

AĞRI ARAŞTIRMALARINDA KULLANILAN HAYVAN MODELLERİ

Feyza ARICIOĞLU*

GİRİŞ:

DeneySEL ağrı araştırmalarında amaç ya ağrının özelliklerini, doğasını açıklamaktır yada herhangi bir maddenin ağrının algılanması üzerine olası etkisinin araştırılmasıdır. Hayvanlarda ağrı eşiğinin ve analjezinin değerlendirilmesi oldukça zordur. Ağrı kavramının tek başına subjektif olmasının dışında hayvan davranışı ile ilişkilendirilmesi hala yeterince tanımlanabilmiş değildir. Sözlü olarak kendini ifade edemeyen hayvan benzer durumlarda benzer motor davranışlarla kendini ifade edecektir. Yanıt çoğu kez basit bir refleks, bazen vokalizasyon veya kaçma olabilir. Bizim için önemli olan bu davranışları doğru değerlendirerek hayvanın ağrısı ne zaman algıladığını tesbit edebilmektir.

Ağrı araştırmalarında insandan sonra en çok kullanılan sıçan ve farelerdir. Fare çalışmalarının bir bölümü transgenik manipulasyonlarla (knock-out) üretilen farelerin ağırlı uyarana verdikleri yanıtın farklılığını araştırmaya yöneliktir (1).

Deney hayvanlarıyla yapılan araştırmalarda hayvana yaklaşımın önemi unutulmamalıdır. Deney hayvanının deneyden belli bir süre önce deney ortamına getirilmesi, hayvanın "ellenmeye" alışması son derece önemlidir. Ayrıca deney hayvanının inbred olması, cinsiyeti ve yaşı (genellikle 6-8 haftalık olmaları önerilir) deneyin güvenilirliği açısından önemlidir. Unutulmamalıdır ki stres tek başına ağrı eşiğini değiştiren bir faktördür (strese bağlı analjezi). Strese bağlı olarak sadece endojen opioidlerin salınımı artmakla kalmayacak, hayvanın vücut ısısı, plazma glukoz düzeyi de değişecektir (2). Araştırmacı deney sonuçlarını etkileyebilecek tüm faktörleri bilmelidir. Ayrıca araştırmacının ne zaman hangi testi seçmesi gerektiğini bilmesi ve seçtiği modeli, özelliklerini, yeterince gözlemleyebilecek kadar yani doğru değerlendirebilecek kadar tanınması da şarttır. Diğer davranış deneylerinde olduğu gibi ağrı modeli oluşturmak için kullanılacak deney hayvanlarının ve yaşadıkları koşulların da standart olması gereklidir. Dişi hayvanlardaki gebelik olasılığı ve menstrüasyonun özellikle davranışla ilgili parametrelerle doğrudan etkileşmesi erkek hayvanların kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. Deney hayvanlarının barındırıldığı koşulların standardizasyonu da hem etik bir zorunluluktur hem de yapılacak deneysel çalışmaların bilimsel kalitesini doğrudan etkileyen bir faktördür. Çalışmaların uluslararası standartlara uygun yapılabilmesi için deneklerin dış etkenlere karşı izole edilmiş,

12 saat aydınlık-12 saat karanlık siklusu otomatik olarak ayarlanabilen, ısı yaklaşık 20 °C ve nemi yaklaşık % 60 civarında sabit tutulabilen laboratuvarında barındırılmaları. Hiç şüphesiz araştırmacının bilgisi ve gerekli koşullara özeni deneysel ağrı modellerinin güvenilirliğini ve elde edilen sonuçların yararını arttıracaktır (3-7).

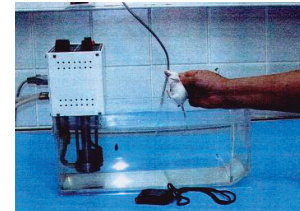
NOSİSEPSİYON VE ANALJEZİ TESTLERİ:

A. Termal uyarının kullanıldığı testler

Tail flick ve tail immersiyon testleri:

Tail flick testi ilk kez D'Amour ve Smith tarafından 1941 de (8), tail immersiyon testi ise Ben-Bassat tarafından 1959'da (9) tanımlanmış olmasına rağmen hala en çok kullanılan testlerdir. Test fare için de sıçan için de kullanılabilir. Tail flick testinde hayvanın kuyruğunda belirli bir noktaya bir lamba aracılığıyla ısı uygulanır. Kuyruğun konulduğu alanın altında bir fotosensör vardır. Radyant ısı kuyruğun belli bir bölümüne uygulanır ve hayvan ağrısı hissettiği an kuyruğunu çeker, fotosensör aracılığıyla devre kapanır. Uygulamanın başladığı andan kuyruğun ısı uygulanan noktadan çekilmesine kadar geçen süre tesbit edilir. Kuyruk çekme süresi olarak değerlendirilen bu basit spinal refleks o hayvanın ağrı eşiğini belirler ve analjezik uygulanması (örn opioid analjezik) bu süreyi anlamlı bir biçimde uzatır. Test direkt ağrı ölçümünden çok spinal no-siseptif refleksin değerlendirilmesinde kullanılır. Bir farenin normal reaksiyon süresi ortalama 2 ila 10 saniye arasında değişir. Doku hasarına sebep olacağı için radyant ısının 20 saniyeden fazla uygulanması tavsiye edilmez. Bu nedenle uygulama için mutlaka bir sonlandırma süresi (cut-off time) belirlenmelidir. Yöntemin en büyük avantajı basit olması ve reaksiyon süresinin çok fazla bireysel değişkenlik göstermemesidir (10).

Tail immersiyon testinde ise hayvanın kuyruğu bir termostat vasıtasıyla sabit ısıda tutulan suya (veya prensip olarak <0°C'da sıvı olarak kalabilen herhangi bir solüsyona) batırılır. Kuyruğun sıcak suya batırılması bir kaç saniye içinde kuyruğun bazen de tüm bedeninin çekilmesi ile sonlanır (Şekil 1). Tail



Şekil 1. Tail immersiyon test düzeneği

* Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi ve Psikofarmakoloji Araştırma Birimi Başkanı

flick testinde olduğu gibi reaksiyon süresi hayvanın ağrı eşiğini belirler. Bu test sıçan ve fare dışında maymunlara da uygulanabilir. Ayrıca bazı araştırmacılar testi sıcak yerine soğuk uygulayarak da yapmışlardır. Bu testin tail flick testinden en büyük farkı ve avantajı düşük ısılarda da çalışılabileceği için düşük analjezi potansiyeli olan ilaçlar için de kullanılabilirliğidir.

Hot-plate testi:

İlk kez Woolfe ve MacDonald tarafından 1944'de (11) tanımlanmış olmasına rağmen en çok 1953'de Eddy ve Leimbach (12) tarafından tanımlanan modifiye formu kullanılmaktadır. Hot-plate testi rodentlerin ağrı eşiğinin değerlendirilmesinde hala en çok kullanılan yöntemlerdendir. Temel olarak 50-56 °C'ye ısıtılmış bir yüzeyden (bakır veya alüminyum) oluşur. Hayvanın ısıtılan yüzey üzerinde belli bölge sınırlarında kalması için hareket kabiliyetini sınırlamayacak büyüklükte cam veya pleksiglas silindireler kullanılır. Yüzeye farenin bırakılmasından hayvanın arka ayağını çekmesine kadar geçen süre tesbit edilir (Şekil 2).



Şekil 2. Hot plate test düzeneği.

ceği gibi ayak çekme ve yalama, tekmeleme, sallama, dans etme veya sıçrama şeklinde olabilir. Daha az sıklıkla hayvan sadece ön ayaklarını yalayabilir veya ön ayaklarla başlayan reaksiyon arka ayağın yalanmasıyla sonlanabilir. Bir farenin normal reaksiyon süresi ortalama 5 ila 20 saniye arasında değişir. Doku hasarına sebep olacağı için test 30 saniyeden fazla uygulanmamalıdır. Yöntemin en büyük dezavantajı reaksiyon süresinin çok fazla bireysel değişkenlik göstermesidir (13).

Opioid analjezikler gibi güçlü analjezik etkili maddeler çalışılırken ısı düşürülebilir (42-43°C) yada 43°C'den 52°C'ye yavaş yavaş geçilir (2.5°C/dak). Düşük ısıda çalışmak analjezik etkinin tesbit edilme olasılığını artırmakla birlikte bireysel değişkenliği de artıracığı için istatistik değerlendirme daha güç olacaktır. Deney için ideal ısı ilk reaksiyon süresine göre de değiştirilebilir. Platform üzerindeki fare davranışı stereotiptir, bu sıçanda daha karmaşıktır. Bugüne kadar tanımlanmış 12 farklı davranış vardır. Bu nedenle de sıçanın davranışı "kaotik savunma hareketleri" (chaotic defensive movements) olarak adlandırılır (14).

Hot-plate testinde ayak çekme refleksi spinaldir, fakat modülasyonu supraspinaldir. Dolayısıyla testin sadece supras-

pinal düzeyde ağrı değerlendirmesi için kullanıldığını kabul etmek doğru olmayacaktır.

Soğuk uyaran testi:

Akut ağrı deneylerinde soğuk nadiren kullanılır. Diğer yandan kronik ağrı/nöropatilerde soğuk uyaran kullanımı yaygındır. Genel olarak kuyruğun soğuk suya batırılması veya hayvanın soğuk platforma bırakılması ile gerçekleştirilir.

B. Mekanik uyarının kullanıldığı testler

Ayak çekme testi (Paw withdrawal/ paw pressure test):

Temelde mekanik uyaran yardımıyla ağrı eşiğinin belirlenmesinde kullanılır. Enflamasyon vb etkenlere bağlı olarak hiperaljezinin geliştiği durumlarda idealdir. 1957 yılında Randall ve Selitto tarafından geliştirilmiştir (15). Mekanik uyaran hayvanın pençesine (metatarsallar arasında bir noktaya) uygulanır. Bir pedal yardımıyla giderek artan oranda basınç uygulanır (Şekil 3). Uygulamanın sonlandırılma noktası süre değil hayvanın göstereceği tepki davranışdır. Temel yanıt vokalizasyondur, çoğu kez vokalizasyona ayak çekme davranışı da eşlik eder. Bu model ağrı duyarlılığının çok fazla değişmediği akut ağrı deneyleri kadar kronik ağrı, nöropati ve uzun süreli enflamasyonun eşlik ettiği hiperaljezi durumlarında da kullanılabilir. Yöntem genel olarak sağlıklı ayak ile enflamatuvar maddenin injekte edildiği ayak arasındaki farkı tesbit etmeyi amaçlar. Yöntemin duyarlılığı ile ilgili şüpheler olmasına karşın hala sözkonusu deneyler için en fazla kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemin en büyük dezavantajları:

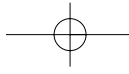


Şekil 3. Randel- Selitto test düzeneği

- Deneyin farklı zaman dilimlerinde tekrarlanması hayvanın ağrılı uyarana duyarlılığını artırabilir.
- Uygulanan uyarının yoğunluğunu ölçmek bazen zor olabilir.
- Relatif olarak yüksek basıncın uygulanması gerektiği durumlarda uygulanan ilacın etkinliğini tesbit etmek zor olabilir.
- Yanıtlar oldukça yüksek bireysel farklılık gösterebilir.

Kuyruk sıkıştırma testi (Tail Pinch/Tail clip test):

Haffner tarafından 1929'da tanımlanmıştır (16). Temel prensipler ve hayvanın olası davranışları açısından ayak çekme testi gibidir. Uygulanan basıncın büyüklüğüne bağlı olarak ya çok kısa sürede (<2 saniye) yada daha uzun sürede (eğer analjezi söz konusuysa) kuyruğa/klipse tepki (örneğin ısırma) gösterir. Araştırmada farklı şiddette uyarı sağlayan farklı klipsler kullanılabilirliği gi-



030 | AĞRI ARAŞTIRMALARINDA KULLANILAN HAYVAN MODELLERİ

bi, belli bir klipsle eşik/eşik üstü süre tesbit edilebilir. Eşik değer sıçan için 10-178g, fare için ise 71-1070g arasında bir değerdir.

C. Kimyasal uyarının kullanıldığı testler:

Karın germe/kıvrınma (Writhing) testi:

1950'lerde tanımlanmış ve sıklıkla kullanılmış bir testtir. En çok fenilkinon veya asetik asit (% 0.6-% 0.9) kullanılır. Kıvrınma injekte edilen maddeye karşı doğal refleks olarak meydana gelir, Temel davranış karın kaslarının kasılması ve onu izleyen arka ayaklarda ekstansiyondur. Abdominal kasılmalar injeksiyondan birkaç dakika sonra başlar, 5-10 dakikada maksimuma ulaşır. Pek çok araştırmada süre 30 dakika ile sınırlandırılmıştır. Daha çok zayıf analjezi potansiyeli olan maddelerin etki gücünü tesbit etmekte kullanılır (17,18).

Bu yöntemin en önemli dezavantajı seçici olmayışıdır, insanlarda analjezik olmayan bir çok ilaç bu testle etkili bulunabilir. Ayrıca kullanılan fare suşuna bağlı olarak asetik asitin ED50 değeri büyük değişkenlik gösterir (50-200 mg/kg) (19).

Formalin testi:

1977'de Dubuisson ve Dennis tarafından kedi ve sıçanlar için geliştirilmiş daha sonra farelere de uyarlanmıştır (20). En çok kullanılan kimyasal uyarandır. Yüzde 37'lik formalin solüsyonu subkutan olarak arka ayağın dorsal veya ventral yüzeyine injekte edilir. Bu miktar faredede oldukça değişkenlik gösterir (%0.02-%5). İnjesiyon hacmi 20-25 ml'dir. Enflamasyon oluşturan karragenin, serotonin, kolin, platelet aktive edici faktör ve hardal yağı gibi maddelerde aynı biçimde kullanılabilir. İnjesiyonu izleyen temel davranış hayvanın ayağını yalanması ve/veya ısırmasıdır (21).

Formalin yanıtı iki aşamalıdır. Erken/akut faz injeksiyondan hemen sonra başlar ve 5-10 dakika sürer. Geç/tonik faz ise injeksiyondan yaklaşık 15 dakika sonra başlar ve bir saat kadar sürer. Erken fazda nosiseptörlerin kimyasalla direkt uyarılması sözkonusudur, geç faza enflamasyon da eşlik eder. İki faz arasında kalan süre ise spinal ve supraspinal düzeyde aktif inhibisyona bağlı olarak gerçekleştiği kabul edilen fazdır. Pek çok sayıda araştırmanın konusu bu iki faz arasındaki anatomik, nörokimyasal ve farmakolojik farktır. Bu modelin en büyük özelliği iki farklı tipte uyarının aynı çalışma içerisinde değerlendirilmesine imkan sağlamasıdır (21).

NÖROPATİK AĞRI MODELLERİ

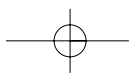
Hayvanlarda geliştirilen ilk ağrılı nöropati modeli, 1979'da Wall ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (22). Nöroma modeli olarak adlandırılan bu teknik, siyatik ve safen sinirlerin tam seksiyonu ile oluşturulmuştur. Nöropatik ağrıda hayvan modelleri periferik veya santral sinir sistemi hasarını takiben gelişen nörolojik disfonksiyon mekanizmalarının kavranmasına yardımcı olmuştur (23). Söz konusu araştırmalar sinir hasarına bağlı gelişen nöropatik ağrı modellerinin yanı sıra, pro-enflamatuar

sitokinlerin injeksiyonu ile oluşturulan ağrı modellerinin nöropatik ağrı ile ilişkilerinin irdelenmesi gibi mekanizmaya yönelik bilgileri de içerir. Bu araştırmalarda elde edilen bilgiler nöropatik ağrı kontrolünde sitokinleri de kapsayan yeni tedavi modalitelerinin geliştirilmesini sağlar (23, 24). Bu alanda geliştirilen bazı modeller nöropatik ağrı tedavisinde kullanılan farklı gruplarda ilaçların, belirgin elektrofizyolojik ve davranışsal etkilerinin ortaya konmasını da sağlar (23, 25). Bununla beraber periferik sinir hasarı ile oluşturulmuş hayvan deneyleri ile insanlarda izlenen klinik travmatik nöropati arasında farklılıklar olması, bu araştırmaların sonuçlarını değerlendirmede şüphelere yol açması bakımından önemlidir. Bu deneylerde hayvanlarda izlenen davranış bozuklukları ve geri çekme reflekslerinde artış, periferik ağrılı nöropati gelişen insanlarda ender olarak gözlenir. Ağrılı periferik nöropatinin insanlarda izlenen en temel bulgusu ağrıdan çok hissizlik, karıncalanma ve parestezidir. Aslında hayvanlarda izlenen bulgular da ağrıdan bağımsız olarak sensoryal iletideki patofizyolojik değişimlerin bir yansıması olabilir. Bu nedenle hayvanlarda ağrı benzeri davranışlar ve geri çekme refleksleri insanlarda izlenen spontan ve uyarı sonucu ağrının eş değeri olarak kabul edilmemelidir (23,26-28). Parestezi ve dizestezi hisleri de hayvanlarda ağrı benzeri kaçınma ve korunma davranışlarına yol açabilir. Bu nedenle nöropatik ağrı modellerinin ve izlenen hayvan davranışlarının iyi bilinmesi ve yorumların algolog, temel bilim uzmanı, klinik bilimci tarafından oluşturulan multidisipliner gruplar tarafından yapılması önerilmektedir.

Hayvan araştırmalarında sürdürülen nöropatik ağrı modelleri total ve parsiyel denervasyon, santral sinir sistemi ve sistemik ilaç uygulamaları ile geliştirilen modeller olarak sınıflandırılabilir.

Total ve parsiyel denervasyon ile oluşturulan nöropatik ağrı modelleri

Total periferik nörektomiye bağlı nöropati: Deneylerde sıçan veya nadiren fare kullanılır. Uygulamada siyatik sinir orta uyluk seviyesinde açığa çıkartılır. Siyatik sinir trifurkasyonun proksimalinden 3.0 – 5.0 dikiş materyali (katküt) ile sıkıca bağlanır. Sinir bağlandığı alanın distalinden kesilir (22). Nörektomi uygulamalarında siyatik sinir krioprobe ile dondurulabilir veya elektrokoter, makas (26, 27), bisturi (29,30) ile kesilir. Böylece bu uygulamada arka pençenin tam denervasyonu gelişir. Uygulamada meydana getirilen oluşum, bir nöroma modeli olarak da değerlendirilir. Klinikte deneklerde gelişen durumun insanda ampütasyon sonrası görülen fantom ağrısı veya sağlam bir ekstremitenin transeksiyonu sonrası oluşan ağrının (anestesi dolorosa) benzeri olduğu düşünülmüştür. Bu modelin en karakteristik özelliği, ototomi oluşmasıdır. Ototomi, denğin sinir transeksiyonu uygulanan taraftaki arka pençesini çiğneme ile koparması anlamına gelmektedir ve sıklıkla spontan ağrı ya da dizestezide oluşmaktadır. Ancak ağrı duyarlılığına verilen yanıtın her zaman ototomi davranışı olmayışı, bu nöroma modelinin kullanımını kısıtlayan



nedenlerden en önemlisidir. Ayrıca komşu sinir olan safen sinir siyatik alanına uzanır ve hiperaljezi ve allodini için sinir oluşturur. Aynı zamanda kontralateral tarafta da duyarlılıkta değişimler saptanabilir. Safen sinirine de benzer şekilde nörektomi uygulanabilir. Bunun sonucunda ototomi alanı genişler ve pençede allodini ve hiperaljezi sınır hattı bulunmaz.

Siyatik sinirin total kesisi ve yeniden dikilmesini takiben gelişen nöropati modeli: Sinirin makasla kesilip hemen sonra 7.0 veya daha ince dikiş malzemesiyle epinöral kılıf uç uca getirilerek dikilmesiyle oluşur. Bu uygulamaya alternatif olarak geliştirilen bir diğer modelde kesilen siyatik sinirin distali siyatik sinirin dalı olan tibiyal sinirle birleştirilir. Uygulamayı takiben erken dönemde pençede parsiyel denervasyon gelişir. Ayrıca ototomi, hiperaljezi, allodini sınırı ve kontralateral duyuşal değişimler izlenir. Olguların % 75'inde zamanla siyatik sinir liflerinde rejenerasyon başlar ve buna bağlı olarak pençede duyarlılık değişimlerinin oluştuğu alanlarda düzelmeler saptanabilir. (22)

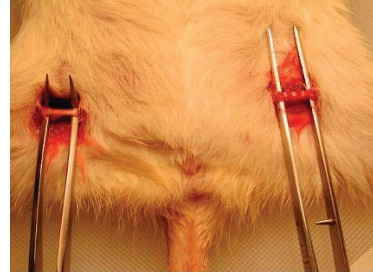
Total siyatik sinir ezilmesine bağlı gelişen nöropati modeli: Kömür tozuna batırılan dişsiz penset veya forseps tarafından siyatik sinirin 2 mm'lik bir alanı, ezilme hasarı oluşturmak üzere iki kez 30 saniyelik periyodlarla sıkıştırılır (31). Epinöriumda uzun süre kalan kömür partikülleri sinir hasarı gelişen alanı işaretler. Bu işaretleme kömür partikülleri yerine 10.0 dikiş materyali ile tek epinöral dikiş ile gerçekleştirilebilir. Aynı zamanda diğer tarafta bulunan siyatik sinir ortaya çıkarılarak aynı alana yalancı operasyon olarak benzer işaret konulur. Sinir hasarının oluşturulduğu tarafta ender olarak birkaç gün süren ototomi ve hiperaljezi izlenebilir. Total siyatik sinir dondurulmasına bağlı nöropati modelinde siyatik sinir saptandıktan sonra hafif yukarı kaldırılır ve 10mm'lik bir alanı krioprop ile iki kez dondurulur (31). Bu teknikte de ototomi ender oluşur. Perisyel kiolezyon uygulaması da bir model olarak geliştirilmiştir (32).

Spinal dorsal rizotomi modeli: Birkaç seviyeden uygulamaya bağlı gelişen nöropati modelinde girişimin seviyesine uygun olarak ön veya arka pençelerde ototomi gelişebilir. Bu uygulamalar sırasında spinal kord ve dorsal kök hasarı oluşturulmaması gerekir. Ototomiden başka ayna imajı bulgusu ve allodini, hiperaljezi hatları saptanabilir. Ayrıca birkaç seviyeden servikal spinal nörektomiye bağlı nöropati modeli de tanımlanmıştır. Bu uygulamada C2-C6 vertebra arası yandan yaklaşımla açılır ve spinal sinirler görüntülenerek, 5.0 dikiş materyali ile sıkıca bağlanır. Bu uygulamada nöropatik ağrı bulgusu olarak ototomi oluşur. Lomber spinal nörektomi nöropatik sensoryal değişimlerin izlenmesine uygun bir yöntem olarak kabul edilmemektedir (28).

Transaksiyel yaklaşımla brakial pleksusa ulaşarak sıkıca bağlanması sonucu oluşturulan total brakial pleksus nörektomisine bağlı nöropati modelinde bulgu olarak ototomi ve eşelenme, kaşınma izlenir (28,33). Trigeminal kökün

transtemporal retrogasserian yaklaşımla serbestleştirilerek kesisi veya sıkıca bağlanması ile geliştirilen total trigeminal rizotomi modelinde bir çok deneğin uygulamayı takiben yüzünün aşırı kaşınması bir nöropatik ağrı bulgusu olarak değerlendirilir (34).

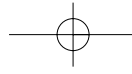
Sıçanlara uygulanan parsiyel denervasyon ile oluşturulan dört farklı periferik nöropatik ağrı modeli olan; kronik konstriksiyon hasarına bağlı nöropati modeli (KKH) (35); parsiyel siyatik sinir ligasyonuna bağlı nöropati modeli (PSSL) (36); spinal sinir ligasyonuna bağlı nöropati modeli (SSL) (37) araştırmalarda en sık kullanılan yöntemlerdir.



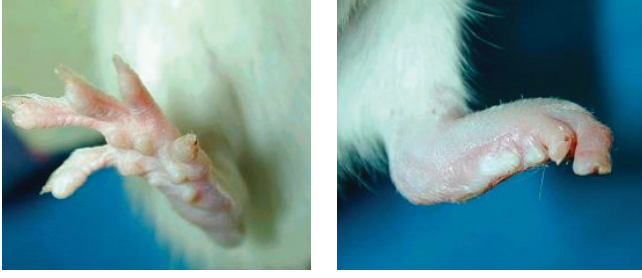
Şekil 4. Siyatik sinirinin ligatürasyonu (sağ taraf kontrol)

Kronik konstriksiyona bağlı nöropati modeli: Spontan ağrıya ek olarak allodini ve hiperaljezi gösteren bir hayvan modeli olarak ilk kez Bennett ve Xie tarafından bildirilmiştir (35). Bu modelde sinir hasarı, sıçanların siyatik siniri çevresinde, siyatik sinir trifurkasyonunun proksimalinde, gevşek düğümler atılarak konstriktif ligatürasyon sağlanması yolu ile oluşturulur. Uygulamada 4.0 krome katküt ile siyatik sinire 1 mm aralıklarla 4 ayrı gevşek düğüm atılır (Şekil 4). Bu düğümler sadece siyatik sinirini sıkıştırır. Sinirin dolaşımını dolayısı ile beslenmesini sağlayan vasa nervosumları sıkıştırmaz. Böylece ligasyon, kan akımını azaltır, fakat durdurmaz.

Bu şekilde en az birkaç hafta devam edecek olan intranöral ödeme neden olur. Uygulamada sinir hasarı oluşturulan tarafın kontralateralinde de siyatik sinir ortaya çıkarılır ve kontrol olarak kullanılmak üzere hazırlanan yalancı operasyon tarafı düğüm atılmadan kapatılır. Yalancı operasyon uygulaması sensoryal değişimlere yol açmadığı gibi KKH uygulamasında oluşan değişimlere eşlik etmez. Kontrol olarak yalancı operasyon tarafının kullanılması, tek taraflı KKH yönteminin kontralateral sensoryal abnormaliteler oluşturmadığının izlenmesini sağlar. KKH modeli hasarın distalindeki miyelinli liflerde ve hasarlı sahanın proksimalindeki az kullanılan sinir liflerinde dejenerasyona yol açar. Uygulama sonucunda % 50'inin üzerinde denekte gelişen ağrı duyusu belirtileri, ödem ve atrofik değişiklikler hasarı takiben 2 ila 7 gün içinde gözlenmeye başlar; 10-14 gün içerisinde en yüksek seviyeye ulaşır (Şekil 5); yaklaşık iki ay civarında ortadan kaybolur. Yerine, ilgili bölgede sürekli bir hiperestezi durumu oluşur. KKH'lı sıçanlar, etkilenen arka pençeyi sallama ve sık yalama gibi spontan ağrıyı işaret eden davranışlar, beraberinde cinsel istekte



032 | AĞRI ARAŞTIRMALARINDA KULLANILAN HAYVAN MODELLERİ



Şekil 5. Siyatik sinirinin ligatüre edilmediği taraf (A) ve 15 gün sonra ligatüre edilen taraftaki ayağın görünümü (B)

azalma ve kilo kaybı gibi sistemik belirtiler gösterirler (35,36).

Isıya ve mekanik uyarana karşı hiperaljezi, KKH modelinde, noksiyöz kimyasal stimülasyon kadar belirgin bir bulgu olarak ortaya çıkar. KKH'lı sıçanlarda, mekanik uyarı ve soğuğa karşı olmak üzere iki tip allodini görülür. KKH'lı hayvanların yaklaşık dörtte üçünde, hasarlı sinirin olduğu tarafta ısı anormallikleri olur. Laboratuarda bu ısı anormalliklerinin, sempatik sinir sistemi disfonksiyonunu yansıttığı varsayılır. KKH'lı sıçanlarda sempatektominin etkisi sendrom süresinde değişiklikler yapabilir (25,39). KKH modelinin patofizyolojisinde, periferik ve santral sinir sisteminin beraberce rol aldığı belirtilmiştir. Nöropatik ağrı araştırmalarında en sık uygulanan model olan KKH ile ilgili olarak, ketamin, dekstrorfan, memantin gibi çeşitli ilaçların özellikle spinal yoldan etkinliğini araştırılmış ve bu alanda çok değerli bilgiler edinilmiştir (40).

Parsiyel siyatik sinir ligasyon modeli: KKH'nin modifikasyonu olarak Seltzer ve Shir tarafından tanımlanmıştır. Girişim için önce sıçanlarda siyatik sinir dikkatli bir şekilde ortaya çıkarılarak çevre dokulardan ayrılır. Uygulamada kullanılan 8.0 veya daha ince dikiş materyali siyatik sinirin dorsal yüzünden sinir kalınlığının üçte biri veya yarısını alacak şekilde geçirildikten sonra gevşekçe bağlanır. Böylece sinirin parsiyel ligasyonu sağlanır. Bu model, genellikle ototomi davranışı içermeyen spontan ağrı bulguları oluşmasını sağlar. KKH modelinden farklı olarak PSSL modeli, her iki arka pençede hiperestezi oluşmasına neden olmuştur. Bu nedenle PSSL modelinde yalancı opere grup ile deneğin iki ekstremitesi birbirinin kontrolü olarak değerlendirilemez. Ancak deney grubu ile yalancı opere grup arasında karşılaştırma yapılması olasıdır. Bu modelde ağrı sempatektomi ile bütünüyle durdurulabilmektedir. Son araştırmalar, bu modelde gelişen allodininin nöronal mekanosensitivitedeki kronik artışla beraber olduğunu göstermiştir. Buna rağmen termal hiperaljezinin nöronal duyarlılık artışı ile birlikte olmadığı düşünülmektedir (36,41,42).

Spinal sinir ligasyon modeli: Kim ve Chung tarafından geliştirilmiş model, sıçanların arka pençesinin tek taraflı deafferentasyonu oluşturulur. Bu modelde, tek taraflı olarak lomber spinal sinirlerin bir veya iki tanesinin (L5 veya L5-

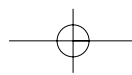
6), dorsal spinal kökten çıktığı bölümün distalinde sıkıca konstriksiyonu sağlanır. Modelde denek olarak sıçan kullanılır. Sıçanlarda ilyak kanadın rostral ucu L6 seviyesini belirlediğinden girişim için işaret noktası olarak alınır. Bununla beraber bir çok anatomik farklılıklar olabileceğinden deney sonu kontrol ile hangi seviyelere uygulama yapıldığı daha kesin olarak anlaşılır. Girişim için vertebral kolona lateral yaklaşımla paravertebral adaleler künt olarak disseke edilir. Vertebraların yan oluşumları aşılıarak L5 ve L6 spinal sinirlerin vertebradan dağıldıkları alana ulaşılır ve bu noktada spinal sinirler sıkıca bağlanır. Böylece arka pençenin parsiyel ligatürasyonu sağlanmış olur. Bu metot, kontralateral tarafta sempatektomi ile ortadan kaldırılabilen belirgin hiperestezi gelişimine neden olur. Son yıllarda bu model maymunlara da adapte edilmiştir (37).

Bunların dışında parsiyel denervasyon uygulamaları olarak, parsiyel trigeminal rizotomi, infraorbital sinire uygulanan trigeminal KKH metodu tanımlanmıştır. Ayrıca kedilere uygulanan birden fazla dişte oluşturulan dental pulpektomiye bağlı nöropati metodu da parsiyel denervasyon ile oluşturulan deneysel nöropatik ağrı uygulamalarından biridir (26,28,43-45).

Santral sinir sistemine ve sistemik ilaç uygulamasına bağlı nöropatik ağrı modelleri:

Steorotaksi yöntemiyle santral sinir sisteminin motor alanlarına çok az hacimde penisilin, tetanoz toksini, kobalt, alüminyum oksit, striknin gibi maddelerin injeksiyonu ile epilepsi sonucu nöropati modeli geliştirilmiştir (28,43). Ayrıca bu model maddelerin farklı sensoryal alanlara injeksiyonu ile modifiye edilmiştir. Bu alanlardan spinal kord dorsal boynuzu ve V. sinirin spinal inen yolak nükleuslarına injeksiyonu ile spontan ağrı ve allodini gibi nöropatik ağrı bulguları daha belirgin izlenmektedir (34,46). Ayrıca farelerde lomber alan dorsal boynuzuna AMPA reseptörleri aracılığıyla non-NMDA glutamaterjik eksitotoksisite oluşturan kianik asit injeksiyonu ile allodini oluşumu da bir metot olarak gösterilmiştir (47). Siyatik sinir civarına sürekli asiditik salin injeksiyonuyla geliştirilen nöropatik ağrı modelinde geri dönüşümlü termal hiperaljezi bulguları kaydedilmiştir (26,43,). Sıçanlarda sistemik olarak injekte edilen boyar maddenin Argon lazeri ile ısıtılması aracılığıyla oluşturulan spinal iskemi modelinde de allodini oluşumu izlenmiştir (48). Farklı ışın kaynağı, şiddeti ve süresi ile nöropatik ağrı bulgularının değişimleri de iridelenmiştir (49).

Sıçanlarda tek doz subkutan streptozosin injeksiyonu, pankreas beta hücrelerini geri dönüşsüz olarak harap ederek kanda 250 mg/dl üzerinde seyreden kronik hiperglisemi oluşturarak, allodini ile seyreden diabetik nöropati bulgularına yol açar (50). Spontan diabetik sıçan türlerinde de elektrofizyolojik araştırmalarda sinir iletisinde farklılıklar gösterilmiştir. Sıçanların % 40 galaktoz diyeti ile beslenmeleri sonucu hiperinsülinemi olduğu ve dolayısıyla bu durumun allodini benzer nöropatik ağrı bulgularına



yol açtığı izlenmiştir (28).

İnsanlarda total veya parsiyel sinir denervasyonu sonucunda hasarlı sinir veya kökün komşu innervasyon alanlarında sensoryal anormallikler gözlenir. Bazı araştırmacılar bu sınır bölgede oluşan sensoryal değişiklikleri, sinir hasarına bağlı oluşan nöropatik ağrının temel bulgusu olarak kabul ederler. Ancak bu bulgular sadece denerve alanın komşuluğunda bulunan sınır bölgede değil aynı zamanda hasarlı sinirin innerve ettiği alanda da oluşur (28, 51). Bu sınır bölge bulgularının gözlemlendiği fenomen çeşitli hayvan türlerinde uygulanan dorsal rizotomiye takiben dokunma allodinisi ve mekanik hiperaljezi olarak gözlenmiştir. Siyatik KKH modelinde safen sinir alanında dokunma allodinisi ve mekanik ve sıcak hiperaljezi saptanmıştır. Bu bulguları nöropatik ağrı modellerine uygun tanımlanmış davranışsal gözlemlere ve bu alanda geliştirilmiş test düzeneklerinde izlemek mümkündür (34,52).

Çeşitli nöropatik ağrı modellerinde farklı davranış anormallikleri izlenir. Sık uygulanan nöropatik ağrı modellerinde davranışsal gözlemlerin farklılıkları tablo-1'de kısaca özetlenmiştir (26,28,43).

Nöropatik ağrı modelinde izlenen en özel davranış modellerinden birisi ototomidir. Total siyatik denervasyonunda denerve alanın denek tarafından çiğnenerek önce tırnağın ve parmağın daha sonra ayağın koparılmasına kadar ilerleyen bir davranış patolojisidir. Çeşitli araştırmalarda bu davranış bozukluğu, deafferente ekstremitelerde oluşan sensoryal anormalliklere veya denek tarafından hissiz kalan ekstremitede uzantısının vücuda yabancı bir madde olarak algılanıp koparılmak istenmesi şeklinde bir yanıt olabileceği ileri sürülmüştür (27,53). Ancak son yıllarda yapılan bir araştırmada lokal anestetikle uzun süreli periferik blok uygulanan deneklerde, ototomi benzeri davranış saptanmaması, bu davranışın spontan ağrı ve sensoryal değişimlerle ilişkisinin olabileceği yöndeki görüşü desteklemektedir (30,54). Günümüzde bir çok araştırmacı ototomiyi spontan nöropatik ağrının bir yanıtı olarak kabul etmekte-

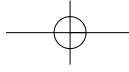
dir (54). Ototomi davranışı ile ilgili ilk kayıtlar KKH modelinde tutulmuş olmasına karşın, total siyatik denervasyon modelinde daha sık izlenmektedir. Bu kayıtlara göre KKH modelinde ototomi en fazla % 70 oranında izlenir (35,38,55). Ayrıca KKH modelinde opere tarafa preoperatif veya postoperatif lokal anestetik injeksiyonunun ototomi davranışını azalttığı da ileri sürülmüştür (26,27,28,43,56). Ototomi diğer iki parsiyel denervasyon modeli olan PSSL ve SSL modellerinde izlenmez. Bunun nedeni KKH modelinde göreceli olarak daha fazla denervasyon oluşturulması olabilir. Kriolezyon veya ezilme ile oluşturulan nöropati modellerinde de ototomi saptanır. Ancak bu modellerde total transeksiyondan daha az sıklıktadır. Bu durumun olası periferik mekanizması sinir hasarının reinnervasyonunun hızla gelişmesi olarak açıklanmaktadır. Ayrıca sinir ezilmesinin total sinir kesisinden daha az santral sinir sistemi yanıtı oluşturduğunun ileri sürülmesi, santral mekanizmaları da kapsayan nedene yönelik bir diğer iddiadır. En sık kullanılan yöntemlere göre ototomi skorlaması; bir veya daha fazla tırnak koparılması için 1 puan, her bir distal parmak yarısı için 1 puan ve her bir proksimal parmak yarısı için de 2 puan verilerek yapılır (28,56).

Parsiyel siyatik hasarını takiben 1-2 hafta içinde bazı deneklerin opere taraftaki pençesini yukarı kaldırıp titrettiği ve sonra hafifçe zemine yerleştirdiği izlenir. Gerçekte bu davranış parmağı ezilen insanların davranışına benzemektedir. Tırmalama ve kaşınma hareketi daha çok poliartritli sıçan modelleri için tanımlanmıştır. Nöropatik ağrılı insanlarda ağrı yanıtı olarak bu davranış bozukluğunun rastlanmamasına karşın, tırmalama ve kaşınma denek hayvanlarında spontan ağrı yanıtı olarak tanımlanır. Bazı parsiyel denerve modellerde (PSSL, SSL) deneklerde temizlenme için yaptıkları normal yalanma hareketinden farklı olarak opere tarafta bir yalanma hareketi izlenir (28). Bu davranış, yanıcı allodinik ağrının önlenmesi için denegin hasarlı pençesini yalayarak soğuk ve nemli tutması isteğinden kaynaklanabilir. Ayrıca belirli santral sinir sistemi alanlarına epileptojen injekte edilen kedilerde ve trigemi-

Tablo 1. Nöropatik ağrı modellerinde davranış patolojilerinde izlenen farklar

Ağrı Modeli	Ototomi	MH	SıH	MA	SoA	Taraf
KKH	+	+	+	+	+	unilateral
PSSL	-	+	+	+	-	bilateral
SSL	-	?	+	+	+	bilateral
KN	+	?	-	+	?	bilateral

MH: Mekanik hiperaljezi; SıH: Sıcak hiperaljezi; MA: Mekanik allodini; SoA: soğuk allodinisi



034 | AĞRI ARAŞTIRMALARINDA KULLANILAN HAYVAN MODELLERİ

nal KKH modelinde daha belirgin olarak aşırı temizlenme hareketi de izlenir. Parsiyel denervasyon modellerinde sensoryal anormalliklerin en belirgin olduğu dönemde deneklerin ekstremitelerinin cildini hafifçe ısırarak gözlenir (28, 43). Bu hareket ototomiden farklıdır ve ciltte yara oluşmaz. Parsiyel denervasyon modellerinde bazen deneklerin opere taraftaki pençelerini ağızlarına yerleştirdikleri ve saniyeler boyunca böyle tuttıkları saptanan davranış bozukluklarıdır. Ayrıca deneklerin ağırları nedeniyle bazen ses çıkardıkları gözlenir. Uyku düzenlerinin bozulduğu, iştahlarının azaldığı ve zayıfladıkları da kaydedilmektedir. Bazı araştırmacıların KKH ve trigeminal KKH modellerinde deneklerde kanlı göz yaşları (Chromodacryorrhea) izlendiğine ilişkin kayıtları da bulunmaktadır. Kulak, göz ve pençe renklerinde periferik vazokonstriksiyonla ilişkili solukluk oluşur. Deneklerin yürüme dinlenme pozisyonları değişir. Arama davranışları normale göre azalmıştır. Pençelerinin basma pozisyonu değişir ve bazen opere pençelerini yukarı kaldırır. Temizlenme davranışı azalır ya da tamamen sonlanır (28, 43).

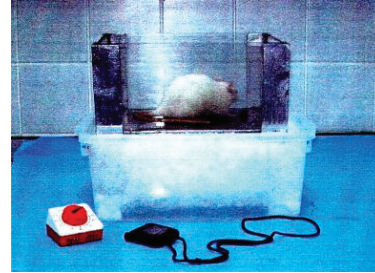
Hayvan modellerinde spontan nöropatik ağrı ile ilişkili davranış bozukluklarına ek olarak izlenen, sensoryal uyarılara anormal yanıtlar iletilen oluşan değişimleri göstermesi bakımından çok önemlidir. Deneklerin sensoryal uyarıya karşı herhangi bir hasar oluşmaksızın normoestezi ve normoaljezi ölçümleri yapılarak ağrı eşikleri ve toleransları saptanır. Hayvanlarda hafif dokunma ile dokunma hiperestezi araştırılır. Allodini nöropatik ağrının en önemli bulgularındandır. Allodini denekte davranış bozukluklarının izlenmesi ile tanımlanabileceği gibi, soğuk, sıcak veya mekanik uyarılarla da belirlenebilir. Hiperaleji de şiddeti veya süresi soğuk, sıcak veya mekanik uyarı ile araştırılır (27,28,43). Ayrıca deneklerde hiperpati, hipoestezi ve hipoaljezi, anestezi ve analjezi ile ilgili kayıtlar yapılabilir. Bazı denervasyon modellerinde kontralateral tarafta da hiperestezi, allodini ve bazı hiperaleji belirtileri saptanır. Bunun yanı sıra hayvan modellerinde gelişen spontan nöropatik ağrının sempatik sinir sistemi ile ilişkisi olabilir. Bu durum, sempatik blok ile ağırlı yanıtların izlenmesi veya semptomimetik bir maddenin injeksiyonu ile bulguların arttığı saptanması ile ortaya konabilir (27, 28).

Hayvan modellerinde spontan ağrı bulgularının yanı sıra stimulus sonucu gelişen bazı davranış bozuklukları, ağrının karakteri, ağrının mekanizması ve yeni tedavi uygulamalarının değerlendirilmesinde çok önemli yere sahiptir. Temel olarak hiperaleji ve allodini olarak tanımlanan bu davranış bozukluklarının kaydedilmesi için bazı mekanik, soğuk ve sıcak uyarı sağlayan düzenekler geliştirilmiştir (26, 28, 43).

Mekanik hiperalejinin belirlenebilmesi için en sık uygulanan teknik keskin uçlu bir çubuğun orta plantar alana batırılmasıdır. Denek çubuğun batırılması ile pençesini hızlı ve güçlü bir şekilde geri çekerse bu durumda yanıt normoaljeziktir. Pençenin geri çekilme yanıtı zayıf ve güç-

süzce kaldırma olarak verilen yanıt hipoaljezik olarak değerlendirilir. Deneğin pençesini hızla çekip, bunu sürdürmesi ve bu harekete eşlik eden ses çıkarma, kaçma, pençesini yalama veya hafifçe ısırma gibi davranış bozukluklarının bulunması durumunda hiperalezik yanıt olarak değerlendirilir. Mekanik hiperaleji için geliştirilmiş diğer bir düzenek pençe basınç testi olarak adlandırılır. Randall-Selitto cihazı aracılığıyla, pençe üzerine artan ağırlıklar yerleştirilerek mekanik hiperaleji için, deneğin pençesini çekme süresi değerlendirilir. Bazı araştırmacılara deneğin ağrısı nedeniyle ses çıkarma süresinin pençeyi geri çekme süresinden daha anlamlı bulurlar (26, 28, 43).

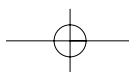
Sıcak hiperalejinin saptanması için en etkili yöntemlerden birisi lazer ışını kullanımudur. Uygulamada uyarılan alanın çapı 0.5 - 0.8 mm arasında değişir. Böylece diğer yöntemlerle elde edilemeyecek kadar ayrıntılı bir hassaslıkta sensoryal değişimlerin bulunduğu bölgeler incelenebilir. Lazer ile cildin uyarılması durumunda ısısının artış süresi çok hızlıdır. Böylece pençenin uyarıdan geri çekilmesinden bile daha önce, cilt istenilen üst eşikte sıcak uyarıyı absorbe etmiş olur. Bu özellik sayesinde yöntemin en önemli avantajı sadece pençe geri çekme eşikini değil sıcak hiperalejinin varlığını da ortaya koymasındadır. Ayrıca sıcak suya opere ekstremitenin daldırılması ve üst eşikte sıcak zeminde pençe çekmenin izlenmesi ile sıcak hiperaleji değerlendirilebilir. Ancak lazer ile saptanan bilgilerin daha fazla kabul gördüğünü akılda tutmalıdır (28,43).



Şekil 6. Soğuk allodini test düzeneği

Soğuk hiperalejisi 20 x 20 cm alan genişliği olan metal zeminli etrafı cam zeminli soğuk (5°C ± 0.2) bir ortamda izlenir (Şekil 6.). Belirli bir süre içerisinde deneğin pençesini kaldırma sayısı ve kümülatif süresi kaydedilir. Sayı azaldığında soğuk hipoaljezi, artığında ise soğuk hiperaleji olarak değerlendirilir. Ayrıca aseton damlatılarak veya etil klorid sprey ile soğuk hiperaleji değerlendirilebilir (28).

Dokunma allodini çeşitli kalınlıkta olan von Frey filamentleri (0.25-2g) ile saptanır. Allodininin saptanması için önce normal denekte ölçüm yapılır. Ölçüm için farklı von Frey filamentleri semisirküler biçimde bükülene dek saniyede iki kez sıklıkta ve toplam 5 kez deneğin orta plantar alanda cildine bastırılır. Hayvan pençesini geri çektiğinde bu filament eşik değeri olarak kaydedilir. Bunu takiben opere edilmiş ekstremitenin üzerine yapılan uygulamada



eşikte belirgin azalma saptanacaktır. Bu durumda saptanan değer daha çok mekanik hiperestezi olarak kabul edilir. En düşük uyarıyı verebilen uyararla bile anlamlı olarak deneğin pençesini geri çekmesi durumunda dokunma allodinisinden söz edilebilir. Bunun dışında alternatif bir uygulama olarak deve kılı kullanılarak dokunma allodinişi saptanabilir (28, 43).

Sıcak allodinisinin saptanmasında en sık uygulanan yöntem ışık kaynağı aracılığıyla ısı ileten algometri ile yapılan ölçümlerdir. Yöntemde zeminin kalibrasyonu önceden yapılır. Sıcak allodinisinin varlığı, opere deneklerin ortalama pençe geri çekme latensinin sağlam denekle karşılaştırıldığında belirgin olarak kısa bulunması veya hasarlı pençe ile hasarsız pençe arasındaki pençe geri çekme latensinin aynı sıcakta negatif olması ile ortaya konur. Bir diğer sıcak allodinişi saptama yöntemi artan ısılarda (40°C, 42°C, 44°C, 46°C) sıcak su banyosuna pençenin 5 kez her biri 5 dakikalık sürelerde daldırılması ile gerçekleştirilir. Deneğin ayağının suya batırılmasından çarpınma hareketine kadar geçen süre ile değerlendirilir. Normal sıçanlarda 44.5°C su banyosunda 15 saniyeden daha kısa çarpınma latensisi, normaljezik eşik olarak kabul edilir ve sıcak allodinişi buna göre kaydedilir. Klasik "hot-plate testi" sıcak allodinişi için uygun bir yöntem değildir. Bir diğer yöntem olarak CO₂ lazeri veya diğer lazer uygulamaları da kullanılmaktadır (54). Soğuk allodinisinin değerlendirilmesinde pençe soğuk suya daldırılır. Sıcak allodinisinde uygulana yöntem benzer şekilde pençe 10°C su banyosuna daldırılır ve reaksiyon süresi ölçülür (28,43).

KAYNAKLAR:

1. Crawley JN. Sensory abilities . In What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. New York, Wiley-Liss, 2000; 65-83.
2. Cabanac A, Briese E. Handling elevates the colonic temperature of mice. *Physiol Behav* 1992; 51: 95- 98.
3. Dubner R. Methods of assessing pain in animals. In: Wall P.D.,Melzack R, eds. Textbook of pain. New York, Churchill livingstone,1989; 247-256.
4. Walker K, Alyson J, Urban F, Urban LA. Animal models of pain research. *Mol Med Today* 1999; 5: 319-321.
5. Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 597-652.
6. Bennett GJ. Animal models of pain. In Kruger L, eds. Methods in pain research, New York CRP Press 2001; 67-91.
7. Lineberry CG. Laboratory animals in pain research. In Methods in Animal experimentation New York, Academic Press, 1981; 237-311.
8. D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 1941; 72: 74-79.
9. Ben-Bassat J, Peretz E, Sulman FG. Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1959; 122: 434-447.
10. Tjolsen A, Lund A, Berge OG, Hole K. An improved method for tail flick testing with adjustment for tail skin temperature. *J Neurosci Meth* 1989; 33:259-264.
11. Woolfe G, MacDonald AD. The evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride. *J Pharmacol Exp Ther* 1944; 80: 300-307.
12. Eddy NB, Leimbach D. Synthetic analgesics. II. Diethienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 1953; 107: 385-393.
13. Hunskaar S, Berge OG, Hole K Antinociceptive effects of orpenadrine citrate in mice. *Eur J Pharmacol* 1985; 111: 221-226.
14. Hunskaar S, Berge OG, Hole K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behav Brain Res* 1986; 21: 101-108.
15. Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn* 1957; 111: 409-419.
16. Haffner F. Experimentelle prufung schmerzstellender mittel. *Deutsch Me Worchenschr* 1929; 55: 731-733
17. Koster R, Anderson M, deBeer EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Fed.Proc* 1959; 18: 412.
18. Siegmund E, Cadmus R., Lu G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 1957; 95: 729-731.
19. Brown DM, Hughes BO. Practical aspects of strain variation in relation to pharmacological testing. *Pharmacol. Pharmacol* 1962; 14: 399-405.
20. Dubuisson D., Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-174.
21. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17.
22. Wall PD, Devor M, Inbal M, Scadding JV, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM Autotomy following peripheral nerve lesion: Experimental anesthesia dolorosa. *Pain* 1979; 7: 103 –113.
23. Hansson P, Lacerenza M, Marchettini P. Aspect of clinical and experimental neuropathic pain: the clinical perspective. Per T Hansson, Howard L Fields, Raymond G Hill and Paolo Marchettini (Eds), *Neuropathic Pain: Pathophysiology and Treatment Progress in Pain Research and Management. IASP Press, Seattle ABD, Vol 21, 1 – 18, 2001.*
24. Sommer C. Cytokines and neuropathic pain. Per T Hansson, Howard L Fields, Raymond G Hill and Paolo Marchettini (Eds), *Neuropathic Pain: Pathophysiology and Treatment Progress in Pain Research and Management. IASP Press, Seattle ABD, 2001; Vol 21, 37 – 62.*
25. Janig W, Baron R. The role of the sympathetic nervous system in neuropathic pain: Clinical observations and animal models. Per T Hansson, Howard L Fields, Raymond G Hill and Paolo Marchettini (Eds), *Neuropathic Pain: Pathophysiology and Treatment*

- Progress in Pain Research and Management. IASP Press, Seattle ABD, 2001; Vol21, 125, 149.
26. Bennett GJ: Neuropathic pain. In: R Melzack and PD Wall (Eds), Textbook of Pain, 3rd ed, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994; pp 201-224.
 27. Dubner R Ren K. Assessing transient and persistent pain in animals. P Wall, R Melzack (Eds) Text Book of Pain 4th edition Churchill Livingstone ABD, 1999; 359 - 369.
 28. Zeltzer R, Seltzer Z. A practical guide for the use of animal models in the study of neuropathic pain. J Boivie P Hansson and U Lindblom (Eds). Touch Temperature and Pain in Health and Disease: Mechanisms and Assessments, Progress in Pain Research and Management. IASP Press, Seattle ABD, 1994; Vol 3, 295 - 338.
 29. Blumenkopf B, Lipman JJ. Reply to letter of Dr L Kruger. Pain 1992; 49: 155-156.
 30. Blumenkopf B, Upman JJ. Studies in autotomy: Its pathophysiology and usefulness as a model of chronic pain. Pain 1991; 45: 203 - 209.
 31. Kerns JM, Braverman B, Matthew A, Lucchinetti C and Ivankovich AD. A comparison of cryoprobe and crush lesions in the rat sciatic nerve. Pain 1991; 47; 31-39.
 32. DeLeo JA, Coombs DW, Willenbring S, Colburn RW, Fromm C, Wagner R, Twitchell, BB. Characterization of a neuropathic pain model: sciatic cryoneurolysis in the rat. Pain 1994; 56: 9-16.
 33. Wiesenfeld Z, Lindblom U. Behavioral and electrophysiological effects of various types of peripheral nerve lesions in the rat: A comparison of possible models for chronic pain. Pain 1980; 8: 285 - 298.
 34. Black GR. A laboratory model for trigeminal neuralgia. Adv Neurol 1974; 4: 651 - 658.
 35. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain 1988; 33, 87-107.
 36. Seltzer Z, Beilin B, Ginzburg R, Paran Y and Shimko T. The role of injury discharge in the induction of neuropathic pain behavior in rats. Pain 1991; 46: 327-336.
 37. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in rat. Pain 1992; 50: 355-363.
 38. Attal N, Jazat F, Kayser V, Guilbaud G. Further evidence for "pain-related" behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy, Pain 1990;41: 235-251.
 39. Kim SH, Chung JM. Sympathectomy alleviates mechanical allodynia in an experimental model for neuropathy in the rat. Neurosci Lett 1991; 134: 131-134.
 40. Yamamoto T, Yaksh TL. Spinal pharmacology of thermal hyperesthesia induced by constriction injury of sciatic nerve: excitatory amino acid antagonists. Pain 1992; 49: 121-128.
 41. Seltzer Z, Dubner R and Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders in rats by partial sciatic nerve injury. Pain 1990; 43: 205-218.
 42. Shir Y, Seltzer Z. Effects of sympathectomy is a model of causalgiform pain produced by partial sciatic nerve injury in rats. Pain 1991; 45: 309-320.
 43. Bennett GJ. Animal models of neuropathic pain. GF Gebhart, DL Hammond and TS Jensen (Eds). Proceedings of the 7th World Congress on Pain. Progress in Pain Research and Management. IASP Press, Seattle ABD, 1994; Vol 2, 495 - 510.
 44. Vos BP, Maciewicz RJ. Behavioral changes following ligation of the infraorbital nerve in rat: an animal model of trigeminal neuropathic pain: JM Besson and G Guilbaud (eds) Lesions of primary afferent fibers as a tool for the study of clinical pain. Elsevier, Amsterdam, 1991; pp 147-158.
 45. Vos BP, Maciewicz RJ. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to rats infraorbital nerve, J Neurosci 1994; 14: 2708-2723.
 46. Kryzhanovsky GN. Generator and systemic mechanisms of pain syndromes. Pain 1998; 5: 197-197.
 47. Yezierski RP. Spinal Cord Injury: A Model of Central Neuropathic Pain Neurosignals 2005;14:182-193.
 48. Prado R, Dietrich WD, Watson BD, Ginsberg MD and Green BA. Photochemically induced graded spinal cord infarction: behavioral, electrophysiological and morphological correlates. J. Neurosurg 1987; 67:745-753.
 49. Hao JX, Xu JX, Aldskogius H, Seiger A, Wiesenfeld-Hallin Z. Allodynia-like effect in rat after ischaemic spinal cord injury photochemically induced by laser irradiation. Pain 1991; 45: 175 - 185.
 50. Wuarin-Bierman L, Zahnd GR, Kaufmann F, Burcklen L, Adler J. Hyperalgesia in spontaneous and experimental animal models of diabetic neuropathy. Diabetologia 1987; 30: 653 - 658.
 51. Markus H, Pomerantz B and Krushelnysky D. Spread of saphenous somatotopic projection map in spinal cord and hypersensitivity of the foot after chronic sciatic denervation in adult rat. Brain Res 1984; 296: 27-39.
 52. Lombart MC, Nashold BS, Albe-Fessard D, Salman N, Sakr C. Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: A possible animal model of chronic pain. Pain 1979; 6: 163 - 174.
 53. Dubner R Ren K. Central mechanism of thermal and mechanical hyperalgesia following tissue inflammation. J Boivie P Hansson and U Lindblom (Eds). Touch Temperature and Pain in Health and Disease: Mechanisms and Assessments, Progress in Pain Research and Management. IASP Press, Seattle ABD, 1994; Vol 3 267 - 277.
 54. Devor M. Autotomy sense and nonsense: reply to L. Kruger, Pain 1992; 49: 156.
 55. Neil A, Attal N, Guilbaud G. Effect of guanethidine on sensitization to neural stimuli and self-mutilating behaviour in rats with peripheral neuropathy. Brain Res 1991; 565: 237-246.
 56. Franklin KBJ, Abbott FV. Techniques for assessing the effects of drugs on nociceptive responses. Psychopharmacology 1989; 145-216.