjik modülasyonla gerçekleşmiyor olması şaşırtıcı olmayacaktır. Çünkü ağrı kontrolü her iki seviyede birçok modülatör sistemin eşgüdümlü ve ahenk içinde çalışmasıyla gerçekleşmektedir.

Tez çalışması sonuçları ve rosmarinik asitin çok düşük toksisiteye sahip doğal bir antioksidan olduğu göz önünde bulundurulduğunda, ağrı tedavisinde tek başına veya yardımcı ilaç olarak güvenle faydalanılabilecek bir ajan olduğunu söylemek pek de yanlış olmayacaktır.

KAYNAKLAR

- Al-Dhabi, N.A., Arasu, M.V., Park, C.H., Park, S.U., Recent studies on rosmarinic acid and its biological and pharmacological activities, EXCLI J., 13, 1192–1195 (2014).
- Aydin, O.N., Current inspect to pain and pain mechanism, ADU Tıp Fak. Derg., 3, 37-48 (2002).
- Ballou, L.R., Botting, R. M., Goorha, S., Zhang, J., Vane, J. R., Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice, Proc. Natl. Acad. Sci., 97 (18), 10272–10276 (2000).
- Benyamin, R., Trescot, A.M., Datta, S., Buenaventura, R., Adlaka, R., Sehgal, N., Glaser, S.E., Vallejo, R., Opioid complications and side effects, Pain Physician., 11 (2), 105-120 (2008).
- Binder, W., Mousa, S.A., Sitte, N., Kaiser, M., Stein, C., Schäfer M Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue, Eur. J. Neurosci., 20 (1), 92-100 (2004).
- Boonyarikpunchai, W., Sukrong, S., Towiwat, P., Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl., Pharmacol. Biochem. Behav., 124 (1), 67-73 (2014).
- Brandão, M.S., Pereira, S.S., Lima, D.F., Oliveira, J.P.C., Ferreira, E.L.F., Chaves, M.H., Almeida, F.R.C., Antinociceptive effect of *Lecythis pisonis* Camb. (Lecythidaceae) in models of acute pain in mice, J. Ethnopharmacol., 146 (1), 180–186 (2013).
- Chang, H.Y., Sheu, M.J., Yang, C.H., Lu, T.C., Chang, Y.S., Peng, W.H., Huang, S.S., Huang, G.J., Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammation of hispolon in mice, Evid. Based Complement Alternat. Med., 2011 (2011), 478246 (2011).
- Coelho, L.P., Reis, P.A., de Castro, F.L., Gayer, C.R., da Silva Lopes, C., da Costa e Silva, M.C., de Carvalho Sabino, K.C., Todeschini, A.R., Coelho, M.G., Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds, J. Ethnopharmacol., 98 (1-2), 109-16 (2005).
- Cole, E.B., Pain Management: Classifying, Understanding and Treating Pain, Hosp. Physician., 38 (6), 23-30 (2002).
- Connelly, A.E., Tucker, A.J., Tulk, H., Catapang, M., Chapman, L., Sheikh, N., Yurchenko, S., Fletcher, R., Kott, L.S., Duncan, A.M., Wright, A.J., High-rosmarinic acid spearmint tea in the management of knee osteoarthritis symptoms, J. Med. Food., 17 (12), 1361-1367 (2014).
- de Freitas, R.L., de Oliveira, R.C., de Carvalho, A.D., Felippotti, T.T., Bassi, G.S., Elias-Filho, D.H., Coimbra, N.C., Role of muscarinic and nicotinic cholinergic receptors in an experimental model of epilepsy-induced analgesia, Pharmacol. Biochem. Behav., 79 (2), 367-376 (2004).

- Dogrul, A., Uzbay I.T., Topical clonidine antinociception, *Pain*, 111 (3), 385–391 (2004).
- dos Santos, M.D., Almeida, M.C., Lopes, N.P., de Souza, G.E., Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid, *Biol. Pharm. Bull.*, 29 (11), 2236-2240 (2006).
- Eddy, N.B., Leimback, D., Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 107 (3), 385-393 (1953).
- Feinberg, S., Leong, M., Kathryn Mueller, M.D., Christian, J., Pasero, C., Fong, A., Feinberg, R., Jamison, R., American Chronic Pain Association (ACPA) Resource Guide to Chronic Pain Medication&Treatment 2013 ed. American Chronic Pain Association, Inc., 8, 2013.
- Flores J.A., El Banoua F., Galán-Rodríguez B., Fernandez-Espejo E., Opiate antinociception is attenuated following lesion of large dopamine neurons of the periaqueductal grey: critical role for D1 (not D2) dopamine receptors, *Pain*, 110 (1-2), 205–214 (2004).
- Gorzalczany, S., Marrassini, C., Miño, J., Acevedo, C., Ferraro, G., Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of *Urtica circularis*, *J. Ethnopharmacol.*, 134 (3), 733-738 (2011).
- Gracza, L., Koch, H., Löffler, E., Isolierung von Rosmarinsäure aus *Symphitum officinale* und ihre anti-inflammatorische Wirksamkeit in einem In-vitro-Modell. Über biochemischpharmakologische Untersuchungen pflanzlicher Arzneistoffe, 1. Mitt. *Arch. Pharm.*, 318 (12), 1090–1095 (1985).
- Guginski, G., Luiz, A.P. , Silva, M.D., Massaro, M., Martins, D.F., Chaves, J., Mattos, R.W., Silveira, D., Ferreira, V.M.M., Calixto, J.B., Santos, A.R.S., Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice, *Pharmacol. Biochem. and Behavior*, 93 (1), 10-16 (2009).
- Guyton, A.C., Hall, J.E., *The Textbook of Medical Physiology*, Nobel Medical Publishing, Istanbul, 598-609, 2007.
- Güvenç, A., Okada, Y., Küpeli Akkol, E., Duman, H., Okuyama, T., Çalış, İ., Investigations of anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant and aldosereductase inhibitory activities of phenolic compounds from *Sideritis brevibracteata*, *Food Chem.*, 118 (3), 686-692 (2010).
- Güzeldemir, M.E., Ağrı ve Tedavisi (Ders Notları), GATA Anesteziyoloji ve Reanimasyon ABD, Ankara, 363-376, 1999.
- Harput, Ş., Yeni ilaç geliştirme çalışmalarında Tıbbi bitkiler, Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, 5-6 Haziran, Zeytinburnu, İstanbul, 45-46 (2010).
- Hasanein, P., Mohammad Zaheri, L., Effects of rosmarinic acid on an experimental model of painful diabetic neuropathy in rats, *Pharm. Biol.*, 52 (11), 1398-1402 (2014).
- Hudspith, M.J., Siddall, P.J., Munglani, R., *Foundations of Anesthesia: Basic Sciences for Clinical Practice*, in: Hemmings, H.C., Hopkins, P.M. (Eds.), *Physiology of Pain*, second ed. Mosby, China, 267-285, 2006.

http-1 Ağrı, Ağrı Yolları ve Ağrılı Hastaya Yaklaşım
med.gazi.edu.tr/posts/download?id=20754 (18.09.2015).

İbrahim, T.A., Chemical composition and biological activity of extracts from *Salvia bicolor* Desf. growing in Egypt., *Molecules.*, 17 (10), 11315-11334 (2012).

Koster, R., Anderson, M., Beer, E.J., Acetic acid for analgesic screening, *Fed. Proc.*, 18 (1959), 412 (1959).

Kwon, M., Altin, M., Duenas, H., Alev, L., The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications, *Pain Pract.* 14 (7), 656-667 (2014).

Liao, J.C., Deng, J.S., Lin, Y.C., Lee, C.Y., Lee, M.M., Hou, W.C., Huang, S.S., Huang, G.J., Antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Actinidia callosa* var. *callosa* in-vitro and in-vivo, *Evid Based Complement Alternat. Med.*, 2012 (2012), 129152 (2012).

Long, C., Morgan, B., *Pain Management: The Resource Guide for Home Health and Hospice Nurses*, Hopkins Medical Products, Baltimore, Inc., 2008.

Lucarini, R., Bernardes, W.A., Ferreira, D.S., Tozatti, M.G., Furtado, R., Bastos, J.K., Pauletti, P.M., Januário, A.H., Silva, M.L., Cunha, W.R., In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of *Rosmarinus officinalis* aqueous extracts, rosmarinic acid and its acetyl ester derivative, *Pharm. Biol.*, 51 (9), 1087-1090 (2013).

Macintyre, P.E., Schug, S.A., Scott, D.A., Visser, E.J., Walker, S.M., *Acute Pain Management: Scientific Evidence*, third ed. APM:SE Working Group of the Australian and New Zealand College of Anaesthetists and Faculty of Pain Medicine, ANZCA & FPM, Melbourne, 1-21, 2010.

Mattilla, P., Hellström, J., Törrönen, R., Phenolicacids in berries, fruits, and beverages, *J. Agric Food Chem.*, 54 (19), 7193-7199 (2006).

McCurdy, C.R., Scully, S.S., Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals), *Life Sci.*, 78 (5), 476-484 (2005).

Mehrotra, A., Shanbhag, R., Chamallamudi, M.R., Singh, V.P., Mudgal, J., Ameliorative effect of caffeic acid against inflammatory pain in rodents, *Eur. J. Pharmacol.*, 666 (1-3), 80-86 (2011).

Merskey, H., Bogduk, N., *Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms*, second ed., IASP Press, Seattle, 210-214, 1994.

Offermanns, S., Rosenthal, W., *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 421, 2008.

Ossipov, M.H., Dussor, G.O., Porreca, F., Central modulation of pain, *J. Clin. Invest.*, 120 (11), 3779-3787 (2010).

Pan, Y., Abd-Rashid, B.A., Ismail, Z., Ismail, R., Mak, J. W., Pook, P.C.K, Er, H.M., Ong, C. E., In vitro effects of active constituents and extracts of *Orthosiphon stamineus* on the activities of three major human cDNA-expressed cytochrome P450 enzymes, *Chemico-Biological Interactions*, 190 (1), 1-8 (2011).

- Perron, V. ve Schonwetter, S.R., Assessment and Management of Pain in Palliative Care Patients, Department of Internal Medicine at the University of South Florida College of Medicine and LifePath Hospice, Tampa, Florida, *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, 8 (1), 15-24 (2001).
- Pertovaara, A., Noradrenergic pain modulation, *Prog. Neurobiol.*, 80 (2), 53-83 (2006).
- Pertovaara, A., Almeida, A., Descending Inhibitory System In: Endogenous Pain Modulation, *Handbook of Clinical Neurology*, F. Cervero, T.S. Jensen (Eds), 81 (3), 179-192 (2006).
- Petersen, M., Simmonds, M.S., Rosmarinic acid, *Phytochem.*, 62 (2), 121–125 (2003).
- Pragasam, S.J., Rasool, M., Dietary component p-coumaric acid suppresses mono sodium urate crystal-induced inflammation in rats, *Inflamm. Res.*, 62 (5), 489-498 (2013).
- Rabelo, A.S., Oliveira, I.D., Guimarães, A.G., Quintans, J.S., Prata, A.P., Gelain, D.P., Venceslau, E.M., Santos, J.P., Quintans, L.J., Bonjardim, L.R., Barison, A., Campos, F.R., Santos, A.D., Nogueira, P.C., Costa, E.V., Moraes, V.R., Araújo, A.A., Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract from *Remirea maritima* (Cyperaceae)., *J. Ethnopharmacol.*, 145 (1), 11-17 (2013).
- Reichling, D.B., Levine, J.D., Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain, *Trends Neurosci.*, 32 (11), 611-618 (2009).
- Saatçioğlu, A.T., Abdominal cerrahilerde epidural uygulanan bupivakain ile levobupivakainin etkilerinin karşılaştırılması, *Uzmanlık tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği, İstanbul, Türkiye* (2008).
- Schaible, H.G., Peripheral and central mechanisms of pain generation, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 177, 3-28 (2007).
- Schmauss, C., Yaksh, T.L., In vivo studies on spinal receptor systems mediating antinociception II. Pharmacological profiles suggesting a differential association of mu, delta and kappa receptors with visceral chemical and cutaneous thermal stimuli in the rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 228 (1), 1-12 (1984).
- Sen, S., Chakraborty, R., Rekha, B., Revathi, D., Ayyanna, S.C., Hemalatha, G., Kumar Reddy, G.A., Hyndavi, S., IkhyathaBabu, P.J., Prakash, P.R., Sridhar, C., Anti-inflammatory, analgesic, and antioxidant activities of *Pisonia aculeata*: Folk medicinal use to scientific approach, *Pharm. Biol.*, 51 (4), 426-432 (2013).
- Shin, K., Kim, I., Park, Y., Ha, J., Choi, J., Park, H., Lee, Y.S., Lee, K., Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E2, nitric oxide and tumor necrosis factor- α production, *Biochem. Pharmacol.*, 68 (12), 2327–2336 (2004).
- Silveira, J.W., Dias, Q.M., Del Bel, E.A., Prado, W.A., Serotonin receptors are involved in the spinal mediation of descending facilitation of surgical incision-induced increase of Fos-like immunoreactivity in rats, *Mol. Pain*, 6, 17 (2010).

Skirven, T.M., Osterman, A.L., Fedorczyk, J., Amadio, P.C., Physiologic basis of pain: central mechanisms ascending pathways of pain transmission, in: Elliott, M., Barbe, M. (Eds.), *Rehabilitation of the Hand and Upper Extremity*, Mosby, Philadelphia, 1451-1460, 2011.

Staiger, C., Comfrey: A Clinical Overview, *Phytother. Res.*, 26 (10), 1441–1448 (2012).

Steeds, C.E., The anatomy and physiology of pain, *Surgery*, 27 (12), 507-511 (2009).

Stucky, C.L., Gold, M.S., Zhang, X., Mechanism of Pain, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 11845-11846 (2001).

Süzer, Ö., *Premium Farmakoloji, Klinisyen Tıp Kitapevleri*, Ankara, 241-242, 255, 533-534, 2005.

Todd, A.J., Millar, J., Receptive fields and responses to ionophoretically applied noradrenaline and 5-hydroxytryptamine of units recorded in laminae I-III of cat dorsal horn, *Brain Res.*, 288 (1-2), 159-167 (1983).

Zareba, G., *Phytotherapy for pain relief*, *Drugs Today (Barc.)*, 45 (6), 445-467 (2009).

Zemlan, F.P., Murphy, A.Z., Behbehani, M.M., 5-HT_{1A} receptors mediate the effect of the bulbospinal serotonin system on spinal dorsal horn nociceptive neurons, *Pharmacology*, 48 (1), 1-10 (1994).