

**PROTOKATEŞİK ASİTİN ANALJEZİK ETKİSİNE KANNABİNOİDERJİK
SİSTEMİN KATILIMI**

Yüksek Lisans Tezi

Duygu Yeşim DİKMEN

Eskişehir 2019

**PROTOKATEŞİK ASİTİN ANALJEZİK ETKİSİNE KANNABİNOİDERJİK
SİSTEMİN KATILIMI**

Duygu Yeşim DİKMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışmanı: Doç. Dr. Nurcan BEKTAŞ TÜRKMEN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ocak 2019

*Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1802S035 no.lu proje kapsamında
desteklenmiştir*

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Duygu Yesim Dikmen'nin "Protokatesik Asitin Analjezik Etkisine Konabiriterjik Sistemin Katılımı" başlıklı

tezi 16/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca,

Formatokajı Anabilim/Anasanat dalında Yüksek Lisans/Doktora/Sanatta Yeterlik tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	<u>Doç. Dr. Nuran Bektaş TURKMAN</u>	
Üye	<u>Doç. Dr. H. Sinem BAYKINACI</u>	
Üye	<u>Doç. Dr. Rana ARSLAN</u>	
Üye		
Üye		

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN
Müdür



ÖZET

PROTOKATEŞİK ASİTİN ANALJEZİK ETKİSİNE KANNABİNOİDERJİK SİSTEMİN KATILIMI

Duygu Yeşim DİKMEN

Farmakoloji A.B.D

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2019

Danışman: Doç. Dr. Nurcan BEKTAŞ TÜRKMEN

Protokateşik asit nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesi üzerine etkili olması nedeni ile öne çıkan fenolik bir antioksidandır. Analjezik etkisine aracılık eden çeşitli mekanizmalar gösterilse de, bu mekanizmalar etkinliğini tam olarak açıklayamamaktadır. Bu tez çalışmasında, protokateşik asitin analjezik etkinliğine ağrı yollarının santral ve periferel seviyelerindeki CB1 ve CB2 reseptörlerinin aktivasyonu ile birlikte nosiseptif süreci baskılayan kannabinoiderjik sistemin olası katılımının araştırılması amaçlandı. Bu amaçla farelerde 75, 150 ve 300 mg/kg (*i.p.*) protokateşik asitin analjezik etkinliği asetik asitle-indüklenen kıvrınma testi ve kuyruk-daldırma testi ile belirlenerek 300 mg/kg (*i.p.*) dipiron ve non-spesifik CB reseptör agonisti 5 mg/kg (*i.p.*) WIN 55,212-2'in analjezik etkisi ile karşılaştırıldı. Protokateşik asit analjezisine kannabinoiderjik sistem katkısının araştırılması için; 300 mg/kg protokateşik asit öncesi ayrı ayrı CB1 antagonisti 8 mg/kg AM-251 (*i.p.*) ve CB2 antagonisti 8 mg/kg AM-630 (*i.p.*) ön- uygulamaları yapıldı. Ayrıca, protokateşik asitin lokomotor aktivite üzerine etkisi aktivite kafesi kullanılarak değerlendirildi. Protokateşik asitin lokomotor aktivite değişikliğinden bağımsız ve doza-bağılı olarak analjezik etki gösterdiği ve etkisinin dipiron ve WIN 55,212-2'in analjezik etkisi ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu belirlendi. Kuyruk-daldırma ve kıvrınma testinde CB1 reseptör antagonisti AM-251 ön-uygulamasının protokateşik asit ile indüklenen analjeziyi anlamlı bir şekilde antagonize ettiği belirlenirken, CB2 reseptör antagonisti AM-630 ön-uygulamasının yalnızca kuyruk-daldırma testinde etkili olduğu belirlendi. Bu sonuçlardan hareketle, protokateşik asitin analjezik etkisine, kannabinoiderjik modülasyonun periferden ziyade spinal seviyede katkı sağladığı ve özellikle periferde CB2 reseptör aktivasyonundan ziyade CB1 reseptör aktivasyonunun aracılık ettiği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Protokateşik asit, Ağrı, CB1 reseptör, CB2 reseptör, Kannabinoiderjik sistem.

ABSTRACT

THE INVOLVEMENT OF CANNABINOIDERGIC SYSTEM ON THE ANALGESIC EFFECT OF PROTOCATECHUIC ACID

Duygu Yeşim DİKMEN

Department of Pharmacology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences Institute, January 2019

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nurcan BEKTAŞ TÜRKMEN

Protocatechuic acid is a phenolic antioxidant which is prominent due to its effect on the progression of neurodegenerative diseases. Although there are various mechanisms that mediate its analgesic effect, these mechanisms do not fully explain its effectiveness. In this thesis, it is aimed to investigate the possible contribution of cannabinoidergic system that suppresses the nociceptive process by the activation of CB1 and CB2 receptors in central and peripheral levels of pain pathways to the analgesic activity of protocatechuic acid. For this purpose, the analgesic activity of protocatechuic acid is determined at the doses of 75, 150 and 300 mg/kg (*i.p.*) by acetic acid-induced writhing test and tail-immersion test in mice; it was compared to the analgesic effect of 300 mg/kg (*i.p.*) dipyrone and 5 mg/kg (*i.p.*) non-specific CB receptor agonist WIN 55,212-2. For the investigation of cannabinoidergic system's contribution to protocatechuic acid analgesia; pre-administration of 8 mg/kg (*i.p.*) AM-251 and 8 mg/kg (*i.p.*) CB2 antagonist AM-630 were performed separately before 300 mg/kg protocatechuic acid. In addition, the effect of protocatechuic acid on locomotor activity was evaluated using the activity cage. It was determined that protocatechuic acid has dose-dependent analgesic effect independently from locomotor activity change and is comparable with analgesic effects of dipyrone and WIN 55,212-2. It was determined that pre-administration of CB1 receptor antagonist AM-251 significantly antagonized the protocatechuic acid-induced analgesia in the tail-immersion and writhing test, whereas pre-administration of CB2 receptor antagonist AM-630 was found to be effective only in the tail-immersion test. Based on these results, it is thought that cannabinoidergic modulation contributes to the analgesic activity of protocatechuic acid on the spinal level rather than the periphery and is significantly mediated by CB1 receptor activation rather than CB2 receptor activation in the periphery.

Keywords: Protocatechuic acid, Pain, CB1 receptor, CB2 receptor, Cannabinoidergic system.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim süresince büyük emeği olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Nurcan BEKTAŞ TÜRKMEN'e ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Rana ARSLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez ve deney çalışmalarım boyunca beni her zaman destekleyen ve yanımda olan sevgili eşim, güzel kızım ve canım aileme çok teşekkür ederim.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. Ağrı	3
2.1.1. Ağrının sınıflandırılması	4
2.1.2. Ağrının algılanması	4
2.2. Kannabinoiderjik Sistemin Ağrıdaki Rolü	6
2.3. Ağrının Doğal Tedavisi	9
2.4. Fenolik Bileşenler	9
2.4.1. Fenolik asit	10
2.4.1.1. <i>Protokateşik asit</i>	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM	13
3.1. Kullanılan Sarf Malzemeleri	13
3.2. Kullanılan Cihazlar	13
3.3. Deney Hayvanları	13
3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması	13

3.5. Deneysel Yöntemler	14
3.5.1. Kuyruk-daldırma testi	14
3.5.2. Asetik asitle-indüklenen kıvrınma testi	14
3.5.3. Aktivite kafesi	15
3.6. Veri Analizi	15
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	16
4.1. Kuyruk-Daldırma Testi	16
4.2. Asetik Asitle-İndüklenen Kıvrınma Testi	19
4.3. Aktivite Kafesi	22
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	29
KAYNAKÇA	30

ÖZGEÇMİŞ

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Protokateşik asitin kimyasal formülü.....	10
Şekil 2. 75, 150 ve 300 mg/kg, <i>i.p.</i> , protokateşik asitin kuyruk-daldırma testinde gözlenen analjezik etkisi.....	16
Şekil 3. 300 mg/kg, <i>i.p.</i> , protokateşik asitin kuyruk-daldırma testinde gözlenen analjezik etkisine CB1 reseptör stimülasyonunun katılımı.....	17
Şekil 4. 300 mg/kg, <i>i.p.</i> , protokateşik asitin kuyruk-daldırma testinde gözlenen analjezik etkisine CB2 reseptör stimülasyonunun katılımı.....	18
Şekil 5. 75, 150 ve 300 mg/kg, <i>i.p.</i> , protokateşik asitin asetik asitle-indüklenen kıvranma testinde gözlenen analjezik etkisi.....	19
Şekil 6. 300 mg/kg, <i>i.p.</i> , protokateşik asitin asetik asitle-indüklenen kıvranma testinde gözlenen analjezik etkisine CB1 reseptör stimülasyonunun katılımı...	20
Şekil 7. 300 mg/kg, <i>i.p.</i> , protokateşik asitin asetik asitle-indüklenen kıvranma testinde gözlenen analjezik etkisine CB2 reseptör stimülasyonunun katılımı....	21
Şekil 8. 300 mg/kg, <i>i.p.</i> , protokateşik asitin lokomotor aktivite üzerine etkisi....	22

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\Delta 9$ -THC	: Delta-9 tetrahidrokannabinol
ANOVA	: Analysis of variance (varyans analizi)
CB1	: Kannabinoid 1
CB2	: Kannabinoid 2
COX-2	: Ciclo-oxigenase-2 (siklo oksijenaz 2)
FAAH	: Fatty acid amide hydrolase (Yağ asit amid hidrolaz)
GABA	: Gama amino bütirik asit
HT	: Hidroksitriptofan
IASP	: International association for the study of pain
IL-1 β	: İnterlökin 1 beta
İ.P.	: İntraperitoneal
iNOS	: Inducible nitric oxide synthase
MAGL	: Monoaçilgliserol lipaz
MMP	: Matrix metalloproteinase
MPE	: Maximum possible effect (maksimum olası etki)
NO	: Nitrik oksit
NSAİİ	: Nonsteoridal antiinflammatuar ilaçlar
P	: Probability (Olasılık)
PAG	: Periaquaduktal gri madde
PCA	: Protokateşik asit
S.H	: Standart hata
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör-alfa

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ağrı; var olan veya olası doku hasarı ile ilişkili duyuşsal ve emosyonel hoş olmayan bir deneyim olarak tanımlanmaktadır (Merskey ve Bogduk, 1994). Ağrı hissinin giderilmesinde, ağrının çeşidine ve derecesine göre nonsteoridal antiinflammatuar ilaçlar (NSAİİ), opioidler, trisiklik antidepresanlar ve antikonvülsanlar gibi çeşitli ilaç grupları kullanılmaktadır. Fakat mevcut ilaçlar ile karşılaşılan ilaç etkileşimleri, yan etkiler ve tolerabilite problemleri gibi nedenler ile yeni ajanların keşfedilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısıyla, son zamanlarda günümüz tıbbında daha az yan etkiye ve daha güçlü terapötik sonuçlara sahip olan bitkisel kaynaklı ilaçlarla tedaviye ilgi oldukça artmıştır (Mehrotra ve diğ., 2011; Süzer, 2005; Zareba, 2009) Antioksidan özellik gösteren protokateşik asit, son yıllarda gösterdiği biyolojik etkilerden dolayı dikkat çeken ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan bir fenoliktir (Cazacu ve diğ., 2015; Semaming ve diğ., 2015). Protokateşik asit'in analjezik etkisi sınırlı sayıda çalışma ile gösterilmesine rağmen analjezik etki mekanizmaları hala belirsizliğini korumaktadır. Rasyonel ilaç kullanımı için ise ilaçların etki mekanizmalarının araştırılarak detaylandırılması son derece önem arz etmektedir.

Ağrı modülasyonu periferden santrale bir çok endojen inhibitör veya eksitator mediyatörün ve değişik reseptör gruplarının uyumlu çalışmasıyla yönetilen son derece kompleks bir süreçtir (Jinsmaa ve diğ., 2005; Mizoguchi ve diğ.,2014; Schaible, 2007). Bu endojen sistemlerden bir tanesi de endokannabinoidjik sistemdir. Deneysel ağrı çalışmalarında hem endokannabinoidlerin hem de kannabinoiderjik reseptör agonistlerinin kimyasal, mekanik ve termal uyaranlar ile oluşturulmuş akut ağrıda analjezik/antinosiseptif etki oldukları bildirilmiştir (Guindon ve diğ., 2006; Ulugöl ve diğ., 2006). Akut ağrının yanısıra, inflammatuar ve nöropatik ağrı gibi kronik ağrı modellerinde de etkili oldukları rapor edilmektedir (Fine ve Rosenfeld, 2013; Manzanares ve diğ., 2006). Kannabinoidler, ağrı yollarının santral ve periferel seviyelerinde bulunan CB1 ve CB2 reseptörlerinin aktivasyonu ile birlikte nosiseptif süreci baskımlarken (Guindon ve Hohmann, 2009) bir yandan da endojen opioidler, glutamat, serotonin gibi ağrı modülasyonunda rolü olan diğel sistemlerle etkileşim içindedir (Fine ve Rosenfeld, 2013). Kannabinoiderjik sistemin aktivasyonunu sağlayan

maddelerin etkin bir ağrı kontrolü yapması nedeniyle bu sistemi aktive eden yeni ajanlarını keşfetme çalışmaları ise hızla sürmektedir.

Bu bilgilerden hareketle bu tez çalışmasında, protokateşik asitin analjezik etkinliğine kannabinoiderjik sistemin olası katılımının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla 75, 150 ve 300 mg/kg (*i.p.*) dozlarda uygulanan protokateşik asitin analjezik etkinliği farelerde asetik asitle-indüklenen kıvrınma testi ve kuyruk-daldırma testi ile belirlenmiş, gözlenen etki 300 mg/kg dipiron (*i.p.*) ve non-spesifik CB agonisti 5 mg/kg, WIN 55,212-2 (*i.p.*) ile gözlenen analjezik etki ile karşılaştırılmıştır. Protokateşik asitin analjezik etkisine kannabinoiderjik sistem katkısının araştırılması için etkili bulunduğu 300 mg/kg protokateşik asit öncesi ayrı ayrı CB1 antagonisti 8 mg/kg AM-251 (*i.p.*) ve CB2 antagonisti 8 mg/kg AM-630 (*i.p.*) ön-uygulamaları yapılmıştır. Ayrıca, protokateşik asitin analjezik etki gösterdiği dozda lokomotor aktivite üzerine etkisi aktivite kafesi deneyleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Ağrı

“Uluslararası Ağrı Çalışmaları Birliği” (IASP-International Association for the Study of Pain) tarafından yapılan tanımına göre ağrı; gerçek veya potansiyel doku hasarı ile ilişkili veya böyle bir hasara ilişkin olarak tarif edilen tatsız bir duyuşsal ve duygusal deneyimdir (Alçın ve diğ., 2010; Merskey ve Bogduk, 1994). Ağrı, hoşla gitmeyen bir duyum olduğundan her zaman sübjektiftir ve kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Cinsiyet, sosyokültürel çevre ve ırk gibi etkenler kişinin ağrı eşiğini başka bir deyişle tanımlayabildiği en hafif ağrı seviyesini ve ağrı algısını etkilemektedir. Dolayısıyla, ağrı algısının değerlendirilmesinde hem fiziksel hem de fiziksel olmayan bileşenleri birlikte göz önünde tutmak gerekmektedir (Babacan, 2011; Çöçelli ve diğ., 2008). Ağrı tanımının doğru yapılması; ağrının doğru anlaşılabilmesi ve altta yatan nedenlerle birlikte doğru tanının yapılarak doğru ve etkili tedavinin uygulanabilmesi açısından son derece önemlidir (Uyar ve Köken, 2017).

Ağrı, insanoğlunun var olduğu günden bugüne sağlık alanındaki ilerlemelere rağmen her zaman şikayetçi olduğu ve dolayısıyla sürekli çözüm aradığı bir bulgu olmuştur (Aslan ve Badır, 2005). Tüm arayışlara ve piyasada mevcut olan ilaç ve yöntemlere rağmen, ağrının giderilmesine yönelik alınan önlemlerin yetersiz olduğu ve ağrıdan yakınan kişilerin çoğunun ağrısının giderilemediği, dolayısıyla yaşam kalitelerinin düştüğü, günlük yaşam aktiviteleri ile sosyal etkileşimlerinin bozulduğu, hastanede kalış süresinin uzadığı ve mortalite oranının arttığı belirtilmektedir (Dikmen ve diğ., 2012; Özütemiz, 2015). Nitekim “Amerikan Ağrı Birliği” ağrı kontrolünün ve hafifletilmesinin önemine dikkat çekmek adına, “Ağrı: beşinci vital bulgu” ibaresini yayınlamış ve böylelikle ağrının kan basıncı ve nabız gibi hayati bir bulgu olduğunu vurgulayarak ağrının da düzenli olarak değerlendirilmesi gerektiğini önermiştir (Yıldızeli Topçu, 2008). Zaman içerisinde ağrı fizyolojisi ile ilgili ilerlemelerin gerçekleşmesi ve ağrının halen rahatsız edici ve hayati bir semptom olması nedeniyle, ağrı tedavisi önemini koruyan bir araştırma konusu olmaya devam etmektedir. Dolayısıyla araştırmacılar klasik ağrı yollarından uzaklaşarak nispeten yeni tanımlanmış yeni ağrı yolları üzerinden etkili olan yeni ilaç geliştirme çalışmalarına odaklanmış durumdadır.

2.1.1. Ağrının sınıflandırılması

Farklı kaynaklarca veya otoritelerce farklı şekillerde sınıflandırılan ağrıyı IASP taksonomi alt komitesi beş eksenli taksonomi şeklinde, eksen bazında tanımlayarak sınıflandırmayı bu eksenlerden hareketle yapmaktadır. 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 etiyojisini belirtmektedir (Yıldızeli Topçu, 2008).

Sıklıkla kullanılan ve IASP'nin önerdiğine benzer şekilde olan sınıflandırmaya göre ağrı; nörofizyolojik mekanizmaya bağlı (Nosiseptif, Somatik, Visseral, Nöropatik, Psikojenik), süreye bağlı (Akut, Kronik), etiyojik (Kanser ağrısı, Postherpetik nevralkji, Orak hücre anemisine bağlı ağrı, Artrit ağrısı), bölgesel ağrı (Baş ağrısı, Yüz ağrısı, Bel ağrısı, Pelvik ağrı) şeklinde 4 ana başlık altında toplanmaktadır (Raj, 2000).

2.1.2. Ağrının algılanması

Ağrının algılanması, ağrılı uyaran veya hasar görmüş dokudan salınan mediyatörler tarafından uyarılan nosiseptörlerin aktivasyonu, spinal korda afferent transmisyonu ve sonrasında dorsal boynuz üzerinden ağrı ile ilişkili beyin bölgelerine iletilmesi ile gerçekleşmektedir. Dolayısıyla ağrının algılanmasındaki 4 önemli aşamanın transdüksiyon, transmisyon, modülasyon ve persepsiyon aşamaları olduğu söylenebilir. Transdüksiyon; nosiseptörler aracılığıyla ağrılı uyarının elektriksel iletiye dönüştürüldüğü aşamadır. Transmisyon; transdüksiyon aracılığıyla oluşan nosiseptif impulsun sinir sistemi boyunca iletilmesidir. Transmisyon esnasında, öncelikle primer sensöriyel afferent nöronlar elektriksel iletiyi spinal korda taşır. Bunu takiben, nosiseptif impulslar spinal korddan assendan/çıkıcı ileti sistemi vasıtasıyla beyin sapı ve talamusa ulaştırılır. Son olarak, talamustan talamokortikal bağlantılarla somatosensöriyel kortekse projekte olur. Modülasyon; nosiseptif transmisyonun nöral etkenlerle modifiye olmasıdır. Persepsiyon ise bireyin psikolojisi ile etkileşimi ve subjektif emosyonel deneyimleri sonucu gelişen, uyarının algılandığı son aşamadır (Uyar ve Köken, 2017).

Doku hasarı ile ağrının algılanması arasında oluşan karmaşık elektrokimyasal olaylar serisinin bütününe nosisepsiyon adı verilmektedir (Özütemiz, 2015).

Nosisepsiyon ağırlı uyaranlara duyarlı olan nosiseptör denen reseptörlerin aktivasyonu ile başlamaktadır. Daha önce bahsedildiği gibi nosiseptörler mekanik, termal ve kimyasal enerjiyi elektriksel sinyaller haline dönüştürmek, sonra bu uyarının primer afferent lifler yoluyla spinal korda yani omuriliğe iletilmesini sağlamaktır (Saatçioğlu, 2008). Nosiseptörler aslında serbest sinir sonlanmalarıdır ve algıladıkları ağrı duyusu başlıca, ince miyelinli A delta ve miyelinsiz C sinir lifleri tarafından spinal korda taşınmaktadır. A delta lifleri başlıca termal ve mekanik uyaranları 2.5-20m/sn iletim hızı ile taşımaktadır. Bu nosiseptörlerin aktivasyonu keskin, iğneleyici ve iyi lokalize edilebilen bir ağrı meydana getirmektedir. C lifleri ise mekanik, kimyasal ve termal uyaranları 2.5 m/sn'nin altında, iletim hızı ile çok yavaş olarak iletmektedir. Daha donuk, daha yaygın bir ağrı ve hiperestezi meydana getirmektedirler (Özütemiz, 2015). Cilt, subkutanöz yapılar, periost, eklemler, kaslar ve visseral dokularda bulunan nosiseptörler zarar gören ya da tehdit altında olan dokulardan salınan serotonin, histamin, bradikinin, arşidonik asit, lökotrienler ve prostoglandinler gibi kimyasal maddeler tarafından uyarılmaktadırlar (Yıldızeli Topçu, 2008). Nosiseptörlerin terminalleri aksonları oluşturmak üzere birleşmektedir. Bu aksonların hücre gövdeleri dorsal kök veya trigeminal ganglionda bulunmaktadır ve lifler spinal kord arka boynuzunda sonlanmaktadır (Kılıç, 2009). Tüm ağrı lifleri dorsal boynuzda sonlanmasına rağmen, takip ettikleri yollar değişebilmektedir (Steeds, 2009). Ağırlı uyarıları üst merkezlere geçirmede, dorsal boynuzda glutamat ve nöropeptidler olarak başlıca iki tip nörotransmitter rol almaktadır. Glutamat, A-delta terminal uçlarından ve motor nöronlara sinaps yapan afferentlerden salgılanan eksitator bir aminoasittir. Nöropeptidler ise özellikle C lifleri eksitasyonu ile oluşup projeksiyon hücrelerinde çok yavaş ve çok uzun süreli depolarizasyona yol açan P maddesi, nörokinin-A, kolesistokinin gibi maddelerdir (Aydın, 2002). Spinal kord arka boynuzu ağrı yolundaki ilk sinapsın yeridir ve bu nedenle yerel segmental ve supraspinal mekanizmalar yoluyla nosiseptif iletimin düzenlenmesi için cazip bir hedeftir (Tüfekçi Alphan ve Yılmaz, 2007). Spinal kord, periferden gelen ağrı sinyallerini spino-talamik, spino-retiküler, spino-mezensefalik, spino-hipotalamik gibi çıkan yollar vasıtasıyla üst merkezlere iletir. Spino-talamik yol ile bilinçli ağrı yanıtı sağlayan talamokortikal sistem projekte edilmektedir. (Schaible, 2007). Talamus somatosensoryel bilgilerin işlendiği anahtar bölgedir ve bunda çeşitli lateral ve medial çekirdekler görev alır. Talamik çekirdeklerdeki nöronlar primer ve sekonder somatosensoryel kortekslere, insula,

anterior singulat korteks ve prefrontal kortekse projekte olurlar (Kılıç, 2009). Kortekse ulaşan bu sinyaller, üst merkezlerde değerlendirildikten sonra beyin sapı yoluyla spinal korda geri döner (Uyar ve Köken, 2017). Beyin sapının spinal kord düzeyinde ağrı ile ilişkili sinyalleri düzenlemede önemli bir rolü olduğu iyi bilinmektedir. İnici inhibitör yollar beyin sapından köken almaktadır. Beyin sapı çekirdeğinden köken alan periakvaduktal gri madde (PAG) , talamus, hipotalamus, korteks ve spinotalamik traktus kollaterallerinden inputlar alır. Bu yüzden bu bölge ağrının inisiyasyon sistemi ile kontrolünde önemli bir merkezdir. Beyin sapının nöral ağları, ağrının kontrolünde katılan endojen opioid- monoamine- ve asetilkolin- aracılı mekanizmalara sahiptir (de Freitas ve diğ., 2004; Kılıç, 2009). Monoaminerjik yollar noradrenalin, serotonin ve dopamin gibi monoaminleri kullanarak sadece ağrıyı azaltan özellikte olmayıp ağrıyı reseptör alt tipi ve baskın monoamin tipine göre arttırabileceğinden modülasyon yolağı olarak da adlandırılır. Örneğin; serotonin 5HT₁ (5-Hidroksitriptamin) reseptörü üzerinden inhibitör etki sağlarken 5 HT_{2/3} üzerinden fasilitör etki gösterir. Noradrenalin ise pür inhibitör etkiye sahiptir (Uyar, 2017). Ayrıca genel bir inhibitör madde olarak gama amino butirik asit (GABA)'nın da antinosiseptif mekanizmalara katıldığı düşünülmektedir. Projeksiyon nöronları üzerinde hızlı ve kısa süreli inhibisyon, en çok monoaminerjik transmitterler GABA ve kısmen de enkefalin ile olmaktadır. Daha uzun süreli inhibisyon endorfin, kısmen enkefalin ve somatostatin ile oluşmaktadır. Glisin ve GABA'nın medulla spinalisteki segmental ağrı inhibisyonunda önemli rolleri vardır (Aydın, 2002).

2.2. Kannabinoidlerjik Sistemin Ağrıdaki Rolü

Son yıllarda ağrı tedavisi için geleneksel bir ilaç olan esrar dikkat çekmektedir. Uzak doğu geleneksel tıbbında; inflamatuvar barsak hastalıkları, gastroenterit, anoreksi, motilite bozuklukları, diyare, diyabetik gastroparezi, kusma ve abdominal ağrı gibi sağlık problemlerinin tedavisinde binlerce yıldır esrar (Cannabis sativa) kullanılmaktadır. Asırlardır geleneksel ağrı tedavisinde kullanılan kannabisin aktif etken maddesi olan delta-9 tetrahidrokannabinol (Δ^9 -THC) 1960'lerde izole edilmiştir (Mechoulam ve diğ., 1995; Sakin ve diğ., 2015; Woodhams ve diğ., 2017). Kannabinoid reseptörlerin klonlanmasından kısa süre sonra, endokannabinoidler olarak adlandırılan endojen ligandlar tanımlanmış ve sentezlenmiştir. Tanımlanan bu bileşiklerin sayısı

zaman içinde giderek artmaktaysa da, bunlar arasında en önemlisinin, anandamid ve 2-araşidonogliserol olduğu düşünülmektedir. Endokannabinoidler lipit yapısındadır ve membran depolarizasyonuna yanıt olarak nöronlar tarafından sentezlenip salınılmaktadırlar. Salındıktan sonra, bu maddeler, özgül enzimler tarafından hızla inaktive edilmektedir (Pagotto ve Pasquali, 2006). Dolayısıyla endokannabinoidleri metabolize eden “Fatty acid amide hydrolase / Yağ asit amid hidrolaz” (FAAH) ve “Monoacylglycerol lipase / Monoağılglicerol lipaz” (MAGL) enzimlerinin inhibisyonuyla endokannabinoidlerin arttırılması da avantajlı bir tedavi stratejisi olarak değerlendirilmektedir. Tüm bu endokannabinoiderjik sistem komponentleri hemen hemen tüm nosiseptif yollar boyunca bulunmaktadır. Dolayısıyla eksojen kanabioide ligandları ile bu sistemi hedefleyerek veya endojen sinyalleri arttırarak perifer, spinal kord arka boynuzu ve beynin supraspinal ağrı bölgelerinde nosisepsiyon düzenlenebilir (Woodhams ve diğ., 2017). Kannabinoiderjik sistemi hedef alan ligandların kimyasal, mekanik ve termal ağrı uyaranları ile oluşturulmuş akut ağrıda, ve de inflamatuvar ağrı ve nöropatik ağrı gibi kronik ağrılarda da etkili oldukları gösterilmiştir (Bar-Joseph ve diğ., 2004; Clayton ve diğ., 2004; Çınar, 2012; Hanus ve diğ., 1999; Labuda ve diğ., 2005; Manzanares ve diğ., 2006; Ohta ve diğ., 2007). Son zamanlarda Cannabis ekstresine dayanan farmakolojik bir preparatın Kanada’da multiple sklerozdaki nöropatik ağrıda kullanılması, endokannabinoid sistemle güvenilir şekilde etkileşime girmenin mümkün olduğunu akla getirmektedir (Marzo ve Petrosino, 2007).

Tüm ekso- ve endokannabinoidler, ağırlıklı olarak nöronlar üzerinde eksprese edilen kannabinoid-1 (CB1) reseptörü ve çoğunlukla bağışıklık sistemi hücreleri üzerinde eksprese edilen kannabinoid-2 (CB2) reseptörü olmak üzere temel olarak 2 farklı reseptör yoluyla etki etmektedir. Bununla birlikte CB-2 reseptörü, beynin birkaç bölgesinde nöronal hücrelerin yanı sıra glial hücrelerde de görülmektedir. Ayrıca GPR 55 adlı endokannabinoid reseptörü olarak kabul edilen ve Δ^9 -THC, ve anandamid gibi endokannabinoidleri bağlayan G proteinine kenetli yetim bir reseptör tanımlanmıştır. CB1 ve CB2 reseptörleri de 7-transmembran G-proteinine kenetli reseptörlerdir. CB1 reseptörlerinin aktivasyonu, adenilil siklaz ve voltajla aktive olan kalsiyum (Ca^{+2}) kanallarının inhibe edilmesine yol açmaktadır. CB2 reseptörü aktivasyonu ise adenilil siklazı inhibe etmekte fakat iyon iletkenliğini etkilememektedir. Adenilil siklazı inhibisyonu sAMP üretimini ve Ca^{+2} iletkenliğini azaltırken, potasyum iletkenliğini ve

mitojenle aktiveştirilen protein kinazlarının (MAPK) aktivitesini arttırmaktadır. Kanabinoidlerin CB1 reseptörlerine bağlanması, antinosiseptif aktiviteleri için kritik öneme sahiptir (Elikottil ve diğ., 2013). CB1 reseptörleri, merkezi sinir sisteminde yüksek düzeylerde olup, özellikle, beyin bilişsel fonksiyonu olan bölgelerinde yer alırlar. (Pagotto ve Pasquali, 2006; Tüfekçi Alphan ve Yılmaz, 2007). Bu reseptörlerin beyin, spinal kord boynuzları, dorsal kök gangliyonu ve periferik afferent sinirler gibi ağrı ile ilişkili bölgelerdeki anatomik dağılımları kannabinoidlerin karmaşık ağrı mekanizmasını desteklemektedir. (Çınar ve diğ., 2011). CB1 reseptörü aktivasyonu muhtemelen kalsiyum ve potasyum kanallarının modifikasyonu aracılığıyla membran depolarizasyonunu ve ekzositozu etkileyerek asetilkolin, norepinefrin, gama-amino bütirik asit, glisin, dopamin, serotonin ve kolesistokinin gibi nörotransmitterlerin salımını etkilemekte ve böylelikle nosiseptif sensitizasyonu baskılamaktadır (Elikottil ve diğ., 2013; Fine ve Rosenfeld, 2013; Guindon ve Hohmann, 2009). Her ne kadar CB1 kanabinoid reseptörler ağrıda daha ön planda rol oynuyor gibi dursa da çalışmalar ağrı modeline göre değışecek şekilde CB2'lerin de primer rol oynayabildiğini ve hatta ligandların antinosiseptif etki gösterebilmesi için her iki reseptör tipinin aktivasyonunun da gerekli olduğunu bildirmektedir (Woodhams ve diğ., 2017). Örneğin; formalinle-indüklenen inflamatuvar ağrıda, WIN-55,212-2'nin analjezik etkisine hem CB1 hem de CB2 reseptörlerinin aracılık ettiğı görölmüştür (Kehl ve diğ., 2003). FAAH inhibisyonunun antinosiseptif etkilerinin, farelerde kısmi siyatik sinir ligasyonu (PSNL) modelinde sadece CB1'e bağımlıyken (Desroches ve diğ., 2013), sıçanlarda spinal sinir ligasyonu (SNL) modelinde hem CB1 hem de CB2 bağımlı olduğı gösterilmiştir (Chang ve diğ., 2006; Jhaveri ve diğ., 2006; Karbarz ve diğ., 2009). Ayrıca, sistemik FAAH inhibisyonu farelere uygulana karragenan modelinde CB2 reseptörü aracılığıyla anti-inflamatuvar etki gösterirken (Holt ve diğ., 2005) sıçanlara uygulanan freund adjuvan modelinde CB1 aracılı antinosisepsiyon üretmiştir (Wilson ve diğ., 2005). CB2'yi eksprese eden periferik immün hücrelerin ve merkezi sinir sistemindeki glial hücrelerinin iltihaplı ağrı modellerine potansiyel katılımı nedeniyle CB2 komponentinin önemini inflamatuvar ağrıda giderek artmaktadır. Fare arka pençesindeki karregenana-indüklenen inflamatuvar ağrının, CB2 selektif JWH-133 (Elmes ve diğ., 2005) ve CB2 selektif PRS211375 (Beltramo, 2009) sistemik enjeksiyonu, CB2 agonisti AM1241 lokal enjeksiyonu ile hafifletildiğinin gözleendiğı çalışmalar (Quartilho ve diğ., 2003) CB2 reseptörlerin inflamatuvar ağrıdaki, rolünü destekler niteliktedir.

2.3.Ağrının Doğal Tedavisi

Geleneksel ve modern tıp uygulamalarında bitkisel ilaç olarak tedavide kullanılan bitkilere ‘Tıbbi Bitki’ adı verilmektedir (Deveci, 2017). Tıbbi bitkiler ve bu bitkilerden hazırlanan bitkisel ilaçlar özellikle Afrika gibi ülkelerde kırsal toplulukların kültür ve geleneklerinin önemli bir parçasını oluşturmaktadırlar (Deveci, 2017; Njume ve diğ., 2009). Günümüzde, 10 000’den fazla bitkiden ağrı da dahil çeşitli hastalıkların tedavisinde yararlanıldığı belirtilmektedir (Bacanlı ve diğ.,2012). Her ne kadar farmakolojik ağrı yönetimi birçok ağrılı hastalıkta önemli bir rahatlama sağlasa da, bitkisel ilaçlar, bazı vakalarda geleneksel ilaçlara göre daha az yan etki gösterebilmesi nedeniyle tercih edilebilmekte ve pek çok hasta tamamlayıcı ve alternatif tıp ile desteklenmektedir. Ayrıca, ağrı tedavisinde kullanılan botanikler, bir hastanın yaşam kalitesini iyileştirmeye katkıda bulunabilmekte ve geleneksel ağrı yönetimini etkileyerek geliştirebilmektedir (Arome ve diğ., 2018; Zareba, 2009).

Son yıllarda tıbbi araştırmalarda muazzam bir ilerleme kaydedilmiş olsa da ağrı ve iltihaplanma gibi birçok ciddi hastalığın tedavisi hala sorunludur. Şu anda kullanılan anti-inflamatuar ve analjezik ilaçlar bazı ciddi yan etkilere sebep olmaktadır. Bu nedenle, daha az yan etki ile güçlü analjezik ve anti-inflamatuar ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Sen ve diğ., 2010). Doğal antioksidan bileşiklerin başlıca kaynağını oluşturan tıbbi bitkilerin tedavideki önemleri giderek artmakta ve içerdikleri biyoaktif fenolik maddelerin de analjezik ve anti-inflamatuvar özellikler gösterdiği bilinmektedir (Gupta ve diğ., 2012).

2.4.Fenolik Bileşikler

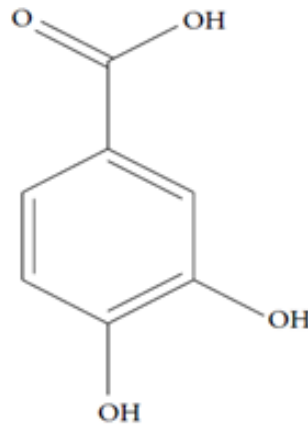
Fenolik bileşikler, bir aromatik halkaya bağlı fonksiyonel türevleri de dahil olmak üzere bir veya birden fazla hidroksil grubu içeren maddelerdir. Fenolikler en aktif doğal antioksidanlardan olup, antioksidan etkilerini serbest radikalleri bağlama, metallerle şelat oluşturmaları ve lipoksijenaz enzimini inhibe etmeleri ile gerçekleştirmektedirler (Dimitrios ve diğ., 2006; Güleşçi ve Aygöl, 2016; Nichenametla ve diğ., 2006). Tahıllar, sebzeler, meyveler, baklagiller, fındık, şarap, bira, çay, kakao ve elma şarabı gibi bitkilerde bulunuyor olması doğada son derece yaygın olduğunun ispatıdır. Son zamanlarda bazı fenolikler ve bunların antioksidan ve serbest radikal süpürme

yetenekleri nedeniyle insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri ile ilişkili olarak gıda fenoliklerine olan ilgi de büyük ölçüde artmıştır (Proestos ve diğ., 2008). Fenolik bileşiklerin antikanserojenik, antiviral, anti-inflamatuvar, antibakteriyal ve vazodilator aktivite gibi tıbbi etkiler gösterdikleri rapor edilmiştir (Breinholt, 1999; Duthie ve diğ., 2000; Mattila ve Hellström, 2007; Shahidi ve Naczk, 1995).

2.4.1. Fenolik asit

Fenolik asitler; hidroksisinnamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olmak üzere iki grupta incelenmektedir (Yakup, 2008). Hidroksisinnamik asit türevlerine *p*-kumarik, kafeik, ve ferulik asit örnek olarak verilebilirken hidroksibenzoik asitlere salisilik asit, *p*-hidroksibenzoik asit ve protokateşik asit verilebilir (Kolaç, 2017). Fenolik asitler antioksidan aktiviteleri nedeniyle antik çağlardan beri gıda endüstrisinde koruyucu olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca HIV, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi yaşamı tehdit eden hastalıkların riskini azaltarak, anti-aging gibi önemli biyolojik aktivitelere de sahiptirler (Saibabu ve diğ., 2015). Ayrıca fenolik asitleri içeren bazı bitkilerin ve bazı polifenol ve fenolik asitlerin analjezik etki gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Yao ve diğ., 2016, Boussouf ve diğ., 2017).

2.4.1.1. Protokateşik asit



Şekil 1. Protokateşik Asitin Kimyasal Formülü (Kolaç, 2017)

Hidroksibenzoik asit olan protokateşik asitin (3,4-dihidroksibenzoik asit) son dönemlerdeki çalışmalarda artan bir ilgiye sahip olduğu görülmektedir (Semaming ve diğ., 2015). Bunun nedeni, ilk olarak hayvanlar ve insanlar tarafından emilen antosiyaninler ve prosiyanidinler gibi kompleks polifenollerin ana metabolitlerinden biri olması, ikinci olarak da, protokateşik asit'in farklı moleküler hedefler üzerinde hareket ederek çeşitli biyolojik etkiler gösterebiliyor olmasıdır (Masella ve diğ., 2012). Özellikle *Olea europaea* (zeytin), *Oryza sativa* (kahverengi pirinç), *Allium cepa* (soğan), *Vitis vinifera* (beyaz üzüm), *Akai üzümü*, *Melissa officinalis* (melissa) , *Rosmarinus officinalis* (biberiye) , *Cinnamomum aromaticum* (tarçın) ve Geleneksel Çin Tıbbında kullanılan bitkiler *Hibiscus sabdariffa* (roselle), *Salvia miltiorrhiza*, *Alpinia oxyphylla* ve *Boswellia dalzielii* içinde yüksek oranda bulunan protokateşik asit üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Kolaç, 2017; Krzysztoforska ve diğ., 2017). Hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmaların raporları protokateşik asitin çok yönlü biyolojik aktivitesinin olduğunu göstermektedir (Krzysztoforska ve diğ., 2017). Yapılan çalışmalar protokateşik asitin normal hücreler üzerinde zararlı etkilere yol açmadan, antibakteriyal, antioksidan, antidiyabetik, antikanser, antiülser, antiaging, antifibrotik, antiviral, hiperlipidemik, kardiyak, hepatoprotektif, nefroprotektif, antitümoral, anti-inflamatuar, analjezik aktivite ve antiseptik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (Kakkar ve Bais, 2014; Lin ve diğ., 2009; Lende ve diğ., 2011; Liu ve Wang, 2002; Masella ve diğ., 2012; Wei ve diğ., 2013). Ayrıca, protokateşik asit dolaşımında önemli ölçüde uzun ve yüksek konsantrasyonlarda bulunmakta ve kolayca kan beyin bariyerini geçebilmektedir. Deneysel çalışmalar, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları da dâhil olmak üzere nörodejeneratif süreçlerin önlenmesinde protokateşik asitin rolünü güçlü bir şekilde desteklemektedir. Bilişsel ve davranışsal bozukluğun altında yatan süreçler üzerindeki olumlu etkileri ve hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda gösterilen umut verici özellikleri ile protokateşik asit nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu, etkili ve güvenli terapötik aday olmaya devam etmektedir (Krzysztoforska ve diğ., 2017). Yapılan farklı bir çalışmada protokateşik asit, diyabetik farelerde de antikoagülan, anti-inflamatuar ve antioksidatif etkiler göstermiştir. Protokateşik asitin kalp ve böbrekteki interlökin ve tümör nekroz faktörü- α düzeylerini de düşürdüğü bildirilmiştir. Bu nedenle, protokateşik asitin, diyabetik komplikasyonların tedavisinde de trigliserit düşürücü, antikoagülatör, antioksidatif ve anti-inflamatuar etkiler yoluyla son derece yararlı olabileceği düşünülmektedir (Lin ve diğ., 2009). Protokateşik asit alımı yaşlı

farelerin beyinde ileri glikasyon son ürünü, prostaglandin E, inflamatuvar sitokinler ve reaktif oksijen türlerinin seviyelerini azaltarak glisatif ve inflamatuvar streslere karşı beyni korumaktadır. Bu nedenle, protokateşik asitten zengin gıdaların takviyesinin, yaşlanmanın önlenmesi veya hafifletilmesi için faydalı olabileceği belirtilmektedir (Tsai ve Yin, 2012).

Tüm bu çalışmaların yanında protokateşik asitin analjezik aktivitesi ve etki mekanizması ile ilişkili yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Kimyasal ve ısı ile indüklenen fare ağrı ve inflamasyon modellerinde umut verici anti-inflamatuvar ve analjezik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Lende, 2011). Protokateşik asitin farelerde sıcak-plaka (supraspinal yanıt) ve kuyruk-daldırma (spinal refleks) testlerinde antinosiseptif etkisi araştırılmış ve 300 mg/kg (p.o.) protokateşik asitin analjezik etki gösterdiği ve etkisinin spinal seviyede kolinerjik ve özellikle opioiderjik sistem tarafından, hem spinal hem supraspinal seviyede noradrenerjik sistem tarafından modüle edildiği rapor edilmiştir (Bektaş 2017). Bir başka çalışmada ise farelerde asetik asitle-indüklenen kıvrınma testinde 300 mg/kg (p.o.) protokateşik asitin analjezik etkisinde NO-sGMP-ATP'ye duyarlı K⁺ kanalı yolağının katılımı araştırılmış fakat analjezik etki yalnızca NO ile ilişkilendirilmiştir (Bektaş ve diğ., 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Sarf Malzemeleri

Protokateşik asit (Sigma, St. Louis, MO, USA), AM630 (Cayman, Michigan, A.B.D.), AM251 (Cayman, Michigan, A.B.D.), WIN 55,212-2 (Cayman, Michigan, A.B.D.), dipiron (Sigma, St. Louis, MO, USA).

3.2. Kullanılan Cihazlar

Ultrasonik Su Banyosu (Heto, Allerod, Danimarka), Dijital Fırın Termometresi (TFA, LT-101, Reicholzheim, Almanya), Activity cage cihazı (Ugo Basile, Model No: 47420), Hassas Terazı (Ohaus, E12140, İsviçre)

3.3. Deney Hayvanları

Deneylerde yetişkin CD-1 erkek fareler kullanıldı. 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsüne ayarlanmış 22 ± 1 °C sıcaklığındaki iyi havalandırılan odalarda barındırılan hayvanlara beslenmeleri amacıyla standart yem pelletleri ve çeşme suyu verildi. Deneysel süreç Helsinki Deklarasyonunun etik prensiplerine uygun olarak hazırlandı ve Anadolu Üniversitesi Yerel Etik Komitesi tarafından Etik Kurul Onayı alındı (Karar No: 2018-05).

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Ayrı ayrı oluşturulan gruplara; **1.** Kontrol grubu için eşit hacim çözücü (%50 PEG : %8 DMSO) uygulaması, **2.** 75 mg/kg protokateşik asit uygulaması, **3.** 150 mg/kg protokateşik asit uygulaması, **4.** 300 mg/kg protokateşik asit uygulaması, **5.** 300 mg/kg protokateşik asit uygulamasından 30 dakika önce CB1 antagonisti olan 8 mg/kg AM251 ön-uygulaması, **6.** 300 mg/kg protokateşik asit uygulamasından 30 dakika önce CB2 antagonisti olan 8 mg/kg AM630 ön-uygulaması, **7.** Pozitif kontrol non-spesifik CB agonisti 5 mg/kg WIN 55,212-2 uygulaması, **8.** Çözücünden 30 dk önce 8 mg/kg AM251

ön-uygulaması, **9.** Çözücünden 30 dakika önce 8 mg/kg AM630 ön-uygulaması, **10.** WIN 55,212-2 uygulamasından 30 dk önce 8 mg/kg AM251 ön-uygulaması, **11.** WIN 55,212-2 uygulamasından 30 dakika önce 8 mg/kg AM630 ön-uygulaması, **12.** referans ilaç 300 mg/kg dipiron uygulaması yapıldı. Ayrıca **13.** 150 mg/kg protokateşik asit ile 2,5 mg/kg WIN 55,212-2 kombine uygulaması yapılan bir grup aradaki olası etkileşim değerlendirmek için oluşturuldu. Motor aktivitenin değerlendirilmesi için ise 2 ayrı grup oluşturuldu (**14.** ve **15.** grup) ve bir gruba çözücü uygulaması yapılırken diğer bir gruba 300 mg/kg protokateşik asit uygulaması yapılarak aktivite kafesi deneyi uygulandı. Kullanılan agonist ve antagonist dozları benzer çalışmaların sunulduğu literatürlerden hareketle seçilmiştir (Kehl ve ark., 2003; Godin ve diğ. 2015; Pinho-Ribeiro ve diğ., 2016). Tüm madde uygulamaları intraperitoneal (i.p.) yolla yapıldı. Ağrı eşikleri tüm gruplarda, antagonist madde uygulamasından önce ve protokateşik asit, dipiron ve WIN 55,212-2 uygulamasından sonra 30. dakikada, kuyruk-daldırma testi ile belirlendikten sonra asetik asitle-indüklenen kıvrınma testi uygulandı.

3.5.Deneysel yöntemler

3.5.1. Kuyruk-daldırma testi

Analjezi çalışmalarında sık kullanılan termal uyarana karşı ağrı eşiğinin değerlendirildiği bir metottur. Hayvanın kuyruğunun ucundan itibaren 3 cm.'lik kısmı bir beher içerisinde bulunan $52.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ sıcaklığındaki suya daldırıldı. Kronometre ile yapılan ölçümler hayvanın kuyruğunun suyun içine daldırıldığı andan, suyun dışına doğru hızlıca çekmesine kadar geçen süreyi kapsamaktadır (Schmauss ve Yaksh, 1984). Reaksiyon süresi izlenerek hayvanın nosiseptif eşiği belirlendi. Hayvanların kuyruklarının sıcaktan zarar görmesini engellemek için deneyin bitirilme süresi 15 sn. olarak belirlendi.

3.5.2. Asetik asitle-indüklenen kıvrınma testi

Kimyasal analjezi ölçüm yöntemidir. Hayvanlarda güçlü visceral ağrı oluşturabilmek için asetik asit solüsyonu kullanılmaktadır. Hayvanlarda, asetik asitin *i.p.* olarak

uygulanmasından sonra karın kaslarında kasılma ile başlayıp daha sonra arka ayakların geriye doğru gerilmesi ve karnın yere sürtünmesi ile karakterize bir kıvranma durumu oluşmaktadır. Son madde enjeksiyonundan 40 dk sonra, %0,6'lık asetik asit solüsyonu hayvanlara *i.p.* yolla verildi. 5 dk.'lık bekleme süresinin sonunda, her hayvanda bahsedilen kıvranma hareketleri 20 dk boyunca gözlemlendi (de Oliveira ve diğ., 2016).

3.5.3. Aktivite Kafesi

Spontan lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için, pleksiglas, kafes şeklinde olan aktivite kafesi isimli cihazı kullanıldı. Cihazın karşılıklı iki dikey kenarında bulunan parçalar kızıl ötesi (Infrared, IR) ışınları üretmektedir. Hayvanların yatay ve dikey yönlerdeki hareketleri bu ışınları kesintiye uğratmakta ve bu şekilde fotosel yardımıyla kaydedilmektedir (Marazioti vd., 2009). Çözücü ve 300 mg/kg protokatesik asit uygulanan hayvanlar enjeksiyondan 30 dk. sonra aktivite kafesine alınarak 15 dk. süreyle kayıt alındı.

3.6. Veri Analizi

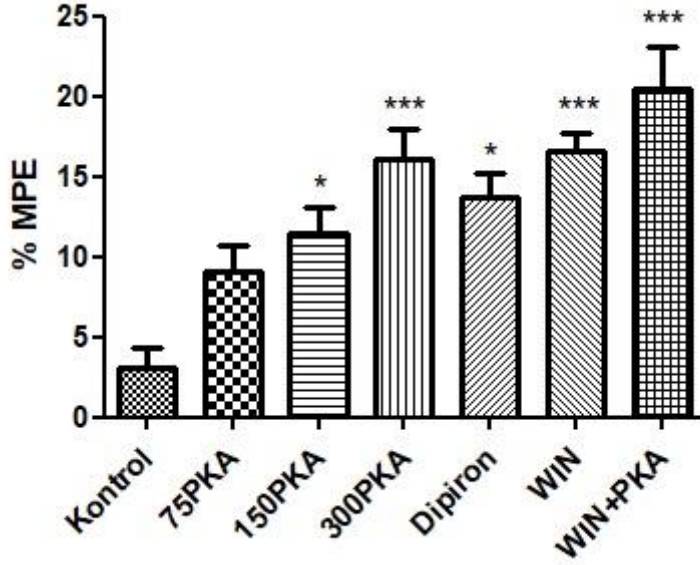
Kuyruk-daldırma ve kıvranma testinden elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi Graphpad Prism ver. 5.0 paket programı ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi yapıldı. Aktivite testinden elde edilen veriler ise student-t testi ile değerlendirildi. Analiz sonuçları ortalama $\pm$ standart hata (S.H.) olarak ifade edildi ve istatistiksel anlamlılık düzeyi başlangıcı olarak $P<0.05$ kabul edildi.

Kuyruk-daldırma testinden elde edilen sürelerden hareketle maksimum olası etkinin yüzdesi (%MPE) aşağıdaki formülden hareketle hesaplandı (Coelho ve diğ., 2005):

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

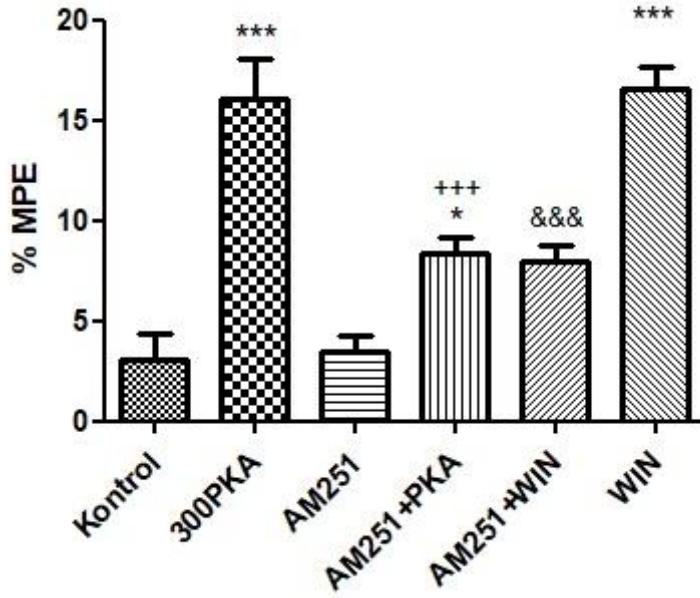
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Kuyruk-Daldırma Testi



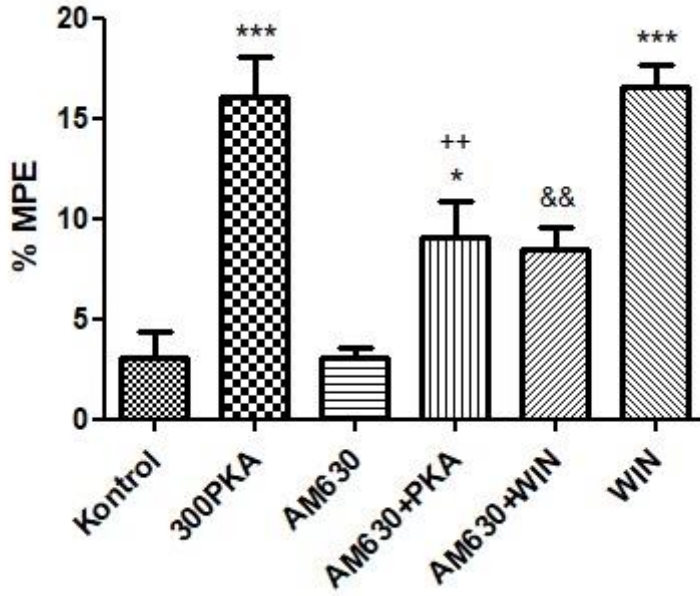
Şekil 2. 75, 150 ve 300 mg/kg ,i.p., protokateşik asitin kuyruk-daldırma testinde gözlenen analjezik etkisi. PKA: Protokateşik asit, WIN: 55,212-2 (5 mg/kg,i.p.). * $P<0.05$, *** $P<0.001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanılarak tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

Şekil 2’de 75, 150 ve 300 mg/kg, i.p., protokateşik asitin kuyruk-daldırma testindeki analjezik etkisi görülmektedir. Kontrol grubuna göre %MPE değerinin anlamlı olarak yüksek çıkması analjezik etki ile ilişkilendirildi. 75 mg/kg protokateşik asit kuyruk çekme sürelerinden hareketle hesaplanan %MPE değerini göreceli olarak yükseltirken, 150 ve 300 mg/kg protokateşik asit, 300 mg/kg dipiron ve 5 mg/kg WIN 55,212-2 kontrol grubuna göre anlamlı olarak (sırasıyla; $P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.001$) yükseltti. 150 mg/kg protokateşik asit ile 2,5 mg/kg WIN 55,212-2’nin kombine uygulamasının yapıldığı grupta %MPE değerinin kontrol grubuna göre anlamlı ($P<0.001$) olarak yükseldiği gözlemlendi.



Şekil 3. 300 mg/kg ,i.p., protokateşik asitin kuyruk-daldırma testinde gözlenen analjezik etkisine CB1 reseptör stimülasyonunun katılığı. PKA: Protokateşik asit, WIN: WIN 55,212-2 (5 mg/kg, i.p.). * $P<0.05$, *** $P<0.001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık. *** $P<0.001$; 300PKA'ya göre anlamlı farklılık. &&& $P<0.001$; WIN'a göre anlamlılık. Ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanılarak tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

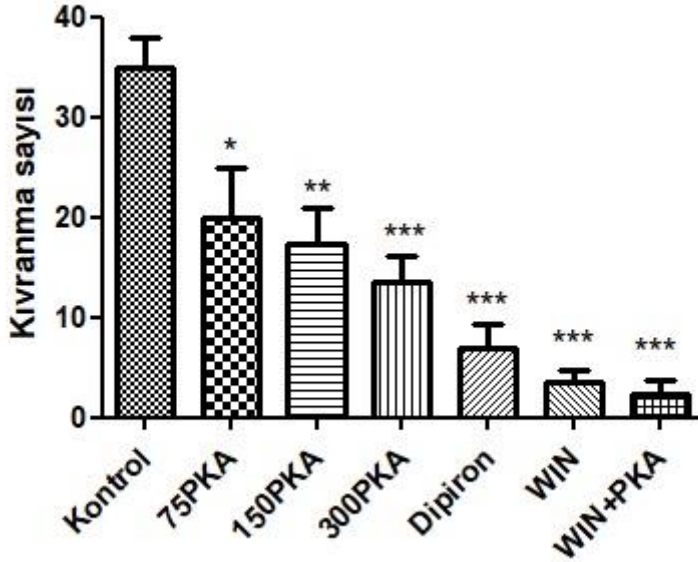
Şekil 3'de CB1 reseptör antagonisti AM-251 (8 mg/kg, i.p.) ön-uygulamasının 300 mg/kg protokateşik asitin kuyruk-daldırma testinde gözlenen analjezik etkisini ne şekilde değiştirdiği görülmektedir. Kontrol grubuna göre %MPE değerinin anlamlı olarak yüksek çıkması analjezik etki ile ilişkilendirildi. %MPE'nin 300 mg/kg protokateşik asit uygulanan hayvanlarda kontrol grubuna göre anlamlı ($P<0.001$) olarak yükseldiği gözlemlendi. Protokateşik asit öncesi AM-251 ön-uygulaması, protokateşik asit ile yükselmiş olan %MPE değerini anlamlı ($P<0.001$) olarak azaltmasına rağmen bu grupta analjezik etkinin anlamlı ($P<0.05$) olarak devam ettiği gözlemlendi. Benzer şekilde 5 mg/kg WIN 55,212-2 uygulaması ile gözlenen anlamlı ($P<0.001$) yükseliş AM-251 ön-uygulaması ile anlamlı ($P<0.001$) olarak önlemlendi.



Şekil 4. 300 mg/kg, i.p., protokateşik asitin kuyruk-daldırma testinde gözlenen analjezik etkisine CB2 reseptör stimülasyonunun katılımı. PKA: Protokateşik asit, WIN: WIN 55,212-2 (5 mg/kg, i.p.). * $P<0.05$, *** $P<0.001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık. ++ $P<0.01$; 300PKA'ya göre anlamlı farklılık.. && $P<0.01$; WIN'a göre anlamlılık. Ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanılarak tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

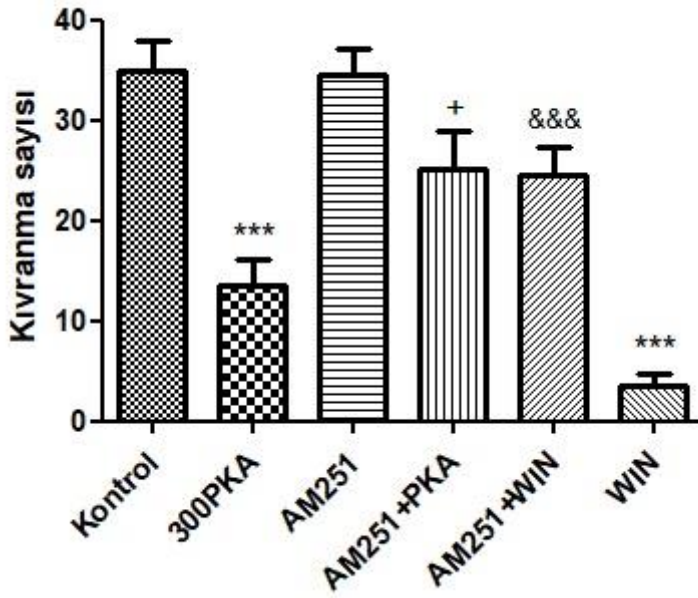
Şekil 4'de CB2 reseptör antagonisti olan AM-630 (8 mg/kg, i.p.) ön-uygulamasının 300 mg/kg protokateşik asitin kuyruk-daldırma testinde gözlenen analjezik etkisini ne şekilde değiştirdiği görülmektedir. Kontrol grubuna göre %MPE değerinin anlamlı olarak yüksek çıkması analjezik etki ile ilişkilendirildi. %MPE'nin 300 mg/kg protokateşik asit uygulanan hayvanlarda kontrol grubuna göre anlamlı ($P<0.001$) olarak yükseldiği gözlemlendi. Protokateşik asit öncesi AM-630 ön-uygulaması, protokateşik asit ile yükselmiş olan %MPE değerini anlamlı ($P<0.01$) olarak azaltmasına rağmen bu grupta analjezik etkinin anlamlı ($P<0.05$) olarak devam ettiği gözlemlendi. Benzer şekilde 5 mg/kg WIN 55,212-2 uygulaması ile gözlenen anlamlı ($P<0.001$) yükseliş AM-630 ön-uygulaması ile anlamlı ($P<0.01$) olarak önlemlendi.

4.2. Asetik Asitle-İndüklenen Kıvrınma Testi



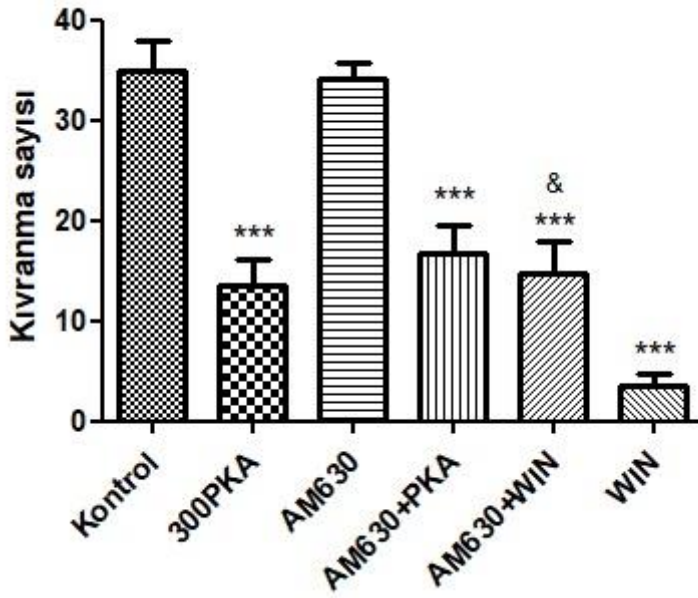
Şekil 5. 75, 150 ve 300 mg/kg, i.p., protokateşik asitin asetik asitle-indüklenen kıvrınma testinde gözlenen analjezik etkisi. PKA: Protokateşik asit, WIN: 55,212-2 (5 mg/kg,i.p.), * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

Şekil 5’de 75, 150 ve 300 mg/kg protokateşik asitin asetik asitle-indüklenen kıvrınma testindeki analjezik etkisi görülmektedir. Kontrol grubuna göre kıvrınma sayısının anlamlı olarak düşük çıkması analjezik etki ile ilişkilendirildi. 75, 150, 300 mg/kg protokateşik asit, 300 mg/kg dipiron ve 5 mg/kg WIN 55,212-2 uygulaması kıvrınma sayısını kontrol grubuna göre anlamlı (sırasıyla; $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$) olarak azalttı. 150 mg/kg protokateşik asit ile 2,5 mg/kg WIN 55,212-2’in kombine uygulamasının yapıldığı grupta kıvrınma sayısının kontrol grubuna göre anlamlı ($P<0.001$) olarak azaldığı gözlemlendi.



Şekil 6. 300 mg/kg, i.p., protokateşik asitin asetik asitle-indüklenen kıvrınma testinde gözlenen analjezik etkisine CB1 reseptör stimülasyonunun katılımı. PKA: Protokateşik asit, WIN: WIN 55,212-2 (5 mg/kg, i.p.). *** $P < 0.001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık. + $P < 0.05$; 300PKA'ya göre anlamlı farklılık. &&& $P < 0.001$; WIN'a göre anlamlı farklılık. Ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanılarak tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

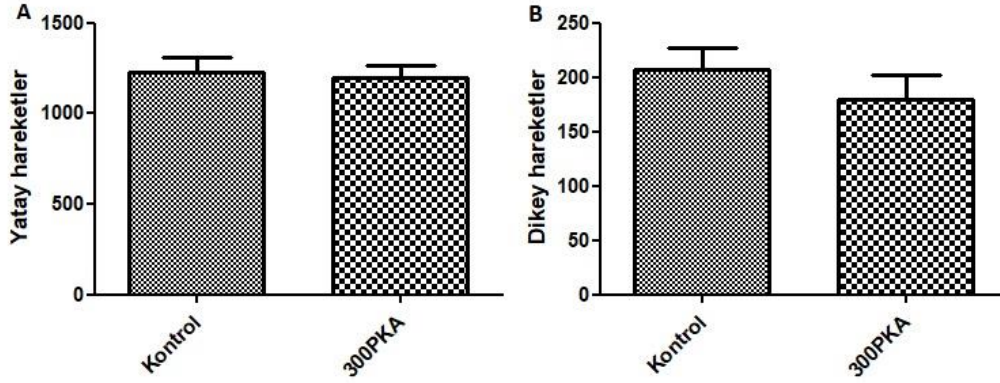
Şekil 6'da CB1 reseptör antagonisti olan AM-251 (8 mg/kg, i.p.) ön-uygulamasının 300 mg/kg protokateşik asitin asetik asitle-indüklenen kıvrınma testinde gözlenen periferik analjezik etkisini ne şekilde değiştirdiği görülmektedir. Kontrol grubuna göre kıvrınma sayısının anlamlı olarak düşük çıkması analjezik etki ile ilişkilendirildi. 300 mg/kg protokateşik asit uygulanan hayvanlarda kıvrınma sayısının anlamlı ($P < 0.001$) olarak düştüğü görüldü. Protokateşik asit öncesi AM-251 ön-uygulaması protokateşik asit ile azalmış olan kıvrınma sayısını anlamlı ($P < 0.05$) olarak yükselterek, protokateşik asit etkisini önledi. Benzer şekilde 5 mg/kg WIN 55,212-2 uygulaması ile kıvrınma sayısında gözlenen anlamlı ($P < 0.001$) azalma AM-251 ön-uygulaması ile anlamlı ($P < 0.001$) olarak önlendi.



Şekil 7. 300 mg/kg, i.p., protokateşik asitin asetik asitle-indüklenen kıvrınma testinde gözlenen analjezik etkisine CB2 reseptör stimülasyonunun katılımı. PKA: Protokateşik asit, WIN: WIN 55,212-2 (5 mg/kg, i.p.). *** $P < 0.001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık. & $P < 0.05$; WIN'a göre anlamlılık. Ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanılarak tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

Şekil 7’de CB2 reseptör antagonisti AM630 (8 mg/kg, i.p.) ön-uygulamasının 300 mg/kg protokateşik asitin asetik asitle-indüklenen kıvrınma testinde gözlenen periferik analjezik etkisini ne şekilde değiştirdiği görülmektedir. Kontrol grubuna göre kıvrınma sayısının anlamlı olarak düşük çıkması analjezik etki ile ilişkilendirildi. 300 mg/kg protokateşik asit uygulanan hayvanlarda kıvrınma sayısının anlamlı olarak ($P < 0.001$) düştüğü görüldü. Protokateşik asit öncesi AM-630 ön-uygulamasının protokateşik asit ile azalmış olan kıvrınma sayısını etkilemediği görülürken, kıvrınma sayısında kontrol grubuna göre anlamlı ($P < 0.001$) azalmanın devam ettiği gözlemlendi. Benzer şekilde 5 mg/kg WIN 55,212-2 uygulaması ile kıvrınma sayısında gözlenen anlamlı ($P < 0.001$) azalma AM-630 ön-uygulaması ile anlamlı ($P < 0.05$) olarak önlenirken, kıvrınma sayısında kontrol grubuna göre anlamlı ($P < 0.001$) azalmanın devam ettiği gözlemlendi.

4.3. Aktivite Kafesi



Şekil 8. 300 mg/kg,i.p., protokateşik asitin aktivite kafesi testinde yatay (A) ve dikey (B) hareketler üzerine etkisi. PKA: Protokateşik asit. Ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanılarak Student-t testi uygulandı.

Şekil 8’de 300 mg/kg protokateşik asitin aktivite kafesi ile ölçülen yatay (A) ve dikey (B) hareketleri üzerinden hareketle belirlenen lokomotor aktivite üzerine etkisi görülmektedir. Şekilden de anlaşılacağı üzere analjezik etkinin gözlemlendiği 300 mg/kg dozda protokateşik asit yatay ve dikey hareketlerde değişiklik yapmamıştır.

Bu tez çalışmasında protokateşik asitin analjezik etkisine kannabinoidlerjik CB1 ve CB2 reseptör katılımının rolü aydınlatılmıştır. Analjezik aktiviteyi değerlendirmek için kullanılan birçok test yöntemi bulunmakta ve yöntemlerin her biri farklı mekanizmaların yer aldığı ağrı davranışını değerlendirebilmektedir. 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 (Shin ve diğ., 2004). Bu tez çalışmasında analjezik etkiyi değerlendirmek için kuyruk-daldırma ve asetik asitle-indüklenen kıvrınma testi olarak 2 farklı yöntem kullanılmıştır. Kuyruk-daldırma testinde, hayvanın kuyruğunun sabit ısıda tutulan sıcak su banyosuna batırılmasıyla kuyruğunu veya tüm bedenini çekmesi arasındaki reaksiyon süresi izlenerek bu süre üzerinden akut termal uyarı ile başlatılan nosisepsiyonun duyarlılığı ölçülmektedir (Xie, 2011; Uludağ, 2017). Bu test üst merkezlerce yönetilen ağrı ile ilişkili fonksiyonları değil, nosiseptif

uyarı ile omurga refleksinin aktivitesini ölçmektedir (Xie, 2011). Şöyle ki; kuyruk-daldırma cevabı basit bir spinal reflekstir ve spinal kord transeksiyonundan sonra ortaya çıkmaktadır (Flores ve diğ., 2004). Kullanılmış olan diğer yöntem farelerde akut viseral ağrı için kullanılan en eski yöntemlerden biri olan seyreltik asetik asitin *i.p.* enjeksiyonu ile indüklenen kıvrınma modelidir (Bennett, 2001). Asetik asit farelerde abdominal kasılmalar, gövdenin bükülmesi ve döndürülmesi, arka bacakların uzatılması, motor koordinasyon bozukluğu ve motor aktivitede azalma ile karakterize edilen çok kalıplaşmış bir davranışı kışkırtmaktadır (Bars ve diğ., 2001). Periferik orjinli ağrıyı indüklemek için kullanılan bu yöntem zayıf analjeziklerin ürettiği etkiler için kanıt elde edilmesine izin verme avantajına sahiptir. Öte yandan, non-spesifik bir yöntemdir ve sadece major ve minor analjezikler değil adrenerjik blokerler, antihistaminikler, kas gevşeticiler, monoamin oksidaz inhibitörleri ve nöroleptikler de dahil olmak üzere başka ajanlar da bu yöntemde etkili çıkmaktadır (http-1, 2011; Bars ve diğ., 2001). Fakat diğer modellerde inaktif olan dozlarda antinösedatif potansiyelini saptayacak kadar hassas olmasından dolayı, periferik antinösedatif aktiviteyi değerlendirmek için oldukça sık kullanılan bir metottur (Mehrotra ve diğ., 2011). Bu tez çalışmasında fenolik bir madde olan protokatesik asitin kuyruk-daldırma testinde 75, 150 ve 300 mg/kg dozlarda, farelerin termal uyarana karşı eşikini doza bağlı olarak arttırdığı hatta 300 mg/kg uygulanan dozda 300 mg/kg dipiron ve CB agonisti 5 mg/kg WIN 55,212-2 kadar anlamlı bir analjezik etki sergilediği belirlenmiştir. Asetik asitle-indüklenen kıvrınma davranışını ise 75, 150 ve 300 mg/kg dozlarda uygulandığında anlamlı derecede azaltarak periferik analjezik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. 300 mg/kg dozda göstermiş olduğu analjezik etki 300 mg/kg dipiron ve CB agonisti 5 mg/kg WIN 55,212-2 uygulamasından elde edilen analjezik etkiye çok yakın bulunmuştur. Bu çalışmadan elde edilen analjezik etki verileri kısıtlı sayıda bulunan diğer bazı çalışmalar ile örtüşmektedir. Daha önce protokatesik asitin analjezik etkisi, yapılan bir çalışma ile değerlendirilmiş santral analjezik etkinliği sıcak-plaka ve kuyruk-daldırma testleri ile gösterilmiştir (Bektas ve diğ., 2015). Yapılan başka bir çalışmada ise asetik asitle-indüklenen kıvrınma hareketlerini önemli ölçüde düşürdüğü gözlenirken yine sıcak-plaka testinden anlamlı sonuçlar alınmıştır (Lende ve diğ., 2013). Özetle protokatesik asit hem periferik mekanizmalar hem de spinal refleksler üzerinden analjezik etki sergilemektedir. Bu tez çalışmasında deneysel çalışmalarda etkili bir analjezik olduğu gösterilen CB agonisti WIN 55,212-2 pozitif kontrol olarak kullanılmış (Manning ve

diğ., 2001) ayrıca yarı dozu etkili bulununan protokateşik asit yarı dozu ile kombine edilmiş (150 mg/kg protokateşik asit+2,5 mg/kg WIN 55,212-2), ve bu kombinasyonun sağlamış olduğu analjezik etki tek başına 300 mg/kg protokateşik asit ve 5 mg/kg WIN 55,212-2 analjezik etkisi ile benzer hatta daha yüksek bulunmuştur. Kannabinoiderjik sistem ağrı modülasyonu haricinde bir çok fizyolojik sürece dahil olduğundan belli bir amaçla kullanılırken beraberinde; bulantı, kusma, iştah değişiklikleri, hipertansiyon/hipotansiyon, taşikardi, bradikardi, solunum depresyonu, konfüzyon, psikomotor ajitasyon, sommolans, sedasyon gibi bir çok yan etkiyi getirebilmektedir (İbilioğlu ve diğ., 2017). Bu durum CB agonist kullanımını kısıtlamaktadır. Dolayısıyla çalışmalar en az yan etkiye sahip endikasyona spesifik ilaçlar keşfetme yönündedir. Protokateşik asitin tek başına etkili olduğu gibi direkt kannabinoiderjik sistem hedefli WIN 55,212-2 analjezisini de güçlendiriyor olması, kombine tedavinin daha az yan etkiyle kannabinoiderjik sistem hedefli analjezik etkiyi sağlayabilme açısından avantaj sağlayabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, aktivite kafesinden elde edilen veriler değerlendirildiğinde analjezik etkisi en yüksek bulunan ve etki mekanizmasının araştırılması için kullanılan doz olan 300 mg/kg dozda protokateşik asitin lokomotor aktivite üzerinde herhangi bir değişiklik yapmadığı belirlenmiştir. Özellikle santral sistem aracılığı ile etkili olan bileşiklerin lokomotor aktiviteden bağımsız bir şekilde etkinliklerini göstermeleri istenmektedir. Bu bağlamda protokateşik asitin tespit edilen analjezik etkisinin lokomotor aktivite ile ilişkili olmadığını ve ayrıca analjezik etkinin gözlemlendiği dozlarda yan etki olarak da lokomotor aktiviteyi azaltmadığı veya arttırmadığı söylenebilir.

Farmakolojik etkisi saptanan bileşiklerin sahip oldukları etkileri gösterirken hangi mekanizmalar ile etkileştiğinin bilinmesi, ilaç adayı bileşiğin etki profilinin belirlenmesi ve ilaçlar için doğru endikasyonun seçilebilmesi açısından önem arz etmektedir. Ağrı perifeden santrale çok fazla modülatör sistemin yer aldığı kompleks bir süreç ile yönetilmektedir. Protokateşik asitin analjezik etkisine aracılık eden mekanizmalarla ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Protokateşik asitin farelerde sıcak-plaka (supraspinal yanıt) ve kuyruk-daldırma (spinal refleks) testlerinde antinosiseptif etkisi araştırılmış ve 300 mg/kg (p.o.) protokateşik asitin analjezik etkisinin spinal seviyede kolinerjik ve özellikle opioidderjik sistem tarafından, hem spinal hem supraspinal seviyede noradrenerjik sistem tarafından modüle edildiği rapor edilmiştir (Bektaş 2017). Bir

başka çalışmada farelerde asetik asitle-indüklenen kıvrınma testinde 300 mg/kg (*p.o.*) protokateşik asitin analjezik etkisinde NO-sGMP-ATP'ye duyarlı K⁺ kanalı yolağının katılımı araştırılmış fakat analjezik etki yalnızca NO ile ilişkilendirilmiştir (Bektaş ve diğ., 2017). Ayrıca protokateşik asitin inflamatuvar ağrı ile ilişkilendirilebilecek şekilde iNOS ve COX-2'yi baskılayarak TNF-a, IL-1 β ve prostaglandin E₂ seviyelerini azaltarak, farelerde karragen kaynaklı inflamasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Semaming ve diğ., 2015). Bu bilgilere rağmen protokateşik asit anajezisinde rol oynadığı gösterilen söz konusu bu mekanizmalar tek başına protokateşik asit etkinliğini tam olarak açıklayamamaktadır.

Endokannabinoiderjik sistem periferde ve santralde bulunan kannabinoiderjik CB1 ve CB2 reseptörleri üzerinden birçok fizyolojik olaya aracılık eden bir sistemdir. Doğal veya sentetik kannabinoid reseptör agonistlerinin uygulanması, ağrı (özellikle nöropatik kökenli ağrıya karşı), anksiyete, glokom, bulantı, kusma ve kas spazmları hastalıklarını içeren bir takım önemli tıbbi durumlar için terapötik değeri göstermektedir. Kannabinoid reseptör agonistlerinin akut ve kronik ağrı modellerinde perifer ve santral (spinal ve supraspinal) seviyelerde CB1 ve CB2 reseptörlerinin aktivasyonu ile antinörisepitif ve anti-hiperaljezik etkileri olduğu iyi bilinmektedir (Guindon ve Hohmann, 2009; Starowicz ve diğ., 2013). Örneğin; non-spesifik CB reseptör agonisti WIN 55,212-2'nin sıçanlarda paklitakselin uygulanması ile indüklenen termal hiperaljeziyi ve dokusal alodinini azalttığı görülmüştür (Pascual ve diğ., 2005). Yapılan başka bir çalışmada CB agonisti HU210'in etkinliği sıçanlarda oluşturulan nörisepitif ve inflamatuvar ağrı modellerinde *in vivo* olarak değerlendirilmiştir. Selektif CB1 antagonisti olan AM281, HU210'un etkilerini hem nörisepitif hem de inflamatuvar hipersensitivite modellerinde tersine çevirmiştir. Selektif CB2 antagonisti SR144528 ise, HU210'un etkilerini yalnızca inflamatuvar hipersensitivite modelinde antagonize etmiştir. Ayrıca, CB2'nin rolünü daha da açıklığa kavuşturmak için, spesifik CB2 agonisti olan GW405833 de kullanılmış ve GW405833 hipersensitiviteyi inhibe ederek anti-inflamatuvar aktivite göstermiştir. Bu sonuçlardan hareketle araştırmacılar CB1 reseptörler nörisepitif ağrıda rol oynarken, CB1 ve CB2 reseptörlerin inflamatuvar hipersensitivitede rol oynadığını ifade etmişlerdir (Clayton ve diğ., 2002). Kannabinoidlerin söz konusu bu ağrı kesici özellikleri merkezi sinir sistemi, spinal kord/omurilik ve periferik sinir sisteminin katıldığı karmaşık bir mekanizmanın

etkileşimi ile düzenlenmektedir. Örneğin bir çalışmada gastrointestinal sistemde kannabinoidlerin visceral ağrı üzerindeki analjezik etkilerine periferik CB1 reseptörlerinin aracılık ettiği gösterilmiştir (Brusberg ve diğ., 2009). Başka bir çalışmada kemirgenlerde indüklenen inflamatuvar ağrıda CB2 reseptörlerinin C liflerindeki aktiviteyi azaltarak, dorsal boynuzdaki nöronal aktiviteyi bastırdığı gösterilmiştir (Nackley ve diğ., 2004). Ayrıca endojen opioidler, glutamat, serotonin gibi ağrı modülasyonunda rolü olan diğer sistemlerle de etkileşim içinde olduğu bilinmektedir (Fine ve Rosenfeld, 2013).

Yapılan bu tez çalışmasında protokateşik asitin analjezik etkisine kannabinoidlerjik sistem katılımını araştırmak için CB1 antagonisti AM251 ve CB2 reseptör antagonisti AM630 kullanılmıştır. Sonuçlara bakıldığında kuyruk-daldırma ve kıvrınma testinde CB1 antagonisti AM251 ön-uygulaması protokateşik asit ile indüklenen anlamlı analjeziyi anlamlı bir şekilde antagonize ederek önlemiştir. Buradan hareketle CB1 reseptör stimülasyonunun hem spinal hem de periferik analjeziye katkı sağladığı düşünülmüştür. Ayrıca kuyruk-daldırma testinde AM251 ile sağlanan geri dönüşün kıvrınma testinde gözlenen geri dönüşe göre daha belirgin olması, protokateşik asit analjezisinde spinal CB1 aracılıklı kannabinoidlerjik modülasyonun daha önemli derecede rol aldığını düşündürebilir. Fakat kıvrınma testinde AM251 varlığında gözlenen geri dönüş her ne kadar kuyruk-daldırma testinde gözlenen geri dönüşe göre daha az belirgin olsa da AM251 ön-uygulaması protokateşik asitin anlamlı etki göstermesini önlemiştir. Bu sonuç ise CB1 reseptör stimülasyonunun periferide de etkin bir şekilde protokateşik asit analjezisinde rol aldığını göstermektedir. Ayrıca kuyruk-daldırma testinde AM251 varlığında protokateşik asit etkisinin tam kaybolmaması etkinliğe kannabinoidlerjik sistemin yanısıra başka mekanizmaların da dahil olduğunu düşündürmektedir. WIN 55,212-2 uygulaması ile elde edilen analjezik etkinin kuyruk-daldırma ve kıvrınma testinde AM251 uygulaması ile geri dönerek kaybolmuş olması tüm çalışma sonuçlarının sağlıklı olduğunun anlaşılması açısından önemlidir. CB2 reseptör antagonisti AM630 ön-uygulaması ile alınan sonuçlara bakıldığında kuyruk-daldırma testinde gözlenen protokateşik asit etkisi devam etmekle birlikte anlamlı olarak antagonize olmuştur. Kıvrınma testinde ise benzer anlamlı geri dönüş gözlenememiş ve protokateşik asitin anlamlı analjezik etkisi tek başına uygulanıldığı zaman görülen analjezik etkiye benzer şekilde devam etmiştir. WIN 55,212-2

uygulamasý ile elde edilen analjezik etki de kuyruk-daldırma testinde anlamlý bir şekilde önlenerek kaybolmuş fakat kıvrınma testinde anlamlý olarak geri dönse de anlamlý analjezik etkisi devam etmiştir. Bu noktada kannabinoidlerjik CB2 stimölasyonunun protokatesik asit analjezisinin spinal organizasyonuna katkı sağladığı fakat periferel düzeyde etkin rol oynamadığı düşünölebilir. WIN 55,212-2 uygulaması ile gözlenen analjezik etkinin AM630 varlığında tam olarak kaybolmadığı ve ayrıca etkideki geri dönüşün kuyruk-daldırma testine göre nispeten daha az oluşu da göz önünde bulundurulduğunda; ağrıda CB1 stimölasyonunun CB2 stimölasyonuna göre ağırlıklı rolü olabileceğı ve sonuçların bu fizyolojiden etkilenmiş olabileceğı akla gelebilir.

Endokannabinoidlerin ve CB reseptör ligandlarının sağladığı analjezik etkilerinin daha çok nöronal eksitabilenin supresyonunu sağlayan CB1 reseptörler aracılığıyla ile sağlandığı bildirilmektedir (Barrie ve Manolios, 2017). CB1 reseptörlerinin anatomik dağılımı hem periferik hem de merkezi (spinal ve suprasipinal) seviyelerde ağrı algısını modüle etme işlevleri ile tutarlıdır (Manzanares ve diğ., 2006). CB2 reseptör tipine göre vücutta daha yaygın dağılım gösteren CB1 reseptörlerinin, özellikle supraspinal ve spinal ağrı bölgelerinde yoğunlaştığı ve farklı sistemlerle de etkileşerek ağrı kontrolü sağladığı ayrıca, periferel bölgedeki duysal terminallerde bulunan CB1 reseptörleri aracılığıyla da periferel analjezi sağladığı rapor edilmektedir (Barrie ve Manolios, 2017; Fine ve Rosenfeld, 2013; Russo, 2008). CB2 reseptörleri ise CB1 reseptörlerin aksine merkezi sinir sisteminden ziyade periferde daha yoğun ve nöral dokularda yok denecek kadar az miktarda bulunmakla beraber özellikle glia hücrelerinde, lenfoid dokularda ve immün sistem hücrelerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Fine ve Rosenfeld, 2013; Manzanares ve diğ., 2006; Pascual ve diğ., 2018; Russo, 2008). Dolayısıyla CB2 reseptörler üzerinden olan antinosisepsiyonun dolaylı yoldan gerçekleştiğı düşünölmektedir. Örneğın; yapılan bir çalışmada CB2 eksprese eden hücrelerden endorfin salımınının uyarıldığı ve böylece salınan endorfinin birincil afferent nöronların terminalleri üzerindeki opioid reseptörlerinde etkili olarak dolaylı yoldan antinosisepsiyon sağlandığı gösterilmiştir (İbrahim ve diğ., 2004). Bununla birlikte son veriler periferel birincil aferent nosiseptif nöronlar üzerinde CB2 reseptörlerinin ekspresyonunun varlığını göstermektedir (Beltramo, 2009; Valenzano ve diğ., 2005). Daha önce yapılan çalışmalardan anlaşılmaktadır ki CB1 reseptörler ve CB2 reseptörlerin stimölasyonu antinosiseptif etki sağlamakta fakat bu reseptör tiplerinin

lokalize olduğu hücreler ve anatomik dağılımları farklılık göstermektedir. Ayrıca periferel CB2 reseptör stim lasyonu CB1 stim lasyonu kadar antinosisepsiyon sağlayabilmektedir. Dolayısıyla bu noktada da bu tez çalışmasının deneysel koşullarında, kullanılan CB2 reseptör antagonisti AM630'un CB2 reseptör stim lasyonu üzerinden gerçekleşen antinosiseptif etkiyi antagonize edebilmek için dozunun yetersiz kalmış olabileceği akla gelebilir. Fakat bu düşüncenin doğrulanabilmesi için değişen antagonist dozlarıyla çalışmanın detaylandırılması gerekmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, birçok biyolojik etkisi gösterilen fakat biyolojik etkilerini gösterirken hangi fizyolojik süreçleri değiştirdiği ya da etkilediği tam olarak belirlenmemiş protokateşik asitin, farelerde gösterilen analjezik etkisine, ağrı kontrolünde etkin olarak rol oynayan kannabinoiderjik sistemin katılımı araştırılmıştır. Protokateşik asitin lokomotor aktiviteyi etkilemeyen dozlarda hem santral hem de perifer analjezik etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Protokateşik asitin çok düşük toksisiteye sahip bir antioksidan olduğu da göz önünde bulundurulduğunda, protokateşik asit ağrının eşlik ettiği rahatsızlıklarda tek başına veya yardımcı ilaç olarak güvenle kullanılabilecek doğal bir ajan olduğunu söylenebilir. Fakat hangi ağrı tiplerinde ne derecede etkin olabileceğini daha detaylı aydınlatabilecek olan çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca bu tez çalışmasıyla, protokateşik asitin analjezik etkisine kannabinoiderjik sistem modülasyonunun katkı sağladığı belirlenmiştir. Şöyle ki; protokateşik asitin analjezik etkisine kannabinoiderjik modülasyon periferden ziyade spinal seviyede katkı sağlamaktadır ve özellikle periferde olmak üzere her iki seviyede CB2 reseptör stimülasyonundan ziyade CB1 reseptör stimülasyonu aracılık ettiği söylenebilir. Fakat daha önce yapılan çalışmaların raporları, bu çıkarımın doğrulanabilmesi için değişen antagonist dozları ile çalışılması ihtiyacını doğurmuştur.

Protokateşik asitin etki ve etki mekanizmasının *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir birlikte, tez çalışmasından elde edilen veriler yeni tedavi yaklaşımlarına katkıda bulunacak prelinik veriler sunmaktadır.

KAYNAKÇA

- Alçın, E., Serhatlıoğlu, İ., Özcan, S., Ayar, A., Kutlu, S., Özcan, M., Keleştimur, H. (2010). Diyabetik Nöropatili Fare Modelinde Oksitosinin Analjezik Etkisinin Araştırılması. *Türkiye Klinikleri J. Neur.*, 5(3), 155-159.
- Arome, D., Sunday, A.I., Onalike, E.I., Amarachi, A. (2014). Pain and inflammation: Management by conventional and herbal therapy. *Indian Journal of Pain*, 28(1), 5-12.
- Arslan, R., Aydın, Ş., Nemutlu Samur, D., Bektaş, N. (2017). The possible mechanisms of protocatechuic acid-induced central analgesia. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26, 541–545.
- Aslan, F.E., Badır, A. (2005). Ağrı kontrol gerçeği: hemşirelerin ağrının doğası, değerlendirilmesi ve geçirilmesine ilişkin bilgi ve inançları. *Ağrı*, 17(2), 44–51.
- Aydın, O. N. (2002). Ağrı ve ağrı mekanizmalarına güncel bakış. *Adü tıp fakültesi dergisi*. 3 (2), 37-48.
- Babacan, A. (2011). Ağrı, ağrı yolları ve ağrılı hastaya yaklaşım. *Gazi üniversitesi tıp fakültesi yayınları*, 1-14.
- Bacanlı, M., Başaran, N., Başaran, A. (2012). İlaç-Bitkisel İlaç Kullanımının Toksikolojik Sonuçları. *Turkiye Klinikleri J Pharm Sci*, 1(2).
- Bar-Joseph, A., Fink, G., Richstein, A., Dar, D.E., Amselem, S., Bar-Ilan, A., Avidor, B., Yacovan, A., Meilin, S., Weksler, A., Berckovitch, Y. (2003). PRS-211,375, a novel selective CB2 receptor agonist, demonstrates analgesic activity in several animal models. *Society for Neuroscience*, Program No 909.5 New Orleans, Louisiana.
- Bar-Joseph, A., Meilin, S., Eliav, E., Weksler, A., Berckovitch, Y., Richstein, A., Avraham, A., Efroni, G., Yehezkel, L., Yacovan, A., Avidor, B., David, P. (2004). PRS-211,375, a novel CB selective cannabinoid receptor agonist demonstrates analgesic activity in two neuropathic pain model. *Society for Neuroscience*, Program No 225.12, San Diego, California.

Barrie, N., Manolios, N. (2017). The endocannabinoid system in pain and inflammation: Its relevance to rheumatic disease. *Eur J Pharmacol*, 4, 210-218.

Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S. (2001). Animal Models of Nociception. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 53(4), 593-643.

Bektaş, N., Arslan, R., Nemutlu, D. (2015). Protocatechuic acid is analgesic at central and peripheral levels in mice. *Proceedings of the 9th IBRO World Congress of Neuroscience* de sunulan poster, Brazil.

Bektaş, N., Arslan, R. (2017). The Involvement of NO–cGMP–ATP Sensitive K⁺ Channels Pathway in Protocatechuic Acid Peripheral Analgesia. *Indian Journal of pharmaceutical education and research*, 51(3), 355-358.

Beltramo, M. (2009). Cannabinoid Type 2 Receptor as a Target for Chronic Pain. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(1), 11-25.

Bennett, G. (2001). Animal models of pain. L., Kruger (Ed), *Methods In Pain Research* içinde (s. 67-93). CRC Press: New York.

Boussouf, L., Boutennoune, H., Kebieche, M., Adjeroud, N., Al-Qaoud, K., Madani, K. (2017). Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant effects of phenolic compound from Algerian *Mentha rotundifolia* L. leaves on experimental animals. *South African Journal of Botany*., 113, 77-83.

Breinholt, V. (1999). Desirable versus harmful levels of intake of flavonoids and phenolics acids. Kumpulainen, J., Salonen, J.E. (Eds.), *Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease* içinde (s. 93-105). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

Brusberg, M., Arvidsson, S., Kang, D., Larsson, H., Lindström, E., Martinez, V. (2009). CB1 Receptors mediate the analgesic effects of cannabinoids on colorectal distension-induced visceral pain in rodents. *Journal of Neuroscience*, 29(5), 1554–64.

Cazacu, I., Mogosan, C., Loghin, F. (2015). Safety issues of current analgesics: an update. *Clujul Med.*, 88(2), 128-36.

- Chang, L., Luo, L., Palmer, J.A., Sutton, S., Wilson, S.J., Barbier, A.J., Breitenbucher, J.G., Chaplan, S.R., Webb, M. (2006). Inhibition of fatty acid amide hydrolase produces analgesia by multiple mechanisms. *Br. J. Pharmacol.*, 148, 102–113.
- Clayton, N., Marshall, F.H., Bountra, C., Shaughnessy, C.T.O. (2002). CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. *Pain*, 96(3), 253-260.
- Clayton, N.M., Wilson, A.W., Collins, S.D., Giblin, G.M., Mitchell, B.L., Goldsmith, P., Chessell, I.P., O'Shaughnessy, C., Bountra, C. (2004). Anti-hypersensitive and anti-inflammatory activity of the potent and selective CB2 agonist GW842166X. *Proceedings of the British Pharmacological Society Winter Meeting*, University of Newcastle.
- Çınar R., Çınar Ö.(2012). Kannabinoid Tip 1 Reseptör (CB1) ve Terapötik Yaklaşımlara Genel Bakış-II. *MÜSBED*, 2(1), 1-8.
- Çınar R., Çınar Ö., (2011). Kannabinoid Tip 1 Reseptör (CB1) ve Terapötik Yaklaşımlara Genel Bakış-I, *MÜSBED*, 1(2), 149-154.
- Çöçelli, P.L., Bacaksız, D.B., and Ovayolu, N. (2008). Ağrı tedavisinde hemşirenin rolü. *Gaziantep tıp dergisi*, 14, 53-58.
- de Freitas, R.L., de Oliveira, R.C., de Carvalho, A.D., Felippotti, T.T., Bassi, De Oliveira, E. D., Schallenberger, C., Böhmer, A. E., Hansel, G., Fagundes, A. C., Milman, M., ... & Elisabetsky, E. (2016). Mechanisms involved in the antinociception induced by spinal administration of inosine or guanine in mice. *Eur J Pharmacol*, 772, 71-82.
- Demir Dikmen, Y., Yıldırım Usta, Y., İnce, Y., Türken Gel, K., Akı Kaya, M. (2012). Hemşirelerin Ağrı Yönetimi İle İlgili Bilgi, Davranış ve Klinik Karar Verme Durumlarının Belirlenmesi. *Çağdaş Tıp Dergisi*, 2(3), 162-172.
- Desroches, J., Charron, S., Bouchard, J.F., Beaulieu, P. (2013). Endocannabinoids decrease neuropathic pain-related behavior in mice through the activation of one or both peripheral CB1 and CB2 receptors. *Neuropharmacology*, 441-452.

Deveci, H.A., Nur, G., Kırpık, M.A., Harmankaya, A., Yıldız, Y. (2017). Fenolik Bileşik İçeren Bitkisel Antioksidanlar. *Fen Bilimleri Enstitü Dergisi*, 9(1), 26–32.

Dimitrios B. (2006). Sources Of Natural Phenolic Antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 505-512.

Duthie, G.G., Duthie, S.J., Kyle, J.A.M. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, 13, 79-106.

Elmes, S.J., Winyard, L.A., Medhurst, S.J., Clayton, N.M., Wilson, A.W., Kendall, D.A., Chapman, V. (2005). Activation of CB1 and CB2 receptors attenuates the induction and maintenance of inflammatory pain in the rat. *Pain*, 118(3), 327-35.

Fine, P., Rosenfeld, M. (2013). The Endocannabinoid System, Cannabinoids, and Pain. *Rambam Maimonides*, 4(4), 0-22.

Flores, J.A., El Banoua, F., Galan-Rodriguez, B., Fernandez-Espejo, E., (2004). 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.

G.S., Elias-Filho, D.H., Coimbra, N.C. (2004). Role of muscarinic and nicotinic cholinergic receptors in an experimental model of epilepsy-induced analgesia. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 79 (2), 367-376.

Godin, A.M., Araújo, D.P., César, I.C., Menezes, R.R., Brito, A.S., Melo, I.S., ... & Matsui, T.C. (2015). Activities of 2-phthalimidethyl nitrate and 2-phthalimidethanol in the models of nociceptive response and edema induced by formaldehyde in mice and preliminary investigation of the underlying mechanisms. *Eur J Pharmacol*, 756, 59-66.

Guindon, J., De Lean, A., Beaulieu, P. (2006). Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. *Pain*, 121(1-2), 85-93.

Guindon, J., Hohmann, A.G.(2009). The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 8(6), 403-421.

Gupta, M., Majumdar, S., Sasmal, S., Mukherjee, A. (2012). HPLC Profiles of Standard Phenolic Compounds Present in Medicinal Plants. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research.*, 4(3), 162-167.

Güleşci, N., Aygöl, İ. (2016). Beslenmede Yer Alan Antioksidan Ve Fenolik Madde İçerikli Çerezler. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1), 109-129.

Hanus, L., Breuer, A., Tchilibon, S., Shiloah, S., Goldenberg, D., Horowitz, M., Pertwee, R.G., Ross, R.A., Mechoulam, R., Fride, E. (1999). HU-308: A specific agonist for CB2, a peripheral cannabinoid receptor. *PNAS*, 96(25), 14228–14233.

Holt, S., Comelli, F., Costa, B., Fowler, C.J. (2005). Inhibitors of fatty acid amide hydrolase reduce carrageenan induced hind paw inflammation in pentobarbital-treated mice: comparison with indomethacin and possible involvement of cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 146, 467–476.

Ibrahim, M.M., Porreca, F., Lai, J., Albrecht, P.J., Rice, F.L., Khodorova, A., Davar, G., Makriyannis, A., Vanderah, T.W., Mata, H.P., Malan, P. (2004). CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *PNAS*, 102(8), 3093-3098.

İbiloğlu, A.O., Atlı, A., Güneş, M. (2017). Sentetik Kannabinoidler. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, 9(3), 317-328.

Jhaveri, M.D., Richardson, D., Kendall, D.A., Barrett, D.A., Chapman, V. (2006). Analgesic effects of fatty acid amide hydrolase inhibition in a rat model of neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience*, 26, 13318–13327.

Jinsmaa, Y., Fujita, Y., Shiotani, K., Miyazaki, A., Li, T., Tsuda, Y., Okada, Y., Ambo, A., Sasaki, Y., Bryant, S.D., Lazarus, L.H. (2005). Differentiation of opioid receptor preference by [Dmt1]endomorphin-2-mediated antinociception in the mouse. *Eur J Pharmacol*, 509, 37-42.

Kakkar, S., Bais, S. (2014). A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacology*,1- 9.

Karbarz, M.J., Luo, L., Chang, L., Tham, C.S., Palmer, J.A., Wilson, S.J., Wennerholm, M.L., Brown, S.M., Scott, B.P., Apodaca, R.L., Keith, J.M., Wu, J.J., Breitenbucher, J.G., Chaplan, S.R., Webb, M. (2009). Biochemical and Biological Properties of 4-(3-phenyl-[1,2,4]thiadiazol-5-yl)-piperazine-1-carboxylic acid phenylamide, a Mechanism-Based Inhibitor of Fatty Acid Amide Hydrolase. *Anesthesia and Analgesia*, 108, 316–329.

Kehl, L.J., Hamamoto, D.T., Wacnik, P.W., Croft, D.L., Norsted, B.D., Wilcox, G.L., Simone, D.A. (2003). A cannabinoid agonist differentially attenuates deep tissue hyperalgesia in animal models of cancer and inflammatory muscle pain. *Pain*. 103(1–2), 175–186.

Kılıç, Z. (2009). *İnmeli Hastalarda Santral Ağrı Değerlendirmesi*. Uzmanlık Tezi. İstanbul: Sağlık Bakanlığı İstanbul Fizik Tedavi Ve Rehabilitasyon Eğitim Ve Araştırma Hastanesi.

Kolaç, T., Gürbüz, P., Yetiş, G. (2017). Doğal Ürünlerin Fenolik İçeriği Ve Antioksidan Özellikleri. *İ.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, 5(1), 26-42.

Krzysztoforska, K., Mirowska-Guzel, D., Widy-Tyszkiewicz, E. (2017). Pharmacological effects of protocatechuic acid and its therapeutic potential in neurodegenerative diseases: Review on the basis of in vitro and in vivo studies in rodents and humans. *Nutritional neuroscience*, 1-11.

LaBuda, C.J., Koblish, M., Little, P.J. (2005). Cannabinoid CB2 receptor agonist activity in the hindpaw incision model of postoperative pain. *Eur. J. Pharmacol.*, 527, 172-174.

Lende, A., Kshirsagar, A., Deshpande, A., Muley, M., Patil, R., Bafna, P.(2011). Anti-inflammatory and analgesic activity of protocatechuic acid in rats and mice. *Inflammopharmacology*, 19(5), 255-263.

Lin, C.Y., Huang, C.S., Huang, C.Y., Yin, M.C. (2009). Anticoagulatory, Antiinflammatory, and Antioxidative Effects of Protocatechuic Acid in Diabetic Mice. *J. Agric. Food Chem*, 57(15), 6661–6667.

Liu, C.L., Wang, J.M., Chu, C.Y., Cheng, M.T., Tseng, T. (2002). In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol*, 40(5), 635-641.

Manning, B.H., Merin, N.M., Meng, I.D., Amaral, D.G. (2001) Reduction in opioid- and cannabinoid-induced antinociception in rhesus monkeys after bilateral lesions of the amygdaloid complex. *The Journal of Neuroscience*, 21(20), 8238–8246.

Manzanares, J., Julian, M., Carrascosa, A. (2006). Role of the Cannabinoid System in Pain Control and Therapeutic Implications for the Management of Acute and Chronic Pain Episodes. *Curr Neuroparmacol*. 4(3), 239–257.

Marazioti, A., Spyraiki, C., & Thermos, K. (2009). GABA antagonists reverse the somatostatin dependent attenuation of rat locomotor activity. *Neuropeptides*, 43(3), 207-212.

Marzo, V., Petrosino, S. (2007). Endokannabinoidler ve sağlık ile hastalıktaki seviyelerinin düzenlenmesi. *Current Opinion in Lipidology*, 2(2), 101-115.

Masella, R., Santangelo, C., Archivio M. D., LiVolti, G., Giovannini, C., Galvano, F. (2012). Protocatechuic Acid and Human Disease Prevention: Biological Activities and Molecular Mechanisms. *Current Medicinal Chemistry*, 19, 2901-2917.

Mattila, P., Hellström, J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 152-160.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almong, S., Martin, B.R., Compton, D.R. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*; 50, 83-90.

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

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

Mizoguchi, H., Takagi, H., Watanabe, C., Yonezawa, A., Sato, T., Sakurada, T., Sakurada, S. (2014). Involvement of multiple μ -opioid receptor subtypes on the presynaptic or postsynaptic inhibition of spinal pain transmission. *Peptides*, 51, 15-25.

Nackley, A.G., Zvonok, A.M., Makriyannis, A., Hohmann, A.G. (2004). Activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses C-fiber responses and windup in spinal wide dynamic range neurons in the absence and presence of inflammation. *J Neurophysiol*, 92, 3562–74.

Nichenametla, S.N., Taruscio, T.G., Barney, D.L., Exon, J.H. (2006). A Review Of The Effects And Mechanisms Of Polyphenolics In Cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 161-183.

Njume, C., Afolayan, A.J., Ndip, R.N. (2009). An overview of antimicrobial resistance and the future of medicinal plants in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *African Journal of Pharmacy and Pharmacol*, 3(13), 685-699.

Ohta, H., Ishizaka, T., Tatsuzuki, M., Yoshinaga, M., Iida, I., Yamaguchi, T., Tomishima, Y., Futaki, N., Toda, Y., Saito, S. (2008). Imine derivatives as new potent and selective CB2 cannabinoid receptor agonists with an analgesic action. *Bioorg. Med.*, 16, 1111-1124.

Özütemiz, M., (2015). *Postoperatif ağrı yönetiminin kalitesinin değerlendirilmesinde quips anketi yönteminin kullanımı*. İstanbul: Maltepe Üniversitesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı.

Pagotto, U., Pasquali, R. (2006). Endokannabinoid yolun metabolizma ve diyabetteki rolü. *Türkiye klinikleri*, 1(2).

Pascual, D., Goicoechea, C., Suardiaz, M., Martin, M. I. (2005). A cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, reduces neuropathic nociception induced by paclitaxel in rats. *Pain*, 118(1-2), 23-34.

- Pascual, D., Sanchez-Robles, E.M., Garcia, M.M., Goicoechea, C. (2018). Chronic pain and cannabinoids. Great expectations or a christmas carol. *Biochemical Pharmacology*, 157, 33–42.
- Pinho-Ribeiro, F. A., Zarpelon, A. C., Fattori, V., Manchope, M. F., Mizokami, S. S., Casagrande, R., Verri Jr, W. A. (2016). Naringenin reduces inflammatory pain in mice. *Neuropharmacology*, 105, 508-519.
- Proestos, C., Kapsokafalou, M., Komaitis, M. (2008). Analysis Of Naturally Occurring Phenolic Compounds In Aromatic Plants By Rp-Hplc And Gc-MS After Silylation. *Journal of Food Quality.*, 31(3), 402-414.
- Quartilho, A., Mata, H.P., Ibrahim, M.M., Vanderah, T.W., Porreca, F., Makriyannis, A., Malan, T.P. (2003). Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology*, 99(4), 955-960.
- Raj, P.P. (2000) Ağrı taksonomisi. S. Erdine (Ed), *Ağrı* içinde (s. 12-18). İstanbul: Alemdar Ofset.
- Russo, E.R. (2008). Cannabinoids in the management of difficult to treat pain. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(1), 245–259.
- Saatçioğlu, A.T. (2008). *Abdominal cerrahilerde epidural uygulanan bupivakain ile levobupivakainin etkilerinin karşılaştırılması*. Uzmanlık tezi. İstanbul: Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği.
- Saibabu, V., Fatima, Z., Khan, L.A., Hameed, S. (2015). Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids. *Advances in Pharmacological Sciences*, 1-10.
- Sakin, S.Y., Doğrul, A., Kekilli, M., Tanoğlu, A., Uygun, A., Bağcı. (2015). Endojen Kannabinoid Sistem ve Gastrointestinal Kanal Üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri J Gastroenterohepatol*, 22(1), 7-14.
- Schaible, H. (2007). Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Handb Exp Pharmacol*, 177, 3-28.
- Schmauss, C., Yaksh, T.L. (1984). 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, 1-12.

Semaming, Y., Pannengetch, P., Chattipakorn, S., Chattipakorn, N. (2015). Pharmacological Properties of Protocatechuic Acid and Its Potential Roles as Complementary Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-11.

Sen, S., Chakraborty, R., De, B., Ganesh, T., Raghavendra, H.G., Debnath, S. (2010). Analgesic And Anti-Inflammatory Herbs: A Potential Source Of Modern Medicine. *IJPSR*, 1(11), 32-44.

Shahidi, F., Nazck, M. (1995). *Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications*. Lancaster: A Technomic Publishing Company.

Shin, K., Kim, I., Park, Y., Ha, J., Choi, J., Park, H., Lee, Y.S., Lee, K. (2004). Antiinflammatory 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.

Starowicz, K., Malek, N., Przewlocka, B. (2013). Cannabinoid receptors and pain, *WIREs Membr Transp Signal*, 2, 121–132.

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

Süzer, Ö. (2005). Premium Farmakoloji, Klinisyen Tıp Kitapevleri, Ankara, 241-534.

Tsai, S., Yin, M. (2012). Anti-glycative and anti-inflammatory effects of protocatechuic acid in brain of mice treated by D-galactose. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 3198–3205.

Tüfekçi Alphan, E., Yılmaz, N. (2007). Endokanabinoid sistemin, enerji metabolizması ve obeziteye etkisi. *Marmara tıp dergisi*, 20(3), 202-214.

Uludağ, M.O. (2017). Deneysel ağrı, inflamasyon ve sepsis modelleri. Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi, Ankara, Türkiye.

Ulugöl, A., Özyigit, F., Yeşilyurt, O., Doğrul, A. (2006). The additive antinociceptive interaction between WIN 55,212-2, a cannabinoid agonist, and ketorolac. *Anesth Analg.*, 102(2), 443-447.

Uyar, M., Köken, İ. (2017). Kronik ağrı nörofizyolojisi. *TOTBİD Dergisi*, 16, 70–76.

Valenzano, K.J., Tafesseb, L., Leeb, G., Harrisona, J.E., Bouleta, J.M., Gottshalla, S.L., Marka, L., Pearsona, M.S., Millera, W., Shana, S., Rabadic, L., Rotshteync, Y., Chaffera, S.M., Turchina, P.I., Elsemorea, D.A., Totha, M., Koetznera, L., Whitesidea, G.T. (2005). Pharmacological and pharmacokinetic characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy. *Neuropharmacology*, 48, 658-672.

Wei, M., Chu, X. ve diğ, Protocatechuic acid suppresses ovalbumin-induced airway inflammation in a mouse allergic asthma model, Volume 15, Issue 4 (2013), Pages 780-788.

Wilson, A.W., Clayton, N.M., Medhurst, S.J., Bountra, C., Chessell, I.P. (2005). The FAAH inhibitor URB597 reverses inflammatory pain through a CB1 receptor mediated mechanism. *Proceedings of the British Pharmacological Society Winter Meeting*, University of Newcastle.

Woodhams, S.G., Chapman, V., Finn, D.P., Hohmann, G.A., Neugebauer, V. (2017). The Cannabinoid System and Pain. *Neuropharmacology*, 124, 105–120.

Xie, W. (2011). Assessment of pain in animals. C. Ma ve J. M. Zhang, (Eds.) *Animal Models of Pain* içinde (s. 1-22). New York: Humana Press, c/o Springer Science and Business Media LLC.

Yakup, K., (2008). *Çörekotu (nigella sativa l.) tohumunun doğal antioksidan ve alternatif enerji kaynağı olarak incelenmesi*. Doktora Tezi. Konya: Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Yao, H.M., Wang, G., Liu, Y.P., Rong, MQ, Shen, C.B., Yan, X.W., Luo, X.D., Lai, R. (2016). Phenolic acids isolated from the fungus *Schizophyllum commune* exert analgesic activity by inhibiting voltage-gated sodium channels. *Chin J Nat Med.*, 14(9), 661-670.

Yıldızeli Topçu, S. (2008). *Üst abdominal cerrahi girişim uygulanan hastalarda hemşireler tarafından öğretilen gevşeme tekniklerinin ağrı kontrolü üzerine etkisi*. Yüksek Lisans Tezi. Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü .

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

http-1: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3136186/> (Erişim tarihi: 02.12.2018)