

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI**

**LEVETİRASETAMIN AĞRI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İN VİTRO
ELEKTROFİZYOLOJİK (PATCH
KENETLEME) VE İN VİVO (HOT PLATE
TESTİ) YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Mete ÖZCAN

ELAZIĞ – 2006

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Necip İLHAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK

Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ahmet AYAR

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Doç. Dr. Zülküf AKDAĞ

Doç. Dr. Serpil BULUT

Doç. Dr. Ahmet AYAR

Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkı sağlayan, tezimin hazırlanmasında yardım ve desteklerini esirgemeyen danışmanın Sayın Doç. Dr. Ahmet AYAR'a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışması süresince yardımlarını gördüğüm Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK'e, araştırma görevlisi Dr. Sinan CANPOLAT'a doktora öğrencileri Tuğrul KUZGUN'a ve İhsan SERHATLIOĞLU'na, Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR, Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ, Doç. Dr. Bayram YILMAZ, Yrd. Doç. Dr. Selim KUTLU'ya, araştırma görevlileri Dr. Süleyman SANDAL, Mehmet AYDIN, Sema Tülay KÖZ, Ergül ALÇİN, ve Özgür BULMUŞ'a, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü araştırma görevlisi Dr. Mehmet TUZCU'ya teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Nöronlarda İstirahat Membran Potansiyeli	6
3.2. Nöronlarda İyon Homeostazisi	7
3.3. Membran İyon Kanalları	8
3.3.1 Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları	10
3.3.2. Proton Kapılı İyon Kanalları	11
3.3.3. Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları	12
3.3.4. Klor Kanalları	13
3.3.5. Voltaj-Kapılı Kalsiyum Kanalları	14
3.3.5.1. Kalsiyum Kanal Tipleri	16
3.3.5.1.1. L tipi kalsiyum kanalları	16
3.3.5.1.2. N tipi kalsiyum kanalları	16
3.3.5.1.3. P tipi kalsiyum kanalları	17
3.3.5.1.4. Q tipi kalsiyum kanalları	17
3.3.5.1.5. R tipi kalsiyum kanalları	18
3.3.5.1.6. T tipi kalsiyum kanalları	18
3.3.5.2. Kalsiyum Kanal Alt Tiplerinin Moleküler Esasları	19
3.4. Membran Uyarılabilirliği ve Aksiyon Potansiyeli	20
3.5. Membran İyon Kanallarının İyon Seçiciliği	21
3.6. Membran İyon Kanallarının Farmakolojisi	23
3.7. İyon Kanallarının Kapı Özellikleri	23
3.8. Dorsal Kök Gangliyonu Nöronlarının Sınıflandırılması ve Özellikleri	24
3.9. Ağrı	26
3.9.1. Ağrı Tipleri ve Özellikleri	27
3.9.1.1. Nosisepatif Ağrı	30

3.9.1.2. Nöropatik Ağrı.....	30
3.9.2. Ağrının Bastırılması (Analjezi)	31
3.9.3. Ağrı Modelleri	33
3.9.3.1. Deneysel Ağrı Modelleri	33
3.9.3.2. Hücresel Ağrı Modelleri.....	34
3.10. Diyabet	35
3.11. Epilepsi.....	37
3.11.1. Epilepsi ve İyon Kanalları	38
3.12. Levetirasetam	40
4. GEREÇ VE YÖNTEM	43
4.1. <i>In Vitro</i> Elektrofizyolojik Deneyler	
4.1.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinin Primer Kültürü	43
4.1.1.1. Kültür İçin Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Ajanlar	44
4.1.1.2. Kültür Vasatı.....	46
4.1.1.3. Kültür İçin Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri	46
4.1.1.4. Diseksiyon Malzemeleri	46
4.1.1.5. Diğer Ekipmanlar	47
4.1.1.6. DKG Hücre Kültürü İçin Genel Prensipler	47
4.1.1.7. DKG Hücre Kültürü Protokolü.....	48
4.1.2. Elektrofizyoloji.....	51
4.1.2.1. Elektrofizyolojik Deney Düzenegi ve Protokoller	51
4.1.2.2. Akım Kenetleme Deneyleri İçin Kayıt Solüsyonları	53
4.1.2.2.1. Akım Kenetleme Deneyleri İçin Patch Pipeti (Hücre İçi) Solüsyonu.....	54
4.1.2.2.2. Akım Kenetleme Deneyleri İçin Ekstrasellüler Kayıt Solüsyonu	54

4.1.2.3. Tüm Hücre Diyaliz Akım Kenetleme Modunda Aksiyon Potansiyellerinin Kayıt Edilmesi ...	55
4.1.2.4. Kanal İletkenliğinin İyonik Temelinin Biyofiziksel Olarak Belirlenmesi	57
4.1.2.4.1. Zıtlanma Potansiyelinin Hesaplanması.....	57
4.1.3. Farmakolojik Ajan.....	58
4.1.3.1. İlaç Uygulaması	58
4.1.3.2. Elektrofizyolojik Verilerin Analizi.....	59
4.2. <i>In Vivo Hot Plate</i> Testinde Nosiseptif Davranış Yöntemiyle Ağrı Eşiğinin Belirlenmesi	61
4.2.1. <i>Hot Plate</i> Testi.....	61
4.2.1.1. Normal Farelerde <i>Hot Plate</i> Testi	62
4.2.1.2. Diyabetik Farelerde <i>Hot Plate</i> Testi.....	63
4.3. İstatistiksel Metot	64
5. BULGULAR.....	65
5.1. Giriş	65
5.1.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyonu Sinir Hücre Kültürlerinde Aksiyon Potansiyeli Bulguları.....	65
5.2. Sıçan Dorsal Kök Gangliyonu Hücrelerinde Aksiyon Potansiyeli ve Aksiyon Potansiyeli Sonrası Ard Potansiyel Kayıtları ve Genel Özellikleri.....	67
5.3. Levetirasetamın Sıçan Dorsal Kök Gangliyonu Sinir Hücreleri Uyarılabilirliği Üzerine Etkileri	70
5.4. Levetirasetamın Çoklu Ateşlemeli Aksiyon Potansiyeli Üzerine Etkileri.....	79
5.5. Levetirasetamla Aktive Olan Membran Akımlarının İyonik Temelinin Biyofiziksel Yaklaşımlarla Belirlenmesi	79
5.6. Levetirasetamın Normal ve Diyabetik Farelerde Ağrı Eşiği Üzerine Etkisi	84
5.6.1. Normal Farelerde Levetirasetamın Ağrı Eşiğine Etkisi	84

5.6.2. Diyabetik Farelerde Levetirasetamın Ağrı Eşiğine Etkisi	86
6. TARTIŞMA	
6.1. Tüm Hücre Diyaliz Patch Kenetleme Tekniği Akım Kenetleme Modu Bulguları.....	88
6.2. Hot-Plate Testi Bulguları.....	96
7. KAYNAKLAR	100
8. ÖZGEÇMİŞ	119

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1: Nöronal VKKK'nın α_1 alt birimine göre sınıflandırması.

Tablo 5.1: Tüm hücre diyaliz modu geliştirilmesinden sonra en az 5 dakika süreyle stabil bir membran potansiyeline sahip hücrelerden alınan AP kayıtları ve AP parametreleri ortalama değerleri.

Tablo 5.2: Uygulanan en düşük doz levetirasetamın (30 μM), AP uyarılabilirliği üzerine etkileri.

Tablo 5.3: İMP ve 100 μM LEV uygulaması ile indüklenen hiperpolarize membran potansiyelinden aktive edilen AP parametreleri.

Tablo 5.4: Uygulanan en yüksek doz levetirasetamın (300 μM), DKG nöronlarında AP uyarılabilirliği üzerine etkileri.

Tablo 5.5: Normal farelerin hot-plate testinde ağrı eşiği değerleri.

Tablo 5.6: Hot-plate testi uygulanan diyabetik farelerin ağrı eşiği değerleri.

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1: Ağrı sinyal yolu

Şekil 3.2: Duyusal nöron tipleri

Şekil 3.3: Levetirasetamın kimyasal yapısı

Şekil 4.1: Elektrofizyolojik kayıt sisteminin genel görünüşü

Şekil 4.2: Hot-plate analjezimetre

Şekil 5.1: DKG nöronlarında 5 ms süren uyarıya cevap olarak ortaya çıkan farklı tiplerde ard potansiyel kayıtları

Şekil 5.2: Aynı DKG nöronunda 100 msn süren uyarıya cevap olarak oluşan AP'leri.

Şekil 5.3: Düşük doz levetirasetamın (30 μ M) AP uyarılabilirliği üzerine etkileri.

Şekil 5.4: Levetirasetamın (100 μ M) AP uyarılabilirliği üzerine etkileri.

Şekil 5.5: AP uyarılabilirliği üzerine, uygulanan en yüksek doz levetirasetamın (300 μ M) etkileri.

Şekil 5.6: LEV uygulamasına bağlı olarak tüm hücre diyaliz akım kenetleme kayıt formunda aktive olan membran hiperpolarizasyonunun iyonik temelinin zıtlanma potansiyeli hesaplanarak biyofiziksel olarak belirlenmesi.

Şekil 5.7: AP'nin pik değerinin % 10 ve % 90 değerleri arasındaki süreden faydalanarak AP'nin çıkan ve inen fazları için sırasıyla Na⁺ ve K⁺ kanal iletkenliğinde meydana gelen zaman bağımlı değişimin belirlenmesi

Şekil 5.8: LEV'in (60, 300 ve 900 mg/kg, i.p.) hot-plate testi uygulanan normal farelerde ısı uyarana karşı verdiği yanıtın ortalama±SH değerleri.

Şekil 5.9: LEV'in (20, 100 ve 200 mg/kg, i.p.) hot-plate testi uygulanan diyabetik farelerde ısı uyarana karşı verdiği yanıtın ortalama±SH değerleri.

KISALTMALAR LİSTESİ

$[Ca^{2+}]_i$: Hücre içi serbest kalsiyum
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
ADİK	: Aside Duyarlı İyon Kanalları
ADP	: Adenozin difosfat
AEİ	: Antiepileptik İlaçlar
AgCl	: Gümüş klorür
AP	: Aksiyon Potansiyeli
ATP	: Adenozin trifosfat
Ba^{+2}	: Baryum İyonu
Ca^{+2}	: Kalsiyum İyonu
$CaCl_2$: Kalsiyum klorür
Cl^-	: Klor İyonu
Cs^+	: Sezyum
DHP	: Dihidropiridin
DKADİK	: Dorsal Kök Aside Duyarlı İyon Kanalları
DNAz	: Deoksiribo nükleik asitaz
DVAKK	: Düşük Voltajla Aktive Olan Kalsiyum Kanalları
EGTA	: Etilen Glikol-Tetraasetikasit
F	: Florür
GOhm	: Giga ohm
G-Protein	: Guanitin Bağlayıcı Protein
H^+	: Hidrojen iyonu
Hz	: Hertz
IP_3	: İnoзитol trifosfat
İMP	: İstirahat Membran Potansiyeli
K^+	: Potasyum İyonu
KCl	: Potasyum klorür
LEV	: Levetirasetam
Li^+	: Lityum İyonu

MΩ	: Megaohm
Mg ⁺²	: Magnezyum İyonu
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
mOsm	: miliozmol
mV	: milivolt
nA	: nanoAmper
Na ⁺	: Sodyum İyonu
NaCl	: Sodyum Klorür
NaHCO ₃	: Sodyumbikarbonat
NGF	: Sinir Büyütme Faktörü
NH ₄	: Amonyum
NO	: Nitrik oksit
OH	: Hidroksil
pA	: PikoAmper
PBS	: Steril Dulbeco'nun Tamponlanmış Fosfat Tuzu
PKİK	: Proton Kapılı İyon Kanalları
pS	: Piko Simens
Rb ⁺	: Rubidyum
ROS	: Reaktif oksijen türü
sGMP	: Siklik guanidin monofosfat
SO ₄ ⁻	: Sülfat
STZ	: Streptozotosin
TEA	: Tetraetilamonyum
TTX	: Tetrodotoksin
VKPK	: Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları
VKSK	: Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları
YVAKK	: Yüksek Voltajla Aktive Olan Kalsiyum Kanalları

1. ÖZET

Plazma membranı elektriksel uyarılabilirliği ve uyarılabilirliğin iyonik esasları, “uyarılabilir dokuların membran biyofiziği” olarak klasik biyofizik konuları arasında yer almaktadır. Nöronal membran uyarılabilirliği düzeyindeki elektriksel aktivite değişikliğine neden olan voltaj bağımlı sodyum, potasyum ve kalsiyum kanallarının aktivite değişiklikleri, epilepsi ve ağrı dahil pek çok patofizyolojik durumun altında yatan sebep olabilir. Bu iyon kanallarının biyofiziksel özelliklerinin anlaşılması ve kimyasal ajanlarca aktivitelerinin modifikasyonu antinosiseptif terapiyi de içeren durumlara karşı terapötik yaklaşımların gelişimi açısından son derece önemlidir. Levetirasetam (LEV, uc b L059), epilepside nöbet oluşumunu baskılayan üstün bir farmakolojik profile sahip bir antiepileptik ilaçtır. Bu çalışmanın amacı yeni bir antiepileptik ilaç olan LEV’in olası analjezik etkisini, sıçan izole duyuşal nöronlarında tüm hücre patch kenetleme elektrofizyolojisi ve in vivo olarak nosiseptif davranış hot plate testi kullanarak incelemektir.

Dorsal kök gangliyonları (DKG) 1-2 günlük yeni doğan sıçanların dekapitasyonundan sonra enzimatik ve mekanik işlemlerle tek hücrelere ayrıştırıldı. Patch kenetleme tekniğinin tüm hücre diyaliz modunun gerçekleştirilmesinden sonra, akım kenetleme deneylerinde istirahat membran potansiyeli kayıt edildi. LEV’in (30, 100 ve 300 μ M) membran potansiyeli ve aksiyon potansiyeli (AP) parametreleri (eşik, pik amplitüdü, süre, ard potansiyeller, AP ard potansiyelin % 63’üne düşme zamanı) ve pasif membran özellikleri üzerine etkisi incelendi. LEV bu parametreler üzerine etkisi doz bağımlıydı. 30 μ M LEV’in bu parametreler üzerine etkisi yokken, 100 ve 300 μ M

LEV istirahat membran potansiyeli hiperpolarizasyonuna neden olarak ve AP sonrası hiperpolarizasyon amplitüdünde ve input rezistansında önemli bir artış meydana getirdi (n=7, p<0.05).

İn vivo deneylerde hot plate analjezimetre kullanılarak nosiseptif davranış latansından ağrı eşiği belirlendi. LEV (60, 300 ve 900 mg/kg) normal farelerde ağrı eşiğini değiştirmede. Ancak diyabetik nöropati oluşturulan farelerde çok daha düşük dozlarında LEV (20, 100 ve 200 mg/kg) ağrı eşiğini önemli ölçüde artırdı (n=15, p<0.05).

Sonuç olarak; in vitro deneylerde hücrel biyofizik prosedürlerle elde edilen sonuçlar ve in vivo nosiseptif davranışsal test sonuçları uyumlu bir şekilde, yeni bir antiepileptik ajan olan levetirasetamın, nöropatik ağrı tedavisinde terapötik potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hücrel Elektrofizyoloji, Patch Kenetleme, İyon Kanalları, Levetirasetam, Aksiyon Potansiyeli, Uyarılabilirlik, Ağrı

2. ABSTRACT

Electrical excitability of plasma membrane and ionic basis of excitability, “membrane biophysics of excitable tissues”, are among to the topics of classical biophysics. Altered electrical activity at the level of neuronal membrane excitability involving voltage-dependent sodium, potassium and calcium channels may be underlying cause in variety of pathophysiological conditions including epilepsy and pain. Understanding and modification of the biophysical properties of these ion channels by chemical agents is of importance with respect to development of therapeutic approach against these conditions including anti-nociceptive therapy. Levetiracetam (LEV, ucb L059; C₈H₁₄N₂O₂) is a antiepileptic drug with a unique pharmacologic profile, seizure suppression in epilepsy. The aim of this study was to investigate the possible analgesic actions of the novel antiepileptic agent LEV in isolated sensory neurones using whole cell patch-clamp electrophysiology and in vivo by nociceptive behavioral “Hot-plate test”.

Dorsal root ganglia (DRG) were removed from 1-2 day old neonatal rats after decapitation and DRG neurones were isolated by enzymatic and mechanical procedures. In current clamp experiments, after establishing whole-cell mode of the patch clamp technique, resting membrane potentials were recorded. Effects of LEV (30, 100 and 300 μ M) on membrane potential and action potential (AP) parameters (thresholds, peak amplitude, duration, after potentials, decay time) and passive membrane properties (input resistance) were investigated. The effects of LEV on these parameters was dose dependent; 30 μ M LEV had no significant

effect on either parameter while 100 and 300 μM LEV caused hyperpolarization of the resting membrane potential, and caused a significant increase in mean amplitude of AP after hyperpolarisations and input resistance ($n=7$, $P<0.05$).

In in vivo experiments, hot plate analgesimeter was used to determine pain threshold from latency of the nociceptive behavior. LEV (60, 300 and 900 mg/kg) had no significant effect on the pain threshold in normal mouse ($n=8$, $P>0.05$). But, much lower doses of LEV (20, 100 and 200 mg/kg) significantly increased the pain threshold when diabetic neuropathy was induced ($n=15$, $P<0.05$).

In conclusion; results obtained by cellular biophysical procedures in in vitro experiments and in vivo behavioral tests with agreement suggest that the novel antiepileptic agent LEV may possess a therapeutic potential for the treatment of neuropathic pain.

Key words: Cellular Electrophysiology, Patch Clamp, Ion Channels, Levetiracetam, Action Potential, Excitability, Pain.

3. GİRİŞ

Organizmadaki bütün hücrelerde membranın iki tarafı arasında bir elektriksel potansiyel mevcuttur. Sinir ve kas hücreleri gibi bazı hücreler; “uyarılabilir” yani membranlarında elektrokimyasal impulslar oluşturarak bazı hallerde bu impulslar yardımıyla membran boyunca sinyalleri iletebilirler. Hücre dinlenim halinde iken, hücre içi ve hücre dışı ortamlar arasında varolan potansiyel farkının en önemli nedeni, hücre zarının Na^+ , K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} iyonlarına gösterdiği seçici geçirgenliktir. Bunun sonucunda bu iyonlar zarın iki tarafında farklı konsantrasyonlarda bulunurlar. 1791 yılında Luigi Galvani'nin kurbağalarda yaptığı deneylerde tanık olduğu elektriksel olayların temelinde de bu potansiyel fark yatar. Galvani'nin “hayvansal elektrik” adını verdiği biyoelektrik potansiyellerle ilgili çalışmalar, daha sonra Hodgkin ve Huxley'in mürekkep balığı dev aksonunda yaptığı çalışmalarla, uyarılabilir hücrelerdeki elektriksel fenomenlerin anlaşılmasını ve elektrofizyoloji alanında bir çığır açan *patch* kenetleme tekniğinin gelişmesine temel basamak teşkil etmiştir (87, 101, 112, 186).

Günümüzde laboratuarlarda kullanılan teknikler iyon geçişleri ve mekanizmaları hakkında detaylı bilgi vermektedir. Bu çalışmada kullanılan *patch* kenetleme tekniği iyon akımının elektriksel olarak ölçülebilmesi, aksiyon potansiyeli (AP) kaydı ve benzeri birçok elektrofizyolojik olayların belirlenmesiyle birlikte, iyonların rol aldığı patofizyolojik süreçlerin ortaya konarak tedavi hedeflerinin saptanmasında önemli ilerlemeler sağlamıştır.

3.1. Nöronlarda İstirahat Membran Potansiyeli

Canlılarda hücre dinlenim halinde iken, hücre içi ve hücre dışı arasında varolan potansiyel “istirahat membran potansiyeli” (İMP) olarak ifade edilir. Hücre zarının Na^+ , K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} ,a ne derece geçirgen olduğunu belirleyen "permeabilite" terimi, her bir iyonun konsantrasyon gradyentlerinin, denge halinde ortaya çıkacak potansiyel farkına ne kadar katkıda bulunacağını tayin eder. İstirahat halinde K^+ 'un hücre zarından, Na^+ göre 50-100 kat daha kolay geçebildiği bilinmektedir. K^+ konsantrasyonu hücre içinde yüksek, hücre dışında ise düşük konsantrasyondaiken, Na^+ , Cl^- ve Ca^{+2} konsantrasyonları ise K^+ 'un tam aksine hücre içinde düşük konsantrasyona, hücre dışında ise yüksek konsantrasyona sahiptir. Hücrenin sahip olduğu İMP, K^+ denge potansiyeline çok yakındır. Nernst iyon dengesi olarak ifade edilen, bir iyonun elektriksel olarak denge durumuna gelmesi ve net difzyonu önleyecek olan potansiyel, membranın iki tarafındaki iyonların konsantrasyonu ile tayin edilir.

Membrandan karşılıklı geçen iyonların her birinin konsantrasyon gradyenti, membran potansiyeli voltajının hesaplanmasına yardım eder. Voltajın saptanmasında her bir iyonun önemi, o iyonun karşı membran geçirgenliği ile doğru orantılıdır. Böylece eğer membran K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} iyonlarına geçirgen değilse, sadece Na^+ konsantrasyon gradyenti membran potansiyelini belirler ve sonuçta gelişen potansiyel, Na^+ için Nernst potansiyeline eşit olur. Aynı ilke diğer iyonlar için de geçerlidir.

3.2. Nöronlarda İyon Homeostazisi

Membranın her iki tarafında bulunan iyonlar pek çok hücrel fizyolojik aktivitenin düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Nöronal uyarılabilme, sinaptik plastisite, hücre içi pH, hücre hacmi, sinir eksitabilitesi, İMP'nin belirlenmesi ve düzenlenmesi, hücrel gelişme, başkalaşma, büyüme, dölleme, hücre bölünmesi, kas kasılması, nörotransmitter saliverilmesi, gen ekspresyonu, duyuşal transdüksiyon, sekresyon, hücre ölümü bunlardan sadece birkaçıdır (14, 36, 114, 172, 206, 239).

Hücre içi iyon düzeyi; mitokondri, endoplazmik retikulum (geniş anlamda hücre içi depolar), iyon bağlayıcı proteinler ve membranda yer alan aktif pompaların belli bir düzen içinde çalışmalarını içeren kompleks bir homeostazis mekanizması ile kontrol edilmektedir (2, 67, 88, 98).

Hücrede meydana gelen iyon değışikliğı voltaj veya ligand bağımlı iyon kanalları aracılığıyla ya da hücre içi depolardan iyon saliverilmesi ile gerçekleşir. Değişen iyon konsantrasyonu, primer aktif transport olarak ifade edilen direk olarak ATP'den enerji kaynağı olarak yararlanan $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pompası, fosforilasyonla ATP'den indirek olarak faydalanan $\text{Na}^+\text{-Ca}^{+2}$, $\text{Na}^+\text{-H}^+$ değış tokuş pompası gibi pompalarla veya $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ iyonun birlikte hücre içine taşınımı ile sağlanır (28, 67, 166). Aynı zamanda membranın bir yanına Ca^{+2} ya da Na^+ , diğler yanına Mg^{+2} ya da K^+ taşıyarak katyon değışimi ve membranın bir yanına Cl^- diğler yanına HCO_3^- ya da SO_4^- taşıyarak anyon değışimi sağlayan zıt taşınma mekanizmaları da bulunmaktadır. Bu taşınma mekanizmaları hücrenin fonksiyonlarını sürdürebilmesi ve canlılığın devamı için çok önemlidir (67). Özellikle vücuttaki bütün hücrelerde bulunan $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pompası, hücre hacminin kontrolünde ve sinyal

iletimi için hücrenin hazır hale gelmesinde rol oynar (98). Elektrojenik özelliğe sahip olan bu pompanın çalışma düzeni şöyledir: Taşıyıcı proteine üç Na^+ bağlandığı zaman ATP'az fonksiyonu aktifleşerek ATP'ı ADP ve P^a ayrıştırmakta, bu parçalanmadan doğan yüksek enerji ise iki K^+ 'un taşıyıcı proteine bağlanarak hücre içine taşınmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP'az aktivitesinin dorsal kök gangliyonu (DKG) nöronlarının aksonlarında ve optik sinir aksonlarında aktivite bağımlı hiperpolarizasyona katkıda bulunur. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP'az aktivitesi tek bir AP'i takiben dahi, hiperpolarize edici etkiye sahiptir (200).

Nöronal hücre membranlarındaki çeşitli voltaj ve ligand kapılı iyon kanallarının tipi ve lokalizasyonu, bir nöronun elektriksel davranışını belirlemektedir. İyon kanallarından iyon geçişi, taşıyıcılar veya pompalarla yapılan iyon akışından yaklaşık olarak 10^6 kat daha hızlıdır. Dolayısıyla eş zamanlı olarak iyon kanalları veya pompalar aktive olsalar dahi muhtemelen akış oranı iyon kanallarına göre yaklaşık olarak $10^5 - 10^6$ kat daha düşük olacaktır (16).

3.3. Membran İyon Kanalları

Hücre zarlarındaki iyon kanalları iyon seçici moleküler gözeneklerdir (108, 110, 222). Kanalin yapısını meydana getiren integral proteinler, iç çeperi polar grup ve yüklü gruplarca kaplanmış, içi su dolu gözenekler oluşturmaktadırlar. Bu gözenekler genellikle bir iyondan daha geniştir. Ancak sınırlı bir bölgesinde atomik boyutlara kadar daralmakta, bu dar bölge iyon seçici bir filtre olarak davranmaktadır (238).

İyon kanalları açık ve kapalı olarak iki farklı konformasyona sahiptir. Kapının açılıp kapanması için gerekli konformasyon değişiklikleri, yüklü veya dipolar yapıdaki bir voltaj sensörünü etkileyen elektriksel kuvvetlerle, veya nörotransmitter moleküllerinin bağlanmasından kaynaklanan kimyasal kuvvetlerle yönetilirler. Bu kontrole göre de kanallar, voltaj bağımlı veya ligand bağımlı olarak adlandırılırlar. Bundan yaklaşık 30 yıl önce birkaç tane farklı iyon kanalı bilinirken, bugün moleküler biyoloji, farmakoloji ve biyofizik alanındaki gelişmelerle iyon kanalları ve alt tipleri hakkında yapılan çalışmalar çok sayıda iyon kanalı ve bu kanalların alt tipinin olduğunu ortaya koymuştur (183). Şöyle ki; sadece voltaj kapılı kalsiyum kanalı (VKKK) alt ünitesi olan $\alpha 1$ alt biriminin en az 10 alt tipinin olduğu bilinmektedir (43).

Molekül ağırlıkları 25000-250000 arasında değişen kanal proteinlerinin incelenmesinde kristalleşmeye yatkın olmadıklarından X ışını yöntemi pek kullanılmamaktadır. Bu çalışmada da kullanılan *patch* kenetleme yöntemi iyon kanallarının elektrofizyolojik ve farmakolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan en önemli inceleme yöntemleri arasında yer almaktadır (108, 110, 222).

Patch kenetleme yöntemi ile iyon kanallarının elektrofizyolojik ve farmakolojik özellikleri ve fonksiyonları belirlenebilmekte, AP ve iyon kanal akımı kayıtları da yapılabilmektedir. *Patch* kenetleme deneyleri ile akım kenetleme kayıt formunda AP'ni takip eden ard potansiyeller belirlenebilmektedir (19, 52, 62).

Uyarılabilir hücrelerde bulunan en önemli iyon kanalları Na^+ , K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} kanallarıdır. Bir zarda aynı tür iyonu geçiren farklı özelliklerde iyon kanalları bulunabilmektedir. Bir nöronun değişik bölgelerindeki kanal dağılımının farklılık

göstermesi, fonksiyon yönünden farklı işlevlere sahip olduğunu düşündürmektedir. Örneğin, Ca^{+2} kanalları sinir uçlarında çok yoğundur ve bu kanallardan hücre içine Ca^{+2} girişi ile transmitter salınımı sağlanır. Aşağıda Na^{+} , K^{+} , Cl^{-} ve Ca^{+2} iyon kanallarının çok genel biyofiziksel, farmakolojik ve moleküler özellikleri verilmiştir.

3.3.1 Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları

Voltaj kapılı sodyum kanalları (VKSK), AP'nin depolarizasyon safhasından sorumludur. Aynı zamanda membran kapasitans ve direncini de kompanze etmektedir. Farmakolojik ve biyofiziksel özelliklerine göre Na^{+} kanalları; hızlı, tetrodotoksin (TTX)'e duyarlı Na^{+} kanalları ve yavaş, TTX'e dirençli Na^{+} kanalları olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Moleküler olarak incelendiğinde 260 kD ağırlığa sahip olan α (α_{1-9}) alt birimleri ve 33-36 kD ağırlığa sahip olan β (β_{1-3}) alt birimleri bulunmaktadır. TTX dirençli Na^{+} kanal akımları DKG nöronlarında AP'nin hızlı depolarizasyon safhasına önemli katkısı bulunmazken, eşik stimulusya cevap ve İMP modulasyonuna etkisi bulunduğu bildirilmiştir (109). VKSK normal fizyolojik şartlarda eksitatör sinaptik ilettime neden olurken, bu kanalların aşırı uyarılması nöronal hasara yol açabilir (48). Bu nedenle bu kanal antagonistlerinin; bazı kronik ağrı durumunun tedavisinde, antiepileptik özellikler veya iskemi sonrası oluşan nöronal hasarın önlenmesinde yararlı olabileceği bildirilmiştir (23, 235, 236, 247). Şöyle ki; DKG nöronlarında aksonal hasarı takiben spontan aktivitede ve uyarılabilirlikte artma, Na^{+} kanallarının akümülasyonunda ve membran yoğunluğundaki artışla meydana gelir (58). Zira Na^{+} kanallarının en az 3 α alt birimi ve β (β_{1-3}) alt biriminin tamamı

DKG hücrelerinde belirlenmiştir (25, 51). Bilindiği gibi lokal anestezipler bu kanallar üzerine etkilidir. Çok sayıda nosiseptif, antiaritmik, nöroprotektif ve antikolvolzan ajana ilaveten lokal anestezi kullanımı bu kanalları (özellikle α_8 alt birimini) bloke ettiği bulunmuştur (60).

3.3.2. Proton Kapılı İyon Kanalları

Mekanosensör dejenere/epitel Na^+ kanal ailesine ait bir protein olduğu sanılan proton kapılı iyon kanalları (PKİK) yapısal olarak tekrarlayan 2 tane iç bileşenden oluşur. Bu kanallar ekstrasellüler pH seviyesindeki değişikliklerle (pH=7.4 ile 4) açılıp kapanmaktadırlar (253, 254).

Bunların çoğu alt biriminin DKG hücrelerinde eksprese olduğu bilinmektedir (özellikle de aside duyarlı iyon kanalları 1b (ADİK) ve ADİK-3). PKİK'nın alt birimleri şunlardır: Dorsal kök aside duyarlı iyon kanalları (DKADİK), memelilerde dejenere olmuş Na^+ kanal homologu olan ADİK-2 ve ADİK-4'dür (3, 89, 144, 255).

ADİK-3 miyelinsiz küçük çaplı peptiderjik nosiseptörler ve büyük çaplı mekonoreseptörlerin yanı sıra duyuusal sinir terminallerinde ve serbest sinir uçlarında da bulunmaktadır. Düşük pH değerinde Na^+ ve Ca^{+2} iyonlarına da açılan bu kanallar çok hızlı bir şekilde inaktive olurlar. Deriye dokunuşla stimule olan asit ve yüksek duyarlılıklı ağrı sinyallerinin tonik inhibisyonunda rol oynarlar. ADİK-3'ü mutasyona uğratılmış farelerde çok ciddi zedelenmelerde meydana gelen ağrı duyarlılığında değişme, çok yavaş bir dokunuşa bile aşırı hassasiyet ve şiddetli nosiseptif stimulasyona karşı davranışsal cevapta artış meydana gelmektedir (144). Tüylü foliküllerin sinir sonlarında ve DKG nöronlarında yer

alan ADİK-2 eksikliği olan farelerde ise; yavaş ve hızlı adapte olan mekanoreseptörlerin duyarlılığında azalma meydana gelmiştir. Bir diğer alt birimi hipofiz ve beyinden eksprese olan ADİK-4'dür (131, 255).

ADİK moleküler olarak incelendiğinde iki alt tipi bulunmaktadır. Birincisi beyinden eksprese olan α alt birimi, ikincisi ise sadece duyuşal nöronlardan salınan β alt tipidir. Ekstrasellüler asidifikasyonla çok hızlı şekilde aktive olan bu kanallar amilorid tarafından bloklanmaktadır. İyon geçirgenliği sırasıyla $\text{Na}^+ > \text{Ca}^{+2} > \text{K}^+$ şeklindedir (253, 254).

3.3.3. Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları

İMP oluşumundan ve AP'nin repolarizasyon safhasından sorumlu olan voltaj kapılı potasyum kanalları (VKPK), genel olarak İMP, AP ve postsinaptik potansiyele etki ederek nöronal uyarılabilirliği düzenler. Ayrıca VKPK, AP'nin frekansını ve keskinliğini de kontrol eder. Presinaptik VKPK beyinin tamamından hem ekstatör hem de inhibitör nörotransmitter salınımını düzenler. VKPK yapısında 6 tane transmembran bölge içerir. Bunlardan S4 bölgesi pozitif yüklüdür ve kanalın voltaj sensörünün bir bölümünü oluşturur. S5 ve S6 arasındaki iki ilave bileşen kanalın gözenek bölgesini oluşturur (135, 149, 178).

Moleküler olarak incelendiğinde α_{1-4} (125) ve β_{1-2} (77), alt birimleri bulunan VKPK alt tiplerinin ile ilgili çalışmalar VKPK'nı geçmiş-doğrultucu K^+ kanalları, içeri yönelik K^+ kanalları, hızlı geçici A tipi VKPK ve yavaş aktive olan VKPK şeklinde sınıflandırılmıştır. Aynı zamanda Ca^{+2} , ATP veya serotonin tarafından kapı kontrolü yapılan ligand kapılı K^+ kanalları ve bunlara ilaveten Na^+

bağımlı K^+ kanalları ve hücre hacmine duyarlı K^+ kanalları da bulunmaktadır (27, 34, 81).

K^+ kanal alt tiplerinin farmakolojik ajanlara karşı duyarlılıkları diğer tüm iyon kanalları alt tiplerinde olduğu gibi büyük ölçüde birbirlerinden farklıdır. Örneğin; geçikmiş-doğrultucu potasyum kanal blokörleri; 4-aminopiridin, dendrotoksin, fensiklidin, falloidin, 9-aminoakridin, margatoksin, imperator toksin ve karbodotoksin iken (195, 226), içeri yönelik K^+ kanallarının bloklanması spesifik blokerleri LY97241, Gabon engerek zehiri, Sr^{+2} , Ba^{+2} ve Cs^{+2} sağlamaktadır (91, 150). Ca^{+2} bağımlı K^+ kanallarının bloklanmasını ise iberiotoksin, tubokurarin, karibdotoksin, noksiustoksin, penitrem-A, tetraetilamonyum (TEA), apamin, leiurotoksin1, setiedil, trifloroperazin ve haloperidol neden olur. Aynı zamanda bu kanalın açıcıları arasında NS004, NS1619, DHS-1 yer almaktadır (35). Bunlara ilaveten Na^+ bağımlı K^+ kanallarını Mg^{+2} , Ba^{+2} , hücre hacminin artışıyla aktive olan hücre hacmine duyarlı K^+ kanallarını, kinidin, lidokain, setiedil, ATP duyarlı K^+ kanallarını ise glibenklamid, tolbutamid, fentolamin, siklazindol ve lidokain bloklar. ATP duyarlı K^+ kanal açıcıları ise levkromakalim, diazoksid, aprikalim ve pinasilidir (81, 153).

3.3.4. Klor Kanalları

Sinir terminallerinde Cl^- kanallarının presinaptik inhibisyonu düzenlediği bilinmektedir (68). Bu kanalların açılması toplam membran iletkenliğinin artmasına neden olur. Bu durum depolarizasyon üreten içeriye doğru akımların azalmasına yol açar (208). Uyarılabilir ve uyarılamaz hücrelerde siklik AMP

(sAMP) bağımlı, voltaj bağımlı ve Ca^{+2} bağımlı olmak üzere pek çok farklı tip Cl^- kanallarının olduğu tespit edilmiştir (246). Çeşitli sinir dokularının hücre membran yüzeyinde üç farklı tipte Cl^- kanalı bulunmuştur. GABA ve glisin kapılı Cl^- kanalları ile birleştirilmiş ligand kapılı Cl^- kanalları (120), voltaj bağımlı Cl^- kanalları (72), Ca^{+2} bağımlı veya Ca^{+2} 'la aktive olan Cl^- kanallarıdır (216). Klor kanalları için yüksek affiniteli ve selektif antagonist malesef çok azdır. Mevcut ajanların çoğu diğer katyon kanallarını da etkilediğinden selektif değildir. Bilinen en selektif ve güçlü antagonistler arasında niflumik asit, poliamin örümcek toksini olan argiotoksin-636 ve akrep venomunda izole edilen klorotoksin yer almaktadır (53, 56, 75).

3.3.5. Voltaj-Kapılı Kalsiyum Kanalları

VKKK nöronlarda hücre içine Ca^{+2} girişinin temel düzenleyicisidir. VKKK, Ca^{+2} girişiyle nörotransmitter salınımı, gen ekspresyonu, mRNA stabilitesi ve nöronal uyarlabilirlik gibi birçok Ca^{+2} bağımlı fonksiyonu kontrol etmektedir. Hücre içine olan aşırı Ca^{+2} akışı ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonu $[Ca^{2+}]_i$ 'un aşırı artışı, nöronal hasara yol açarak pek çok nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde rol oynar (172). $[Ca^{2+}]_i$ düzeyindeki artışlar ya voltaj ya da ligand bağımlı Ca^{+2} kanalları aracılığı ile hücre dışından Ca^{+2} girişi ya da hücre içi depolardan (inozitol 1,4,5 trifosfat (IP_3) ve ryanodin reseptörü/kalsiyum (RyR) salıverilme kanalı) Ca^{+2} salıverilmesi ile gerçekleşir.

Ca^{+2} kanal blokerlerinin kullanıldığı bir çok çalışma, bu maddelerin, ağrı ve değişik epilepsi modelleri ile birlikte penisilin kaynaklı hiperaktivitede de önleyici bir etki yaptıklarını ortaya koymaktadır (139).

Fizyoloji, farmakoloji ve moleküler biyoloji çalışmaları VKKK'nın çeşitli alt tiplerinin olduğunu ortaya koymuştur. Nöronal VKKK moleküler olarak; heteromerik komplekse sahip 3 veya 4 alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar; α_1 , $\alpha_2\delta$, β ve muhtemelen γ alt birimleridir (43). α_1 alt birimi voltaj saptayıcılığı ve Ca^{+2} 'a geçirgen gözenekleriyle Ca^{+2} akışının kontrolünü yapar (173). Bu alt birim aynı zamanda kritik voltaj duyarlılığına da sahiptir. Bu da çoğu farmakolojik ajan için etkileşim alanında, membran depolarizasyonu ile aktivasyonu mümkün kılar. Vucüttaki bir çok organda, farklı alt tipleri bulunmaktadır. Tablo 1'de nöronal VKKK'nın α_1 alt birimine göre sınıflandırılması ve bulunduğu bölgeler görülmektedir.

α_1 Alt Birimine Göre	Aktivasyon Özelliği	Biyofiziksel veya Farmakolojik tanımlama	Bulunduğu Bölge	Bloklayan Ajan
α_{1A}	YVA	P ve Q	beyin, motor nöronlar, böbrek	W-Agatoksin-IV-A
α_{1B}	YVA	N	merkezi ve periferik sinir sistemi	W-Conotoksin-GVI-A
α_{1C}	YVA	L	kalp, fibroblastlar, akciğerler ve düz kaslar	Dihidropiridin
α_{1D}	YVA	L	beyin pankreas, nöroendokrin sistem hücreleri	Dihidropiridin
α_{1E}	YVA	R	beyin ve kalp	SNX-482
α_{1F}	YVA	L veya ???	retinada	
α_{1G}	DVA	T	Beyin ve kalp	
α_{1H}, α_{1I}	DVA	T	iskelet kaslarındaki L tipi DHP reseptörlerinde	
α_{1S}	DVA	L	iskelet kası	Dihidropiridin

Tablo 3.1: Nöronal VKKK'nın α_1 alt birimine göre sınıflandırması (Kaynak 49'dan değiştirilerek alınmıştır) YVA: Yüksek Voltajla Aktive; DVA: Düşük Voltajla Aktive

3.3.5.1. Kalsiyum Kanal Tipleri

Kalsiyumun hücrel rollerinin farklılığı bütün bu hücrel mekanizmalardan sorumlu Ca^{+2} kanallarının özelliklerinin belirlenmesinde dikkatleri yoğunlaştırmış ve bu çalışmada kullanılan sıçan DKG hücrelerinin de dahil olduğu pek çok uyarılabilir hücrede kinetik, farmakolojik ve moleküler esaslar yönünden L, T, N, P, Q ve R tipi olmak üzere en az 6 farklı VKKK tespit edilmiştir (167, 243).

Çeşitli akrep ve yılanlardan izole edilen poliamin toksinler kullanılarak sıçan DKG nöronlarında Ca^{+2} kanallarının farmakolojisi araştırılmaya devam etmekte ve spesifik yeni ajanların keşif çabaları sürmektedir (215, 218).

3.3.5.1.1. L tipi kalsiyum kanalları

DKG hücrelerinde ilk keşfedilen Ca^{+2} kanalıdır. Yüksek voltajla aktive olur, depolarizasyonla inaktivasyonu çok azdır. İletkenliği oldukça yüksektir (25 pS) (85, 86). Alt birimleri α_{1C} , α_{1D} , α_{1F} veya α_{1S} , $\alpha_{2\delta}$, β_{3A} şeklindedir (9, 184). Dihidropiridin (DHP) agonist ve antagonistlerine duyarlıdır. Ayrıca fenilalkilaminler (verapamil), benzotiyazepinler (diltiazem) ve kalsiseptin ile bloklanırlar. Bulunduğu yerler iskelet kası (α_{1S}), beyin (sinir hücresi gövdesi ve proksimal dendritler; α_{1D}), kalp kası (α_{1C}), nöroendokrin hücreler (α_{1D}) ve retina (α_{1F})'dır. Kastaki genel işlevleri, uyarılma kasılma fonksiyonudur (47).

3.3.5.1.2. N tipi kalsiyum kanalları

Güçlü depolarizasyonla aktive olup, yavaş inaktive olurlar. İletkenliği 10-18 pS arasındadır. α_{1B} , $\alpha_{2\gamma}$, ve β_1 alt birimlerinden oluşurlar. ω -konotoksin GVIA

ve MVIIA ile seçimli olarak baskılanırlar (211). DHP'lere duyarsızdırlar. Nöronlarda presinaptik olarak bulunurlar. γ alt birimi içermezler ve 100 kD'luk bir alt birimleri vardır. Bu kanallar presinaptik sinir terminallerinden transmitter salınması işlevini yürütürler (171). Protein kinaz C (PKC), Ca^{+2} kanal aktivitesinin modülasyonunu N tipi kalsiyum kanalları üzerinden sağlar (157, 171).

3.3.5.1.3. P tipi kalsiyum kanalları

İlk defa purkinje hücrelerinde keşfedilen P tipi kalsiyum kanalları, α_{1A} , $\alpha_{2\delta}$ ve β_{4A} alt birimlerinden oluşurlar. Güçlü depolarizasyonla aktive olup, yavaş inaktive olurlar. İletkenlikleri 13-20 pS aralığındadır. ω -agotoksin IVA, tünel-ağlı örümcek venomu ve ω -konotoksin MVIIC ile seçimli olarak baskılanırlar. DHP ve ω -konotoksin GVIA'ya karşı duyarsızdırlar. Nöronlarda presinaptik zarda, Purkinje hücrelerinde yüksek α_{1A} alt birim derişimiyle ve sinir-kas kavşağında bulunurlar. Transmitter salınımından sorumludurlar (171, 240).

3.3.5.1.4. Q tipi kalsiyum kanalları

α_{1A} , $\alpha_{2\delta}$ ve β_{4A} alt birimlerinden oluşurlar. Güçlü depolarizasyonla aktive olup, yavaş inaktive olurlar. ω -konotoksin MVIIC'ye, P tipi kanallardan daha duyarlıdırlar. Şu anda bilinen seçici blokörleri yoktur. Beyincik granüler hücrelerinde ve hipokampus piramidal hücrelerinde bulunurlar ve transmitter salgılanmasında görevlidirler (10, 171).

3.3.5.1.5. R tipi kalsiyum kanalları

α_{1E} , $\alpha_{2\delta}$ ve β_{1B} alt birimlerinden oluşurlar. Yapılan ilk çalışmalarda rezistan olarak tanımlanan R tipi Ca^{+2} kanalları, yüksek eşığe sahip olduğundan güçlü depolarizasyonla aktive olurlar. İnaktivasyonları voltaj bağımlıdır. Seçici blokörü, Afrika tarantulası'ndan (*hysteroocrates gigas*) elde edilen SNX-482 peptididir (10, 193, 240, 259). R tipi Ca^{+2} kanalları transmitter salgılanmasında görevlidirler ve hipokampal nöronların ateşlemesine ve depolarize edici ard potansiyeline katkıda bulunurlar (55, 170).

3.3.5.1.6. T tipi kalsiyum kanalları

Zar dinlenim potansiyeline yakın depolarizasyonlarla aktive olan düşük eşikli kanallardır. Hızlı bir biçimde inaktive olurlar. Tekrar aktive olmaları için güçlü depolarizasyona ihtiyaç duyarlar. İletkenliği düşüktür (yaklaşık 8pS) (85, 86), α_{1G} (beyinde), α_{1H} (böbrek, karaciğer kardiyak nöronlarda) ve α_{1I} (beyinde) alt birimlerinden oluşurlar. Nikel iyonları, mibefradil ve kurtoksin (bir Güney Afrika akrebi olan *parabuthus transvaaliclfs*' dan elde edilen bir peptid) tarafından inaktive edilirler. DHP'e bağlanmazlar. İşlevi tam olarak bilinmemekle beraber, kalp kası ve nöronlarda ritmik aksiyon (pacemaker) potansiyellerinin oluşumunda ve intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonun düzenlenmesinde görev aldıkları kabul edilmektedir (171). Aynı zamanda GABA-B reseptör aracılığıyla diken ve dalga deşarjlarının üretiminde görev almaktadırlar (9).

3.3.5.2. Kalsiyum Kanal Alt Tiplerinin Moleküler Esasları

VKKK iskelet kasları, kalp ve çeşitli nöronlardan pürifiye edilerek klonlanmıştır. Bu kanalların α_1 esas protein alt yapısı ile $\alpha_{2\delta}$, β ve χ gibi yardımcı alt ünitelerin meydana getirdiği heterotrimerik komplekslerden oluştuğu tespit edilmiştir. Günümüze kadar α_1 esas alt ünitesinin de 10 farklı alt tipini kodlayan genler tespit edilmiştir (43). Hem yüksek voltajla aktive olan Ca^{+2} kanallarında (YVAKK, veya L-tipi) hem de düşük voltajla aktive olan Ca^{+2} kanallarında (DVAKK, T-tipi) moleküler bakımdan esas olan α_1 alt ünitesi kalsiyum selektif delik oluşturma, voltaj sensörü ve farmakolojik özellik bakımından tam bir fonksiyonel kanal oluşturma kapasitesindedir ve kanalın bu özelliklerini belirleyen alt ünitedir (173). α_1 alt ünitesinin özelliklerine göre voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarının sınıflandırılması tablo-3.1'de sunulmuştur. Bugün bilinen bütün VKKK'ları moleküler olarak klonlanmış ve fonksiyonel farklı Ca^{+2} kanallarının α_1 alt ünitesinden kaynaklandığı ortaya konmuştur (173). $\alpha_{2\delta}$, β ve χ alt ünitelerinin ise α_1 alt ünitesinden Ca^{+2} geçişini modüle ettikleri sanılmaktadır. β alt ünitesinin α_1 alt ünitesinden geçen Ca^{+2} akımının amplitüdünü normalize ettiği, ayrıca bu akımların voltaj bağımlılığını, aktivasyon ve inaktivasyon kinetiğini belirlediği bilinmektedir. β alt ünitesinin farklı tip Ca^{+2} kanallarının sitoplazmik kısımları ile değişik bağlantılara sahip olduğu tespit edilmiştir. $\alpha_{2\delta}$ alt ünitesi de VKKK'nın fonksiyonlarını belirlemede önemlidir (38, 39).

Kalp, pankreas, beyin, iskelet kası ve çeşitli nöronlardan Ca^{+2} kanallarının alt ünitelerinin klonlanma ve her bir ünitenin fonksiyonel önemini belirleme çalışmaları devam etmektedir (127).

3.4. Membran Uyarılabilirliği ve Aksiyon Potansiyeli

Depolarizasyonla aktive olan içe yönelik bir akım AP oluşturabilir. Klasik olarak bu durumdan normal fizyolojik şartlarda VKSK sorumludur. Ca^{2+} kanal aktivasyonu da içe yönelik akım oluşturur. Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu rejeneratif AP oluşumuna katkıda bulunur (5, 48).

VKSK'nın aktivasyonu ile başlatılan bir AP esnasında VKKK açılarak bu AP'nin süresini önemli ölçüde uzatabilir. Kardiyak hücrelerde çok belirgin olan bu durum nöronlarda da meydana gelmektedir. Bazı duyuşal nöronlarda AP süresindeki uzama TTX dirençli Na^{+} kanalının aktivasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır (212).

AP tepe noktasına ulaşınca Na^{+} kanalları kendiliğinden kapanmakta yani inaktive olmaktadır. Bu esnada tıpkı Na^{+} kanalları gibi depolarizasyonla aktive olan K^{+} kanalları açılmakta ve AP inen safhası yani repolarizasyon evresini meydana getirmektedir.

DKG nöronlarında aksonal hasarı takiben spontan aktivitede ve uyarılabilirlikte artma; Na^{+} kanallarının akümülyasyonunda ve membran yoğunluğunda artışla meydana gelirken, VKPK akımları, DKG nöronlarında periferel aksonal hasarı takiben azalmaktadır (58, 60). Bu etkinin nedeni, AP süresi ve AP sonrası oluşun hiperpolarize edici ard potansiyel süresinin değışmesidir (1,76, 143). Siyatik sinir bölünmesi ardından küçük ve orta büyüklükte çapa sahip DKG'nu K^{+} akımları % 60 oranında azalmıştır (1). Yine deriyi innerve eden büyük çaptaki DKG'nın K^{+} akımları hasarı takiben % 60-65 oranında azalmıştır (76).

Ayrıca sıçan DKG hücrelerinde depolarize edici ard potansiyellerin AP esnasında Ca^{+2} tetiklemeleli Ca^{+2} girişi ile bu nöronlarda aktive olması sonucunda

meydana geldiği ve uyarılabilirliği artırdığı gösterilmiştir (19). Bazı DKG hücrelerinde AP esnasında Ca^{+2} girişinin ise Ca^{+2} bağımlı K^+ kanallarının aktivasyonu ile hiperpolarize edici ard potansiyellerin aktive etmekte dolayısıyla uyarılabilirliği azaltmaktadır (19, 20). Diğer nöronlarda Ca^{+2} kanallarının bloklanması aksiyon potansiyeli süresini uzatır. Bunun yüksek iletkenlikli Ca^{+2} bağımlı K^+ kanallarının aktivasyonu sonucu oluştuğu sanılmaktadır (162).

Son yıllardaki çalışmalar inhibitör sinapsların anyonlarla, özellikle Cl^- iyonlarına geçirgen kanallar aracılığıyla işlediğini göstermiştir. Ancak özellikle ikinci haberci aracılığıyla gerçekleşen sinapslarda K^+ kanal açılması da önem arz etmektedir (207).

3.5. Membran İyon Kanallarının İyon Seçiciliği

Hücre zarlarındaki iyon kanallarının kesikli olarak çalışan, iyon seçici moleküler gözenekler olduğu bilinmektedir. İyon kanallarının en önemli biyofiziksel özelliklerinden biri de, hangi tip iyon kanalı ise o iyonla karşı seçici geçirgen özellik göstermeleridir. Bir iyon kanallının o iyonla karşı seçiciliğinde membranın her iki tarafındaki o iyonlarının elektrostatik olarak birbirini itmeleri teorisi kabul görmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu iyon kanallarının iyon seçiciliğine ilişkin çeşitli teoriler ortaya koymuştur. Buna göre Na^+ , K^+ ve Ca^{+2} kanallarının delik yüzeyinde yüksek affiniteli bağlanma bölgesinin olduğu ve bunu yandan kuşatan 2 adet düşük affiniteli bağlanma bölgesinin daha yer aldığı ve iyonun kanaldan geçişi esnasında büyük bir sıçrama hareketi yerine iki adet nispeten yavaş hareket gösterdiği teorisi ağırlık kazanmıştır. Bu teori iyon bağlanma bölgesine bağlanmada yarış esasına göre seçicilik gösterdiğini vurgular.

Öncelikli olarak Ca^{+2} kanalları için geliştirilen bu teori, Na^+ ve K^+ kanalları için de geçerlidir. Na^+ kanallarıyla ilgili diğer bir teoriye göre ise; katyonların kanalı geçmesinde kanal içindeki iyonlaşmış bir karboksil gurubu yardımcı olmaktadır. Bu gurup asidik ortamda bir proton bağlayarak negatif yükünü kaybedince kanal bloke olmaktadır. Kanalin en darlaştığı yerde bulunan bu karboksil gurubu ile hidrojen bağı yapabilen hidrosil veya amino guruplarını içeren pozitif yüklü iyonlarda Na^+ kanalından geçebilmektedir. Hidrojen bağı yapamayan metil gurubunu içeren pozitif yüklü iyonlar ise Na^+ kanalını geçememektedir (110, 183).

Bir kanal göreceli olarak zayıf da olsa birçok farklı türden iyonu geçirebilmektedir. İyon kanallarının farklı iyonlara karşı geçirgenlikleri birbirlerinden farklıdır. Örneğin; Na^+ kanalları H^+ 'e karşı oldukça geçirgen iken Ca^{+2} kanalları H^+ ile bloklanır. Na^+ kanallarının bazı iyonlara geçirgenliği sırasıyla $\text{H}^+ > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{OH-NH}_3 > \text{Tl}^+ > \text{H}_2\text{N-NH}_3 > \text{NH}_4 > \text{Ca}^{+2} > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ şeklinde iken, K^+ kanalının iyon geçirgenliği sırası ile $\text{Tl}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{NH}_4 > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{H}_2\text{N-NH}_3$ şeklindedir (110).

Ca^{+2} kanalları ise Ca^{+2} 'dan başka Ba^{+2} ve Sr^{+2} , a karşı ileri derecede geçirgendirler. Bu geçirgenlik hem voltaj kenetleme deneyleri ile hem de bu iki iyonun varlığında aktive edilen AP ile gösterilmiştir (110, 217). Cl^- kanallarının küçük anyonlara karşı geçirgenliğinin sırasıyla $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ şeklinde olduğu tespit edilmiştir (65).

Aynı zamanda iyon kanalları için iyonun hücre içi ve hücre dışı konsantrasyonu da önemli bir faktördür. Nernst denklemine göre belli potansiyelden sonra iyon zıtlanarak hücre içine girmeye veya hücre dışına

çıkmaya başlamaktadır.

3.6. Membran İyon Kanallarının Farmakolojisi

Membran akımlarının spesifik farmakolojik ajanlarla bloklanabilmesi bu kanalların tanımlanmasında kullanılabilen önemli özelliklerdendir. Aynı zamanda bu farmakolojik ajanlar kullanılarak belli iyon kanallarının fizyolojik fonksiyonları tespit edilebilir. İyon kanalı üzerine etkili ajanlar bütün iyon kanalları için kanalı açan ajanlar (kanal açıcılar) ve kanalı kapatan ajanlar (kanal blokörleri) olmak üzere başlıca iki guruba ayrılabilir. İyon kanallarının ajanlarla özellikle poliamin toksinlerle bloklanması yukarıda kanalların alt tiplerinin farmakolojik olarak belirlenmesi bahsinde ele alınmıştır.

3.7. İyon Kanallarının Kapı Özellikleri

VKSK ve VKKK depolarizasyonla birlikte açılırlar. Bu açılma Ca^{+2} kanallarında Na^{+} kanalları kadar hızlı değildir. Depolarizasyon ile kanalların açılarak içe yönelik Na^{+} ve Ca^{+2} akımının gerçekleşmesi sırasında kısa bir gecikme olması kanalın açılmadan önce birden fazla kapalı durum değişikliğine uğradığını vurgulamaktadır. Depolarizasyonla açılan bir kanal hiperpolarizasyonla kapanır. Kanalın bu hiperpolarizasyonla kapanması durumu “deaktivasyon” olarak adlandırılır. Fakat şiddetli depolarizasyon gibi bazı durumlar voltaj bağımlı iyon kanallarının kapanmasını geciktirebilir (187).

VKPK akımları depolarizasyona karşı, Na^{+} kanallarına göre oldukça geç aktive olurlar ve membranın tekrar polarize olmasına sağlarlar. Aynı zamanda depolarizasyon sürdükçe Na^{+} kanalları kendiliğinden kapanırken K^{+} kanalları

açıktır.

Depolarizasyon esnasında gözlenen iyon kanal akımının zamanla başlangıçtaki aktivitesini kaybetmesi olayı “inaktivasyon” olarak adlandırılır. Yapılan çalışmalar devam eden depolarizasyon esnasında gözlenen aktivite düşüşünün sadece depolarizasyona değil aynı zamanda özellikle Ca^{+2} kanallarında kalsiyuma bağlı olarak da düşebildiğini göstermektedir (71). Aynı zamanda iyon kanalları voltaj bağımlı olarak yavaş bir şekilde inaktive olurlar (123).

Tüm hücre diyaliz *patch* kenetleme tekniği elektrofizyoloji alanında bir çığır açmasına rağmen, kullanılan *patch* pipeti solüsyonunun zamanla sitoplazma ile karışması bazı sitoplazmik faktörlerin seyreltilmiş olarak fonksiyonunun azalmasına yol açtığı tespit edilmiştir. Ancak solüsyonun bileşiğine ATP ve Ca^{+2} şelatörleri (EGTA) eklenerek bu etkinin önlenildiği tespit edilmiştir (45, 130). Bu durum çalışmada kullanılan solüsyonlar için göz önüne alınmıştır.

3.8. Dorsal Kök Gangliyonu Nöronlarının Sınıflandırılması ve Özellikleri

DKG nöronları AP ile somatosensoryel bilgiyi merkezi sinir sistemine taşımaktadır. Bu nöronların iki temel tipi bulunmaktadır. Birincisi non-nosiseptif nöronlar; bu nöronlar, düşük yoğunluklu, hasar oluşturmayan ve normalde ağrı vermeyen stimulusa cevap oluştururlar. İkincisi nosiseptif nöronlardır ki bunlar yüksek yoğunluklu, hasar oluşturucu ve normalde ağrı verici stimulusa karşı cevap oluştururlar (79). Hücresel elektrofizyoloji çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılan DKG, duyuşal nöronların elektrofizyolojik ve farmakolojik olarak incelenmesinde iyi bir model oluşturmuştur. Bu nedenle kedi (128), kobay

(66), fare (264), sıçan (18, 90) civciv (96) domuz (90) gibi farklı hayvan türlerinde DKG ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

DKG'ları, iletim hızına göre C (≤ 0.8 m/sn), A δ (1.5-6.5 m/sn) ve A α/β (>6.5 m/sn) şeklinde sınıflandırılmaktadır (79). DKG'ları ile ilgili yapılan çalışmalar farklı DKG nöronlarının farklı Na⁺ (78, 262), K⁺ (95) ve Ca⁺² kanal akımlarına sahip olduğunu göstermektedir (203, 259).

DKG'nun bir başka sınıflandırması ise çap boyutu açısından yapılmaktadır. DKG nöronları büyük çapa sahip (>50 μm çap), orta büyüklükte çapa sahip (30-50 μm çap) ve küçük çapa sahip (<30 μm çap) olmak üzere üç alt sınıfa ayrılmaktadır. DKG nöronlarında iyon akımlarının biyofiziksel özelliklerinin ve iyon kanal alt birimlerinin dağılımının hücre çapıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (41). Na⁺ kanallarıyla ilgili ağrı ve analjezi çalışmalarında küçük çaplı DKG nöronları kullanılması tercih edilmektedir. Bu tercihin nedeni, büyük ve orta çapa sahip DKG nöronlarına göre küçük çaplı nöronlarda daha fazla sayıda ve farklı tipte VKSK'nın eksprese olmasıdır (262). Yine DKG nöronlarında K⁺ kanalları ile ilgili yapılan çalışmalar, hücre çapıyla K⁺ kanal alt birimi yoğunluğu arasında ilişki olduğunu ortaya koymuştur (194). Ca⁺² kanalları ile ilgili yapılan çalışmalarda kanal alt birimi ve kanal yoğunluğunun DKG hücre çapıyla ilişkili olduğu bazı alt birimlerin küçük veya orta çaplı nöronlarda daha yoğun şekilde eksprese olurken bazı altbirimlerin büyük çaplı nöronlarda eksprese olduğu gösterilmiştir. Örneğin α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1E} , α_{1I} ve α_{1S} alt birimleri tüm DKG nöronlarından eksprese olurken, α_{1A} , α_{1D} , α_{1E} , α_{1I} and α_{1S} 'nin küçük çaplı DKG nöronlarında daha yoğun bir şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir. Yine α_1

ve $\alpha_2\delta$ alt birimleri küçük ve orta çaplı DKG'nda büyük çaplı DKG nöronlarına göre daha yoğun şekilde eksprese olmaktadır (265).

Bu tez çalışmasında hem yukarıda sayılan sebepler, hem membran kapasitesinin daha az olması hemde gigaohm ($G\Omega$) mertebesinde mühürlemenin ve kontrolün daha iyi gerçekleşmesi sebebiyle genellikle küçük ve orta çapa sahip DKG nöronları ile çalışılmıştır.

3.9. Ağrı

Ağrı (pain) Latince “poena” (ceza, intikam, işkence) sözcüğünden gelmekte olup, tanımı oldukça güçtür. Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği tarafından yapılan tanımlamaya göre ağrı; vücudun belirli bir bölgesinden kaynaklanan, bir doku harabiyetine bağlı olan veya olmayan, insanın geçmişteki deneyimleriyle de ilgili hoş olmayan emosyonel ve sensoryal bir duyudur (8).

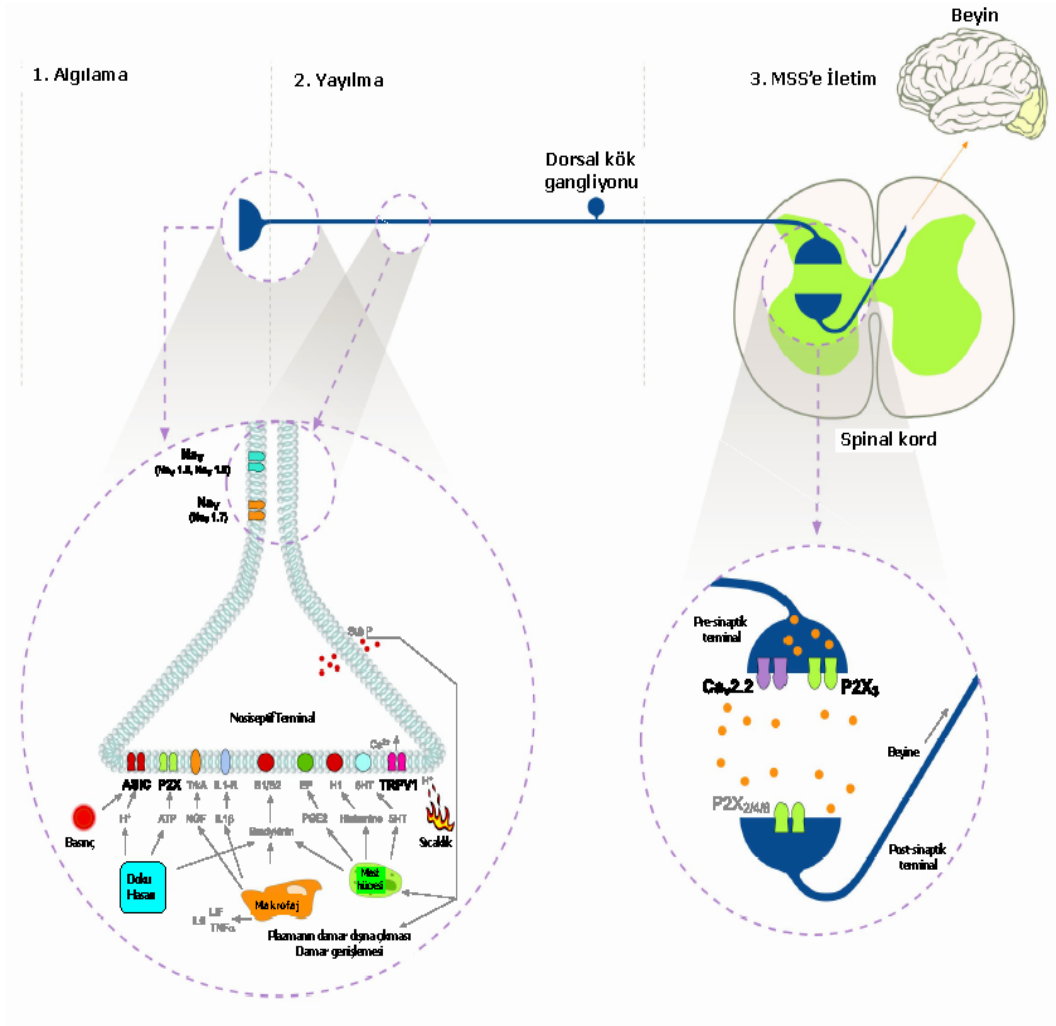
Bir başka tanıma göre ise ağrı; “bedenin içten ya da dıştan bir uyarı karşısında gösterdiği bir savunma mekanizması”dır. Böylelikle ağrı, vücut için bir şeylerin yolunda gitmediğinin sinyallerini veren koruyucu bir mekanizma olarak da düşünülmektedir (121). Ağrının algılanması, kişinin deneyimleri, ruhsal olarak içinde bulunduğu durum, eğitim, çevresel faktörler gibi birçok faktörden etkilenir. İşte bu yüzden ağrılı bir uyarana karşı yanıtta kişiden kişiye farklılıklar görülür. Birçok hasta, doku harabiyeti ve fizyopatolojik değişiklikler olmadan da ağrı duyduğunu belirtir. Bu duyuyu doku harabiyeti ile ortaya çıkan duyudan ayırt etmek mümkün değildir. Bu tip ağrıları hemen psikojenik kökenli ağrılar olarak tanımlamak doğru değildir. Ağrının önemli bir özelliği duyusal, yani sinir lifleri ile taşınan objektif bir olgu olması, diğer bir özelliği ise emosyonel, yani yukarıda

sözü edilen diğer tüm öğelerden etkilenmesidir. Tüm bu özellikleri, ağrıyı diğer bir çok semptomdan farklı olarak, öznel yani kişiye özgü hale getirir (267, 269).

3.9.1. Ağrı Tipleri ve Özellikleri

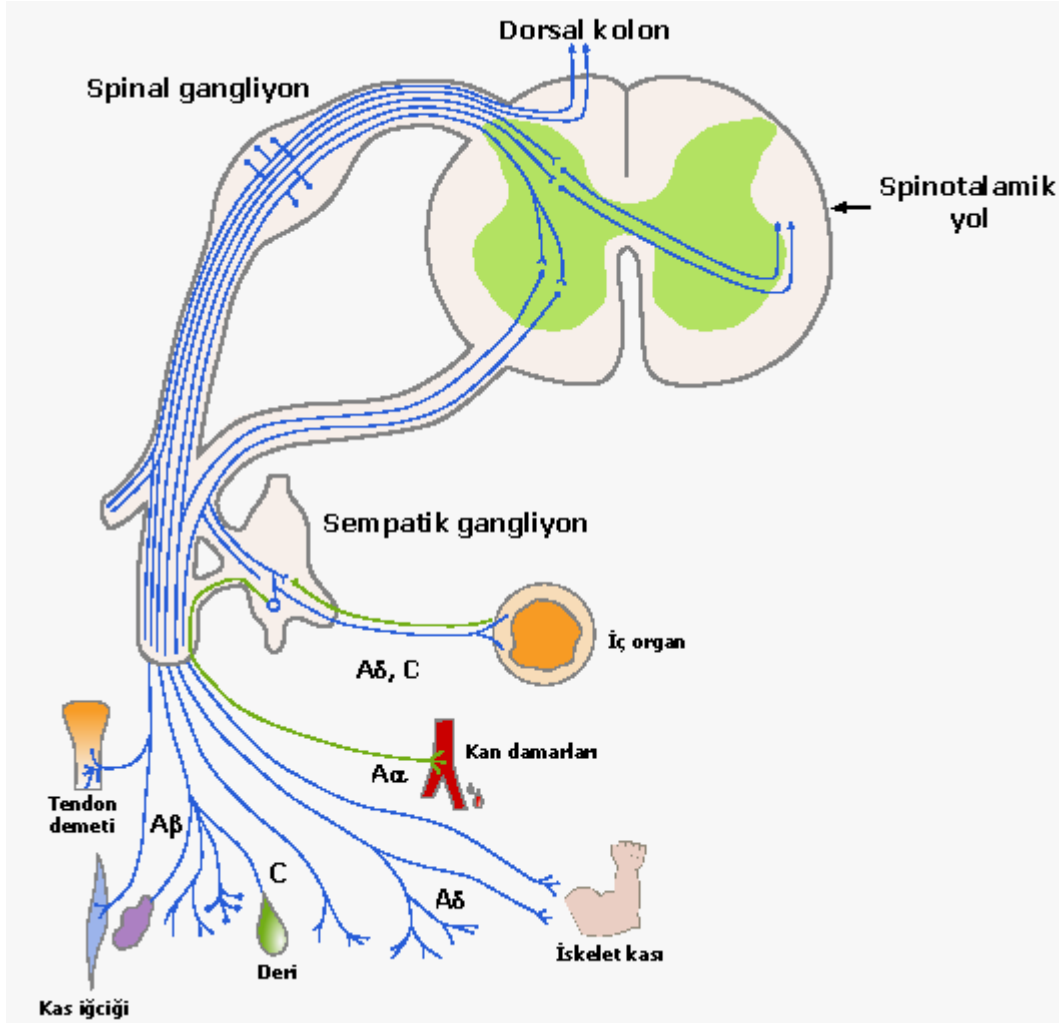
Ağrı duyusunun duyu organları, vücudun hemen her noktasında bulunan çıplak sinir uçlardır. Ağrı dürtüleri, merkezi sinir sistemine (MSS) dorsal kök gangliyon (DKG) nöronları ile taşınırlar. DKG nöronları fonksiyonel olarak üç subsellüler bölüme ayrılır.

1. Ağrı duyusuna neden olan stimulusu (mekanosensitizasyon, termal sensitizasyon, nosisepsiyon) algılayan nosiseptör periferel terminal.
2. Nosiseptif sinyali ileten akson.
3. Ağrı sinyalinin ilerleyip bir sonraki nörona ve beyine ulaşmasını sağlayan presinaptik terminal (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Ağrı sinyali yolu (Kaynak 94'den değiştirilerek alınmıştır).

Duyusal nöronların hücre gövdeleri üç dallıdır ve DKG'nuna yerleşmiştir (121). Primer duyusal nöronların morfolojik ve fonksiyonel olarak; $A\alpha/\beta$, $A\delta$ ve C tipi lifleri bulunmaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Duyusal Nöron Tipleri (Kaynak 94'den değiştirilerek alınmıştır).

Ağrı sinyalleri iletim hızlarına göre farklı tip liflerle taşınmaktadır. Hızlı ağrı sinyalleri miyelinli $A\delta$ lifleri (1.5-6.5 m/sn) ile, kronik ağrı sinyalleri ise yavaş miyelinsiz C tipi lifler (≤ 0.8 m/sn) ile medulla spinalise iletilirler (79, 104).

Kronik ağrılı hastalarda C tipi liflerin iletim hızının daha da düşük olduğu gösterilmiştir (179). C tipi lifler, arka köklerin lateral bölümünde yer alır ve çoğunlukla arka kök C lifleri olarak adlandırılır (6).

Ağrının çok çeşitli sınıflandırılmaları bulunmaktadır (98). Ancak bu tezde ağrı temel olarak iki tipte incelenmiştir. 1- Nosisseptif ağrı ve 2- Nöropatik ağrı

3.9.1.1. Nosisseptif Ağrı

Fizyopatolojik olayların deride, kasda, bağ dokusunda ve iç organlarda yaygın olarak bulunan ağrı reseptörlerini (nosisseptörler) uyarmasına bağlı olarak ortaya çıkar. Somatik ve visseral ağrı olarak iki tipi vardır. Bu ikisi arasındaki temel farklılık somatik ağrının duyuşal lifler ile visseral ağrının ise sempatik lifler ile taşınmasıdır. Somatik ağrı, sızlama şeklinde, bıçak batar gibi, zonklama, basınç hissi gibi tarif edilir. İç organlardan kaynaklanan ağrı, obstrüksiyona bağlı ise kemirici ve kramp şeklinde, organ kapsülü ve mezenteri etkilemişse sızlama ve zonklama şeklindedir.

3.9.1.2. Nöropatik Ağrı

Nöropatik ağrı yaklaşık olarak populasyonun % 1'ini etkilemektedir (8). Öncelikli olarak sinir sistemi lezyonu veya disfonksiyonunda meydana gelir. Nöropatik ağrı lezyon veya disfonksiyonun meydana geldiği yere bağlı olarak periferal veya santral olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Periferal nöropatik ağrıya metabolik hastalıklar neden olurken, santral nöropatik ağrıya spinal kord veya beyin hasarı neden olur (8).

Nöropatik ağrıda, ağrı spontan olarak ortaya çıkabilir. Ağrı eşiği düştüğü için normalde ağrısız olan uyarı ağrı yapabilir (allodini). Uyarıya cevap hem sürekli hem de amplitüd bakımından abartılı olabilir (hiperaljezi). Ağrı hissi sağlam bölgelere yansıyabilir (269). Sinir hasarını takiben meydana gelen nöropatik ağrının temel mekanizması belirlenememiştir. Ancak yapılan bazı *patch* kenetleme çalışmaları periferik sinir hasarını takiben DKG hücrelerinde uyarılabilirlikte artış olduğu ve DKG hücrelerinin anormal spontan aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur (37, 58, 62, 256).

3.9.2. Ağrının Bastırılması (Analjezi)

İnsanların ağrıya karşı gösterdikleri reaksiyon dereceleri çok değişiktir. Bu değişik davranışlar kısmen beynin kendisinin analjezi sistemi denen bir ağrı kontrol sistemini kontrol ederek, sinir sistemine giren ağrı sinyallerini bastırabilmesine bağlıdır. Periferik ağrı lifleri ile omurilikteki arka boynuz hücreleri arasındaki kavşak bağlantıları, oldukça önemli plastisite bölgeleridir. Bu nedenle arka boynuz, ağrı dürtülerinin “kapılandığı”, yani ağrı duyusunun şiddetinin denetlendiği değişikliğe uğradığı yer anlamında olmak üzere, kapı olarak adlandırılır. Ağrının başlatıldığı bir alandan gelen geniş çaplı afferent liflerin uyarılması ile o bölgeden gelen ağrı hafifler.

Hem C tipi hem de A δ liflerinin dorsal boynuzda sinaps yaptıkları yerlerde presinaptik inhibisyonuyla, analjezi sistemi ağrı sinyellerini omurilikte ilk giriş noktasından bloke edebilir. Ayrıca analjezi/nosisepsiyon indikasyonu ve hemeostazinin tekrar sağlanması için Ca⁺² kanal antagonistleri (192), proton kapılı kanal antagonistleri (253), VKSK antagonistleri (232), voltaj kapılı potasyum

kanal antagonistleri (182), glutamat reseptör antagonistleri (233) ve GABA'erjik, (159), kolinerjik (57) ve opioid reseptör (190) agonistleri kullanılmaktadır.

Akut ve kronik ağrının tedavisinde analjeziklerin iki önemli sınıfı olan opioidler ve nonstreoidal anti inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) kullanılabilir (64, 165, 168).

NSAİİ yaygın terapötik etkileri olan bileşiminde değişik yapıda guruplar içeren ilaçlardır. NSAİİ, araşidonik asitten prostoglandinlerin (PG) oluşumunu sağlayan siklooksijenazı (COX) inhibe ederler ve böylece inflamasyonu önlerler. Antipretik etkileri hipotalamusta PGE₂'nin inhibisyonuna bağlıdır. NSAİİ'in analjezik etkisine aracılık eden mekanizmalar belirsizdir ama görünüşte PG'leri azaltarak hiperaleji ve lokal ağrı liflerini stimülasyonuna aracılık etmektedirler.

Siklooksijenazın COX 1 ve 2 den oluşan iki formu vardır. COX-1 yapısal olarak eksprese olmaya meyilli iken, COX-2 ise inflamasyonla oluşur. COX-1 enzimi makrofajik yapısıyla PG üretimine neden olur. COX-2 enzimi, COX-1 den farklı olarak lokal antiinflamatuvar mediyatörler ve sitokinler tarafından indüklenerek PG üretir (12). Hay ve arkadaşları COX-2'nin spinal modülasyonla akut ve kronik periferel inflamasyonda düzenleyici bir rol oynayabileceğini, ancak COX-1'in böyle bir etkisinin olmadığını ortaya koymuşlardır (106). NSAİİ'in çoğu hem COX-1'i hem de COX-2'yi inhibe ederler. COX-1 bir çok hücrede bulunurken, özellikle kan damarları, mide ve böbreklerde daha fazla bulunmuştur. COX-2 insan dokularında önemli seviyelerde bulunmaz. COX-1 inhibisyonunun NSAİİ'in istenmeyen etkilerinin çoğundan sorumlu olduğuna inanılmaktadır. İnsanda NSAİİ'in gastrointestinal toksisite nedeninin COX-1 inhibisyonu olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle NSAİİ'in uzun süreli kullanımı yan etkileri nedeniyle

kısıtlanmıştır (258). Çalışmalar selektif COX-2 inhibitörleri geliştirmeye odaklanmıştır.

Nöropatik ağrı durumlarında, opioidler ve NSAİİ gibi antiepileptik ilaçlar (AEİ) da benzer şekilde ağrıyı azaltmaktadır. Özellikle kanserle ilişkilendirilmiş bazı nöropatik ağrı tiplerinde standart tedavi yöntemlerinin kullanılması oldukça zordur. Opioidlerin veya NSAİİ'nin kullanılması çoğu zaman ağrıyı gidermek yerine hastanın dayanılmaz ağrılar çekmesine neden olabilir. Bu ağrı tiplerinde antidepresanlar ve AEİ hem ağrıyı hem de kanserin oluşturduğu yan etkileri azaltabilir. Özellikle bu tür ağrılarda AEİ'dan biri olan levetirasetam (LEV) güvenli ve etkin bir profile sahiptir (69).

3.9.3. Ağrı Modelleri

Bir çok farklı nedenle ortaya çıkabilen ağrı mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi ve etkin tedavi yöntemlerinin araştırılabilmesi için deneysel ve hücresel olarak geliştirilen ağrı modelleri, ağrı araştırmalarında önemli bir yer tutmaktadır. Hayvanlarda deneysel olarak meydana getirilebilen değişik ağrı modelleri ve hücresel ağrı modelleri ağrı mekanizmasını anlama ve ağrıya müdahale etme konusunda değerli bilgiler sağlamaktadır (138).

3.9.3.1. Deneysel Ağrı Modelleri

Deneysel ağrı modelleri, çok değişik yollarla deney hayvanlarında oluşturulabilir; elektriksel stimulusla oluşturulan ağrı (102), ısıyla oluşturulan ağrı (242), kimyasal ajan uygulayarak oluşturulan ağrı (92, 263) bu metodların bazılarıdır. Bunların büyük bir kısmı, klinik ağrı sendromlarının deneysel

modelleri olarak kabul edilmekte ve bu özel alt tiplerin patofizyolojisini gün ışığına çıkarmak amacıyla kullanılmaktadırlar. Farklı veya benzer metodlarla oluşturulan deneysel ağrı modelleri şunlardır (138).

1. Termal uyarana karşı kuyruk veya ayak çekme modeli (örneğin; kuyruk çırpma testi)

2. *Hot plate* testi (Sıcak plaka modeli)

3. Mekaniksel duyarlılığı belirleme modeli (*Von-Frey* filament stimülasyonu)

4. Diş eti stimülasyonu modeli

5. Formalin, antijen, maya vb.den birinin ayak veya intra artikular enjeksiyon modeli

6. Tahriş edici bir maddenin intramusküler enjeksiyonu

7. Tahriş edici solusyonun intraperitoneal enjeksiyonu

8. Kemik içine osteolitik sarkoma hücrelerinin intramedullar enjeksiyonu

9. İçi oyuk organ distansiyonu

10. Deri kesilmesi

11. Periferik veya spinal sinir veya köklerinin ezilmesi veya sıkıştırılması

12. Periferik veya spinal sinir veya köklerinin kısmen veya tamamen transeksiyonu

3.9.3.2. Hücresel Ağrı Modelleri

Ağrının hücresel ve moleküller mekanizmasının anlaşılması çalışmalarında neonatal ve embriyonik sıçanlardan izole edilen duyuşal nöronların primer ve kalıcı kültürleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (19, 257, 111). Bu

tez çalışmasında da kullanılan DKG primer hücre kültürü, farklı hayvan türlerinden elde edilebilir. Kültüre edilmiş trigeminal ve DKG duyuşal nöronları ile yapılan çalışmalar, bu nöronların *in vivo* duyuşal nöronlarla benzer özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur. Şöyle ki; duyuşal nöronlarla yapılan hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar kapsaisin, bradikinin, P maddesi ve PG'e verilen cevapların bu çalışmalarda benzerlik gösterdiğini ortaya koymaktadır (21, 40, 228). Duyuşal nöronların primer kültürü bu nöronların doğuştan kazanılan bir çok özelliğini yansıtmaktadır. Ancak izolasyon prosedürü, hücre sayısının sınırlı olması ve primer kültürün heterojen yapıya sahip olması, primer hücre kültürüyle çalışmanın zorluklarından birkaçıdır. Bu nedenle endojen duyuşal nöronların özelliklerine sahip olan kalıcı duyuşal hücre dizileriyle çalışılmaktadır. Kalıcı duyuşal hücre dizileri; DKG ile retroviral vektör içeren *v-myc* onkojeni ile insan embriyonik duyuşal nöronlarının ölümsüzleştirilmesiyle elde edilebildiği gibi (196), postmitotik embriyonik veya yetişkin DKG duyuşal nöronlarının fare N18Tg2 neuroblastoma hücreleriyle etkileşimi ile ölümsüzleştirilmiş hücre dizileri olan F11 ve ND oluşturulabilir (189, 261).

3.10. Diyabet

Diabetes mellitus, insülin fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak ortaya çıkan karbonhidrat, lipit ve protein metabolizma bozukluğu ile karakterize bir hastalıktır. Diyabetin komplikasyonları, insülin homeostazisi ve enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stresin bir sonucu olarak meydana gelmektedir (88).

Diabetes mellitus 'un tip I ve tip II gibi sık rastlanan iki formu bulunur. Tip I diyabet insüline bağımlı bir diyabet hastalığı iken tip II diyabet insüline bağımlı olmayan ve ilerleyen yaşlarda ortaya çıkan bir diyabet hastalığıdır (88). Ayrıca pankreasın cerrahi olarak çıkarılması, pankreasın beta hücrelerinin seçici yıkımına neden olacak uygun dozlarda alloksan, streptozotosin (STZ) ya da diğer toksinlerin verilmesi, insülin sekresyonunu inhibe eden ilaçların verilmesi ve antiinsülin antikörlerinin verilmesiyle oluşturulabilir.

Diyabet periferik ve merkezi sinir sisteminde yapısal ve fonksiyonel hastalıklara neden olur (31). Öğrenme ve hafıza bozulması *diabetes mellitus*'lu erginlerde gözlemlenmiştir (197, 209, 244). Diyabet kronik hiperglisemi yoluyla bilişsel bozukluklara yol açar (231). Diyabetik hastaların beyinlerinde yapısal anormallikler vardır ki bunların bilişsel bozukluklarla bağlantılı olduğu bilinmektedir (31,93, 191). Tip I ve Tip II diyabet genel olarak vücudun tamamında sinir hasarına neden olur. Bu da çoğunlukla ayak parmaklarında, ayaklarda, ellerde ve kollarda ağrı ve uyuşukluğa yol açar (7). Amerika'da 14 milyondan daha fazla diyabet hastası ağrı verici diyabetik nöropati çekmektedir (213). Bu kronik ağrı durumu, ruhsal duruma, hareket kabiliyetine, çalışma ve uykuya olumsuz yönde etki ederek yaşam kalitesini düşürmektedir (213).

Deneysel diyabet modeli, alloksan ve STZ kullanılarak oluşturulabilir. Kimyasal maddelerin her ikisi de oksidan madde meydana getirerek Langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip eder. Bu tez çalışmasında da kullanılan bir glukonitrozüre olan STZ'nin etki mekanizması ise daha az anlaşılmıştır. Ancak STZ'nin uygun olmayan nitrik oksit (NO) cevapları meydana getirdiği, NO cevabının neden olduğu adacık hücre yıkımının artmasının diyabeti oluşturduğu

düşünülmektedir. STZ'le indüklenmiş diyabet insüline bağımlı tip I diyabet için bir deneysel model olarak karakterize edilir (219, 220). Bu modelde diyabetin yol açtığı ilerlemiş yapısal ve fonksiyonel anormalliklerin, hem periferel hem de merkezi sinir liflerinde meydana geldiği tanımlanmıştır (33, 224). Oksidatif stres diyabetik komplikasyonlar ve diyabetin altında yatan bir mekanizma olarak değerlendirilir. Oksidatif strese sebep olan serbest radikal gruplarından biri reaktif oksijen türleri (ROS)'dir. ROS diyabetlilerde yükselir. Bunun ana kaynakları glikoz otooksidasyonunun ve metabolitlerinin dahil olduğu metaboliklerdir. Bunların yanısıra ilerlemiş glikasyon, değişken prostanoid üretimi ve anormal veya etkisiz mitokondriyal fonksiyon vardır (155). Periferel sinirlerde yapılan çalışmalarda ROS'nin direk olarak nöronları ve schwann hücrelerini tahrip ettiği bulunmuştur. Bu durum diyabetle birlikte DKG'da ve onların mitokondrileri ve hücre vücutları üzerine kötü etkilerin yanısıra demiyelenizasyon ve aksonapati gibi kümülatif nörodejeneratif değişikliklere yol açabilmektedir (214).

3.11. Epilepsi

Epilepsi latince *epilambanein* kelimesinden gelmekte olup, nöbet veya atak manasına gelmektedir. Epilepsi dünya nüfusunun % 1'ini etkileyen nörolojik bir hastalıktır. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde 1990 yılı itibariyle tüm yaş gruplarında 2 milyondan fazla hasta tesbit edilmiştir (105). Hastalıkların ailesi olarak tanımlanan epilepsiyi meydana getiren mekanizmalar çeşitlidir. Epilepsinin en genel özelliği, nöronların aynı anda ve anormal deşarjıyla birlikte elektroansefologram ve davranışta meydana gelen değişikliktir (63). Nöronların

uyarılabilirliğindeki değişiklik hastalığın temelinde yatan en belirgin nörofizyolojik özelliktir.

Epileptik nöbetler esnasında kaydedilen beyin dalgalarının frekanslarında ve amplitüdlerinde oldukça belirgin değişiklikler olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir (145). Normalde her sinir hücresi ya kendiliğinden belli bir frekansta ya da diğer hücrelerden aldığı girdilerin cebirsel toplamına göre elektriksel boşalmı yapar. Fakat bazı durumlarda bu düzen bozulur ve büyük bir nöron topluluğunun birlikte (senkron) ve anormal biçimde boşalmı yapmaya başlamasıyla epileptik nöbetler ortaya çıkar. Eşzamanlı boşalmı, davranışlarda irade dışı geçici değişmelere de sebep olabilir. Anormal hücre boşalmının nedenleri arasında travma, oksijen yetmezliği, tümörler, enfeksiyonlar ve metabolik bozukluklar sayılabilir. Fakat epileptik durumların yaklaşık üçte birinde herhangi bir sebep bulmak mümkün olmamaktadır (132). Günümüzde kullanılan tedaviler genellikle bulguları gidermeye yönelik (semptomatik) karakterdedir ve halen kompleks parsiyel epilepsili hastaların üçte birinde nöbetler kontrol altına alınmamaktadır (148).

3.11.1. Epilepsi ve İyon Kanalları

Geçmiş yıllarda epilepside rol oynayan iyon kanallarının rolü ile ilgili araştırmaların sonuçları birbiriyle çelişkilidir. İnsan ve farelerde yapılan çalışmalar, iyon kanallarının epilepsi oluşumunda rol alabileceğini ortaya koymuştur (141, 230). Son yıllarda yapılan çalışmalar epilepside kullanılan AEİ'nin değişik iyon kanal alt tipleri aktivitesine etkilediğini göstermektedir. Bu çalışmalar yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesinde ve moleküler hedeflere odaklanmaktaki bilgilerimizi güncellemiştir (141, 230).

Episodik nörolojik bozukluklarda mutant iyon kanalları rol oynamaktadır. Özellikle aşırı derecede membran uyarılabilirliği bunun bir göstergesidir. Bir çok deneysel epilepsi modelinde aşırı hücre uyarılmanın hemen her zaman hücre içine giren Ca^{+2} iyonlarından kaynaklandığı düşünülmektedir (245). Ca^{+2} iyonlarının hücre içine girişi epileptik nöronal olayların ilk basamağını teşkil eder (229). Bir nöronun depolarizasyonu presinaptik VKKK'ından Ca^{+2} iyonunun hücre içerisine girmesine neden olur ve hücre içinde artan Ca^{+2} , eksitator nörotransmitterlerin, özellikle glutamatın salıverilmesine yol açar (245). Glutamat, kimyasal kapılı iyon kanallarını (NMDA, Kainat, Quisqualat), özellikle NMDA'yı uyararak Na^{+} ve Ca^{+2} iyonlarının hücre içine girmesine; Na^{+} iyonuna bağlı depolarizasyon oluşumuyla VKKK'nın açılması sonucunda aşırı Ca^{+2} iyonunun hücre içine girmesine sebep olur (122). Bu çok miktardaki Ca^{+2} iyonunun içeri girişinin, nöbet esnasında oluşan nöron deşarjını başlatan tetik olduğu düşünülmektedir (107). Nöbet esnasında ekstrasellüler Ca^{+2} 'un azaldığı ve intrasellüler Ca^{+2} 'un arttığı gösterilmiştir (107, 202). Ca^{+2} kanal blokerlerinin verildiği bir çok çalışma, bu maddelerin, değişik epilepsi modellerinde hiperaktiviteyi de önleyici bir etki yaptıklarını ortaya koymaktadır (250, 251, 252). Bir başka seçenek olarak, hücre dışı ortamdan Ca^{+2} 'un uzaklaştırılmasının da hücre ölümünü ve aşırı uyarılmayı azalttığı gösterilmiştir (210).

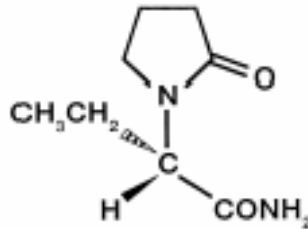
Yine bazı Na^{+} kanal antagonistlerinin, Na^{+} kanallarının aşırı uyarılmasını engelleyerek antiepileptik özellikler sergilediği, hatta iskemiye takiben nöronal hasarın önlenmesinde yararlı olabileceği gösterilmiştir (5, 48).

K^{+} kanalları ile yapılan çalışmalar benign ailesel neonatal konvülsiyona, K^{+} kanal mutasyonunun neden olabileceği ifade edilmiştir. Aynı zamanda K^{+} kanal

ligandlarının, epilepsi nöbetlerinin kontrol mekanizmasında VKKK antagonistleri kadar etkili olabileceği gösterilmiştir. Bunun nedeni VKPK agonist veya antagonistleri indirek olarak nörotransmitter salınması ve hareketindeki presinaptik Ca^{+2} girişiyle modifiye olmasıdır. VKPK merkezi sinir sisteminde çeşitli fonksiyonları düzenler. Bunların içinde; epileptik nöbet aktivitesinin ortadan kaldırılması veya kontrol edilmesi de olabilir. AEİ'nin muhtemel hedefleri arasında voltaj kapılı olmayan K^{+} kanallarının bazıları bulunabilir (30).

3.12. Levetirasetam

Levetirasetam (LEV, uc b L059; $C_8H_{14}N_2O_2$:170,21 g) nörotropik ajan olarak çok yaygın bir şekilde kullanılan piresetamın etil analogunun S-kimyasal bileşenidir (147).



Şekil 3.3: Levetirasetamın kimyasal yapısı

İnsanlarda farmakokinetik olarak maksimum plazma konsantrasyonuna 1 saat içinde ulaşan LEV, hem metabolizma hem de renal yolla vücuttan kolayca atılır (80, 185). 1989'dan bu yana lisans alan 8 yeni AEİ'dan biri olan LEV, epilepsi ve nöbet oluşumunu baskılayan eşsiz bir profile sahiptir (29, 126).

AEİ başta endokrin sistem olmak üzere diğer birçok fizyolojik sistemin fonksiyonunu olumsuz yönde etkilemektedir. AEİ'nin kısa ve uzun süreli meydana getirdiği bu yan etkilerinden bazıları; kilo değişikliği, üreme ve tiroid

fonksiyonuna etki, kemik metabolizmasının bozulması, uyku bozukluğu ve öğrenme ve hafızayı negatif yönde etkilemesidir. Yapılan bazı çalışmalar LEV'in kilo değişikliği üzerinde bir etkisi olmadığını, ve uykunun temel yapısını bozmadığını göstermektedir (26, 180). Aynı zamanda LEV klasik AEİ'dan farklı olarak öğrenme ve hafıza fonksiyonlarına etki etmemektedir (136). Bu yönüyle de LEV epilepsi hastalarının kognitif fonksiyonlarının olumsuz yönde etkilenmesini ortadan kaldırmaya aday bir ilaç olabilir. Fokal serebral iskemide nöroprotektif olarak görev yapar (103). Ayrıca kas guruplarının istem dışı düzensiz hareketleri (kore)'ni önemli ölçüde düzeltir. Bu yönüyle de koreik hareketlerin standart terapisinde alternatif bir model olabileceği belirtilmiştir (54).

Ağrı ve epilepsinin klinik bulguları birbirinden farklı olsa da, teorik olarak inhibitör ve ekstatör aminoasitler veya voltaj kapılı kanallar hem ağrı oluşumunda ve ağrının merkezi sinir sistemine iletilmesinde, hem de epilepsinin fizyopatolojisinde belirgin rol oynamaktadır. Bu nedenle bazı antikonvulzanların ağrı oluşumunu önlemede alternatif bir model olarak kullanılabilceği bildirilmiştir. Bununla beraber LEV'in duyuşal sinir hücrelerindeki elektrofizyolojik etkileri bilinmemektedir. DKG hücrelerindeki AP parametreleri üzerinde LEV'in ne tür değişikliklere sebep olduğunun araştırılması, bu ilacın ağrı iletim yollarındaki muhtemel etkilerinin belirlenmesini sağlayacaktır. LEV'in ağrı üzerindeki etkileriyle ilgili çok az bilgi mevcuttur. Yukarıda bahsedilen deneysel ağrı modellerinin kullanıldığı ve LEV'in etkilerini konu alan çok sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu nedenle, mevcut çalışma iki yönde odaklanmıştır. Birincisi, *in vitro* modelde, yavru sıçan DKG hücre kültürlerinde LEV'in AP ve bazı AP parametreleri üzerindeki olası etkilerini araştırmak,

ikincisi ise, *in vivo* modelde normal ve diyabet oluşturulmuş farelerde *hot plate* analjezimetre kullanılarak yine LEV'in farklı dozlarda analjezik etkisinin olup olmadığını belirlemek. Her iki modelden elde edilecek bulguların değerlendirilerek, LEV'in ağrı iletimi ve algılanmasındaki muhtemel etkisinin ne olduğunun ve kısmen etki mekanizmasının ortaya konması, ilacın epilepside kullanımı yanında muhtemel ağrı dindirici özelliğinin medikal yönden yeni açılımlara ışık tutabilecektir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında hem DKG primer hücre kültürü hazırlanarak hücrel ağrı modeli, hem de *hot plate* testi kullanılarak *in vivo* deneysel ağrı modeli oluşturuldu. Bu amaçla kullanılan iki farklı deney protokolünden ilkinde DKG hücrelerinden elektrofizyolojik kayıtlar alındı. Daha sonra normal ve diyabetik nöropati oluşturulmuş farelerde *hot plate* testi kullanılarak ağrı eşikleri belirlendi. Böylece hem *in vivo* hem de *in vitro* yöntemlerle LEV'in muhtemel ağrı dindirici etkisinin olup olmadığı incelendi.

4.1. *In Vitro* Elektrofizyolojik Deneyler

4.1.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinin Primer

Kültürü

Hücre içi elektrofizyolojik kayıt yapmak için mekanik stabilitenin sağlanması son derece önemlidir. *In vivo* olarak bu mekanik stabilitenin sağlamanın zorluğu araştırmacıları fizyolojik koşulların en üst düzeyde taklit edildiği ortamlarda tutulan izole doku ve hücrelerde çalışmaya itmiştir. Aynı zamanda hücre düzeyinde çalışma fizyolojik ve patofizyolojik mekanizmaların hücrel düzeyde aydınlatılmasına da imkan sağlar.

Bu çalışmada, sıçan DKG hücreleri enzimsel ve mekanik işlemlerle izole tek hücreler halinde elde edildi ve elektrofizyolojik kayıtlarda kullanıldı. DKG hücre izolasyon ve kültürü Forda ve Kelly (1985) adlı araştırmacıların geliştirdiği ve aşağıda ayrıntıları verilen metoda göre gerçekleştirildi (84).

4.1.1.1. Kùltür İçin Kullanılan Solùsyonlar ve Kimyasal Ajanlar

A) Steril Su: Çift distile suyun laminar hava akımlı gùvenlik kabini içerisinde 0.2 µm filtrelerden geirilmeyle elde edildi ve daha önceden otoklavda steril edilmiş cam şişelerde saklandı.

B) Etil Alkol: % 99.7 - % 100 saflıktaki etil alkol iki defa distile edilmiş suyla dilùye edilerek % 70'lik oranda hazırlandı ve pùskùrtmeli bir ağızlığı bulunan şişede tutuldu.

C) Steril Dulbeco'nun Tamponlanmış Fosfat Tuzu (PBS) (Amresco, Solon, Ohio, ABD; kalsiyum ve magnezyum içermeyen): 1 tablet PBS, 100 ml bidistile suyun içerisinde çözdürüldükten sonra 0.22 µm kalınlıktaki filtreden geçirilerek steril bir şişeye kondu. Hazırlanan PBS +4 °C'de 2 hafta boyunca saklandı ve ihtiyaç durumunda kullanıldı.

D) Poly-L-Ornitin (Sigma; Steinheim, Almanya): Poly-L-Ornitinin 25 mg/ml olacak şekilde stok solùsyonu hazırlandı ve 10 ml'lik steril řiře içerisine 100 µl gelecek şekilde bölünerek -20 °C 'de saklandı.

E) Laminin (Sigma; Steinheim, Almanya): Laminin 1 mg/ml stok hazırlandı ve 10 µl her bir 5 ml'lik steril cam şişeye gelecek şekilde bölündü. Bu 10 µl lik stoklar -70 °C'de tutuldu ve kùltür hazırlandığı gün lamellerin üzerine koymadan önce 2 ml steril PBS ilave edildi.

F) Ham's Nutrient Mixture F14 ve F12 (Imperial; Andover, Hampshire, İngiltere ve Gibco; Paisley, İskoçya): Hem F14 hem F12 kùltür ve duyuşal nùron çalışmaları için geliştirilmiştir. L-Glutamin içeren, NaHCO₃ içermeyen toz halindeki bu karışımlar, bidistile su ile sırasıyla 11.93 g/l ve 10.63 g/l olacak şekilde hazırlanarak 10 ml'lik kısımlara ayrıldı ve -20 °C 'de tutuldu.

G) At Serumu (Sigma; Steinheim, Almanya): At Serumu 10 ml steril tüplere konuldu ve -20 °C 'de saklandı.

H) Sodyumbikarbonat (NaHCO₃; MA=84.01g, Sigma; Steinheim, Almanya): Kültür medyumunun pH'sını ayarlamak amacıyla 1.2 mg/ml olacak şekilde medyuma ilave edildi.

I) Penisilin/Streptomisin (Sigma; Steinheim, Almanya): 5000 IU/ml penisilin ve 5000 µg/ml streptomisin olacak şekilde 1 ml'lik stoklar hazırlandı ve kültür medyumunu hazırlamada kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

J) Kollagenaz (Tip XI) (Sigma; Steinheim, Almanya): Steril su içerisinde %1.25 olacak şekilde dilüe edildi ve 1 ml'lik kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

K) Tripsin (Tip I) (Sigma; Steinheim, Almanya): Steril PBS içerisinde % 2.5 olacak şekilde dilüe edildi ve 1 ml'lik kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

L) Deoksiribonükleaz (DNAz, Tip IV) (Sigma; Steinheim, Almanya): Steril PBS içerisinde 1600 Kunitz/ml olacak konsantrasyonda hazırlandı ve 1 ml'lik kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

M) Sinir Büyütme Faktörü (NGF, 2.5S) (Sigma; Steinheim, Almanya): Sinir büyütme faktörü ilk olarak steril su içerisinde 100 µg/ml olacak konsantrasyonda hazırlandı ve bu solüsyon F14 içerisine 1 µg/ml olacak şekilde dilüe edildi. 500 µl'lik kısımlara ayrılarak -20 °C 'de saklandı.

Sinir büyüme faktörü embriyonik duyuşal ve sempatik nöronların yaşamını sürdürmesinde ve farklılaşmasında çok önemli bir yere sahiptir. Biyolojik fonksiyonların geniş spektrumunda yer alır (142).

4.1.1.2. Kültür Vasatı

100 mililitrelik bir kültür vasatı aşağıdaki bileŐimde hazırlandı:

10 ml at serumu

10 ml modifiye edilmiş Dulbeco medyumu

1 ml Penisilin/Streptomisin

120 mg NaHCO₃

Bu karıŐım distile su ilave edilerek 100 mililitreye tamamlandı, filtreden süzülerek sterilize edildi ve kullanılana kadar +4 °C'de saklandı. Her bir kültür yapılmadan önce bu solüsyon taze olarak hazırlandı.

4.1.1.3. Kültür İçin Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri

Sterilizasyon amacıyla 0.22 µm porlara sahip filtre

Steril geniş petri kutusu 94 x 16 mm ebata sahip, yuvarlak

Steril küçük petri kutusu 35 x 10 mm ebata sahip, yuvarlak

Steril 50 ml polipropilen koni tp

Steril 15 ml polipropilen koni tp

Cam mikroskop lameli 22 x 22 mm ebata sahip, kare

Cam Pastör pipeti, 150 mm. Uzunlukta

4.1.1.4. Diseksiyon malzemeleri

1 tane büyük makas, 220 mm uzunluğa sahip

1 tane küçük makas, 80 mm uzunluğa sahip

1 tane içi yaylı makas, ucu 12 mm uzunluğa sahip

1 tane 15 cm uzunluğa sahip forseps

1 tane ince uçlu düz forseps; 0.07x0.03 mm uca ve 12 cm uzunluğa sahip

1 tane ince uçlu eğri forseps; 0.07x0.03 mm uca ve 12 cm uzunluğa sahip

4.1.1.5. Diğer Ekipmanlar

Laminar hava akımlı güvenlik kabini, Sınıf II Laminar Flow (Bilser, Ankara),

Otomatik CO₂ inkübatörü, model: Heracell (Heraeus, Hanau, Almanya),

Diseksiyon mikroskobu, model: B061 (Olympus, Tokyo, Japonya),

Otomatik pipetler (2-20 µl, 20-200 µl ve 100-1000 µl),

Şarjlı pipet

4.1.1.6. Dorsal Kök Gangliyonu Hücre Kültürü İçin Genel

Prensipier

Hücre kültürü yapılması ve saklanması esnasında kontaminasyonlara karşı gerekli önlemler alındı. Bu amaçla kullanılan tüm cerrahi malzemeler, Pastör pipeti, cam saklama kapları, pipet ve pipet uçları otoklav (Nüve, Ankara) yardımıyla steril hale getirildi. Otoklavdan alınan malzemeler laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine konulmadan önce % 70'lik alkole tabi tutuldu ve laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine yerleştirildi. Steril halde temin edilen plastik malzemeler ise kullanılmadan önce % 70'lik alkol sprey üzerlerine sıkıldıktan sonra diğer cam malzemelerin yanına laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine yerleştirildi. Laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisindeki ultraviyole ışık kaynağı, kabinde hücre kültürü yapılmadığı zaman aralıklarında açık bırakıldı. Cerrahi malzemeler belirli periyotlarla, cam malzemeler ise her hücre

kültürü yapılmadan önce steril hale getirildi. Hücre kültürünün koyulacağı inkübatörün nemi, gaz düzeyi, sıcaklığı ve temizliğine özen gösterildi.

Hazırlanan tüm solüsyonların pH'sı pH metre (Thermo Orion, Beverly, ABD) ve osmolaritesi ozmometre (Gonotec, Berlin, Almanya) kullanılarak ölçüldü. Solüsyonların ve cam saklama kaplarının üzerine sırasıyla malzemenin ismi, hazırlandığı tarih ve hazırlayan kişinin isminin baş harfleri yazılarak işaretlendi.

4.1.1.7. Dorsal Kök Gangliyonu Hücre Kültürü Protokolü

Lameller kültür yapılmasından bir gün önce % 70'lik etanolden çıkartılarak laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisinde steril bir kurutma kağıdı üzerinde kurutuldu. Daha sonra 100 µl poly-L-ornitin (Sigma; 25 mg/ml stok solüsyon) 10 ml distile su ilave edildi ve bu sıvı 50 mm çapındaki steril bir petri kutusuna boşaltıldı. Kuruyan lameller alevden hızla geçirilerek bu poly-L-ornitin içeren sıvıya yerleştirildi ve bir gece 37 °C'de %95 hava, % 5 karbondioksit içeren nemli bir inkübatörde inkübe edildi. Ertesi gün lameller inkübatörden alındı ve laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisinde bir forsepsle tek tek tutularak ard arda yerleştirilmiş 3 petri kutusunun içerisindeki steril distile suya daldırılarak yıkandı ve kurutma kağıdı üzerine yerleştirildi. Kuruyan lameller her petri kutusuna bir tane lamel gelecek şekilde 12 adet 35 mm çapında steril petri kutusuna yerleştirildi. Hücrelerin yaşının ve vasatın değiştirilme günlerinin belirlenmesi için kültür tablası üzerine kültürün hazırlanış tarihi yazıldı. 100 µl laminin (5 µg/ml) her bir lamel üzerine ilave edilerek kültür tablası inkübatöre kaldırıldı. Aynı gün kültür vasatı da hazırlanarak bir kısım

kültür medyumu (yaklaşık 40 ml) ve 10 ml fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu suda (PBS) steril bir plastik tüp içerisinde ısınması amacıyla inkübatöre yerleştirildi. Diseksiyon mikroskobu ve diseksiyon cerrahi seti dezenfekte edilerek laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine alındı.

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edilen iki günlük Wistar cinsi sıçanlar dekapitasyonla öldürülerek, geniş bir petri kutusuna yerleştirildi. Küçük bir makasla vertebral kolon ayrıldı, daha sonra kaudal uçtan başlayarak boyuna kadar spinal kolonun içi yaylı bir küçük makasla açıldı. Bu izole spinal kolon petri kutularına yerleştirilmiş PBS ile 3 defa yıkandı. Daha sonra diseksiyon mikroskobu altında forsepslerle bütün DKG'ları hassas bir şekilde izole edilerek küçük bir petri kutusu içerisindeki kültür vasatına yerleştirildi.

Bütün DKG gövdeleri diseke edilerek petri kutusunda toplandıktan sonra, petri kutusu hassas yuvarlak hareketlerle sallandı ve bütün gangliyonların bir araya toplanması sağlandıktan sonra kültür medyumu bir Pastör pipeti ile çekildi ve 900 µl ılık (37 °C'de inkübe edilmiş) kültür vasatı ve 100 µl kollagenaz (% 0.125) ilave edilerek hafifçe çalkalandı ve 13 dakika süreyle inkübatörde tutuldu. Bu süre sonunda hücre, solüsyon, enzim karışımı inkübatörden alınarak hızla üç defa PBS ile yıkandı. Daha sonra 900 µl PBS ve 100 µl tripsin (% 0.25) ilave edilerek hafifçe çalkalandı ve 6 dakika süreyle inkübe edildikten sonra 15 ml'lik steril plastik tüpe aktarıldı ve yaklaşık 4 ml ılık kültür vasatı ilave edildi, gangliyonlar tüpün dibine çöktürüldükten sonra kültür vasatı Pastör pipeti ile uzaklaştırıldı ve bu işlem 3 defa tekrarlandı. Daha sonra 100 µl DNAz ve 900 µl kültür medyumu ilave edilerek ucu daraltılmış steril bir Pastör pipetine hızla çekip

boşaltarak gangliyonlar mekanik olarak tek hücrelere ayrıştırıldı. Bu çekip boşaltma işlemi 3-6-9 defa kademeli olarak yapıldı. Her bir kademede üstte kalan süspansiyon alınarak diğer gangliyonlara mekanik tiritasyon işlemi devam edildi. Şayet gangliyon topağı tam olarak 9 çekip boşaltmadan sonra ayrılmadıysa bu işleme 14 defaya kadar devam edildi. Hücre kültür vasatı süspansiyonu, kültür vasatı ilave edilerek 2.4 ml'ye tamamlandı. Daha sonra inkübasyon için daha önceden lamininle kaplanan lamellerin bulunduğu küçük petri kutuları inkübatörden alındı. Lamellerin laminin ile inkübasyon zamanı en az 3-4 saat olduğu için dekapitasyon işlemine başlamadan yaklaşık olarak en az 2 saat önce laminin ekim işlemi tamamlandı. Laminin içeren sıvının büyük bir kısmı lamellerden uzaklaştırıldıktan sonra hücre süspansiyonu bulunan solüsyona 240 µl sinir büyütme faktörü (NGF) ilave edildi ve her lamele 200 µl hücre içeren bu solüsyondan ekildi ve bir akşam süreyle inkübatöre kaldırıldı. Ertesi sabah her bir petri kutusuna NGF ihtiva eden ılık kültür vasatı ilave edildi ve tekrar inkübatöre kaldırıldı. Bu işlem esnasında her bir petriye 1.5 ml kültür medyumu ve 10 µl NGF (Toplam 18 ml kültür medyumu 120 µl NGF) ilave edildi. Takip eden 5-7 günde her petri kutusundaki 1.5 ml kültür vasatı çekilerek NGF (10 mikrolitre NGF/petri kutusu) içeren yeni kültür vasatı ilave edildi. DKG hücreleri elektrofizyolojik kayıtlar için 24 saat sonra kullanılmaya başlandı. Genel olarak DKG hücre kültürünün hazırlanmasını takip eden ilk 3 gün içinde elektrofizyolojik kayıtlar alındı.

4.1.2. Elektrofizyoloji

4.1.2.1. Elektrofizyolojik Deney Düzenegi ve Protokoller

Bu çalışmadaki deneyler tüm hücre diyaliz *patch* kenetleme tekniği ile gerçekleştirildi (101). Hücre membranı ile pipet ucu arasında *giga-seal* olarak ifade edilen yüksek dirençli bir mühür gerçekleştirilmesinden sonra sisteme bağlı bir ince hortum aracılığı ile uygulanan negatif basınçla hücre membranı hasara uğratarak tüm hücre diyaliz *patch* kenetleme formu gerçekleştirildi. Böylece pipet içeriği ile hücre sitoplazması arasında kesintisiz temas sağlandı. Bu konfigürasyonun gerçekleştirilmesinde negatif basınç uygulamasının yanında bazı hücrelerde kısa süreli yüksek amplitütlü negatif akım enjeksiyonları, "zapping" ile mühür bölgesinde membran hasara uğrattıldı.

Bütün deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirildi (20-23 °C). Akım kenetleme Axoclamp-2B (Axon Instruments, Foster, CA, ABD) *patch* kenetleme amplifikatörü ile amplifikatörün akım kenetleme (*current clamp*) modu kullanılarak gerçekleştirildi. Akım kenetleme modu vasıtasıyla, membran potansiyeli kaydı, input rezistansı, AP ve AP sonrası potansiyeller kayıt edildi.

Elektrofizyolojik kayıt alınan DKG hücreleri düşük volümlü (<1 ml) bir ekstraselüler kayıt (banyo) solüsyonunda tutuldu. Bu düşük volüm pipet kapasitansını sınırlandırmasına katkıda bulundu. Düşük rezistanslı *patch* pipetleri Pireks borosilicat cam çubuklardan (1.5 mm dış çap, 0.86 mm olan iç çapı içerisinde 0.15 mm fibril içeren, 80 mm uzunluğunda, Science Products, Model: GB150F-8P, Hofheim, Almanya) imal edilmiştir. *Patch* pipetler üç kademedeyatay çekme esasına sahip pipet çekici ile çekildi (Sutter Inst. Model P97, Novato, CA, ABD). 3-8 Megaohm (MΩ) direncinde olan pipetler KCl esaslı hücre içi

patch pipet solüsyonu ile dolduruldu. Pipetler sadece bir hücreden kayıt almak için kullanıldı. Her bir kayıta yeni bir pipet kullanıldı. Hem hücre dışı hem de hücre içi solüsyonlar delik büyüklüğü 0.22 µm olan filtrelerden (Milipore) süzüldü ve 1 ml'lik plastik enjektörlere kondu. Bu enjektörlerin uç kısmına takılan plastik çok ince uçlar yardımıyla *patch* pipeti, hücre içi *patch* pipet solüsyonuyla dolduruldu. Bu hücre içi *patch* pipet solüsyonunun içeriği aşağıda detaylı olarak verilmiştir. Hem pipet içerisinde hem de pipet tutucu içerisinde herhangi bir hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Pipet tutucu (HL-1-17 pipette holder, Axon Instruments, Foster, CA, ABD) 1M KCl ile dolduruldu. Pipet sıkıca yerleştirilen pipet tutucu, CV-4 1/100 *headstage* (Axon Instruments, Foster, CA, ABD) içerisine yerleştirildi. Pipet tutucunun kenarında mühür oluşturma esnasında negatif basınç uygulamaya ait kısım bir silikon hortum ile 1ml'lik bir şırıngaya bağlantılıydı. Bu *headstage* de pipeti sağa-sola, ileri-geri ve aşağı-yukarı hassas hareket ettirmeye yarayan üç boyutlu bir mikrooyunatıcıya (Narashige MX-3L, Herts, İngiltere) monte edildi. Ekstrasellüler ilaç uygulaması için kullanılan diğer pipet ise ileri-geri hassas hareket eden ancak aşağı-yukarı ve sağa-sola daha az hassasiyete sahip bir başka mikrooyunatıcıya monte edildi.

Mikrooyunatıcılar, ters mikroskop (X40 oküler X objektif toplam büyütme) sahip, Nikon, Tokyo, Japonya) mekanik stabiliteyi sağlamak amacıyla titreşim önleyici bir elektrofizyolojik masa (Intracel, Herts, İngiltere) üzerine yerleştirildi. Elektriksel gürültüyü azaltmak amacıyla elektrofizyolojik masa ve üzerindeki cihazlar Faraday kafesi (Fırat Tıp Merkezi Biyomedikal Ünitesi, Elazığ) aracılığı ile topraklandı. Elektrotlar ile amplifikatör arasındaki elektriksel temas Ag-AgCl elektrotu, pipet tutucu içerisindeki kablo ve KCl banyosu ile

sağlandı. Ekstraselüler kayıt solüsyonu ile KCl banyosu arasındaki temas ise agar-KCl köprüsü ile sağlandı (3% agar içeren borosilicat cam tüp 1M KCl içerisinde hazırlandı ve kullanımda olmadığı zaman sürekli olarak 1 M KCl içinde saklandı).

Kültüre DKG sinir hücreleri elektrofizyolojik kayıt için inkübatörden alındıklarında kayıta başlamadan önce 5 dakika aralıklarla ekstraselüler kayıt solüsyonu ile 3 defa yıkandı. Ekstraselüler kayıt solüsyonunun oda sıcaklığında olmasına özen gösterildi. Tüm hücre diyaliz modunun gerçekleştirilmesinden sonra, akım kenetleme deneylerinde istirahat membran potansiyeli ölçüldü. Bu tezde genelde 10 dakikayı aşmayan deney protokolü uygulanmasına rağmen bu çalışmada kullanılan deney koşullarında tek bir canlı DKG hücresinden 3-4 saat süreyle kayıt alınabilmektedir.

4.1.2.2. Akım Kenetleme Deneyleri İçin Kayıt Solüsyonları:

Membran potansiyeli, input rezistansı, AP'leri ve AP ard potansiyelleri ile ilgili deneylerde hücrenin iyonik dengesi genelde değiştirilmeyerek fizyolojik koşullar ve homeostazis maksimum derecede taklit edildi. Bu amaçla aşağıda içerikleri verilen hücre içi ve hücre dışı kayıt solüsyonları kullanılmıştır (19).

4.1.2.2.1. Akım Kenetleme Deneyleri İçin Patch Pipeti (Hücre İçi)

Solüsyonu

KCl	140 mM
CaCl ₂	0.1 mM
MgCl ₂	1 mM
ATP	1 mM
EGTA	1.1 mM
HEPES	10 mM

TRIS kullanılarak pH 7.4'e, osmolarite ise sukroz ilave edilerek 310 mOsm/l'ye ayarlandı.

4.1.2.2.2. Akım Kenetleme Deneyleri İçin Ekstrasellüler Kayıt

Solüsyonu

NaCl	130 mM
KCl	3 mM
MgCl ₂	0.6 mM
CaCl ₂	2 mM
NaHCO ₃	1 mM
HEPES	10 mM
Glikoz	5 mM

NaOH kullanılarak pH 7.4'e, sukroz ilave ederek osmolarite 310-320 mOsm/l'ye ayarlandı.

Hücre içi ve hücre dışı kayıt solüsyonu genelde aynı gün hazırlanarak pH ve osmolariteleri ölçüldü. 0.22 µm çapında delikleri olan bir filtreden süzülerek büyük partiküllerin *patch* kenedi için problem oluşturması önledi. Solüsyonlar 50 ml'lik kısımlar halinde derin dondurucuda saklandı.

4.1.2.3. Tüm Hücre Diyaliz Akım Kenetleme Modunda Aksiyon Potansiyellerinin Kayıt Edilmesi

Tüm hücre diyaliz *patch* kenetleme tekniği voltaj kenetleme formunda alışlagelmiş yöntemlere göre düşük dirençli mikro pipetler kullandığından daha iyi bir kontrol imkanı sağlamaktadır. Ayrıca, tüm hücre diyaliz *patch* kenetleme yöntemi hücre içi ortamın içeriğinin bir dereceye kadar kontrol ve maniple edilmesini de mümkün kılmaktadır. İlave olarak yukarıda da bahsedildiği gibi etkisi araştırılan farmakolojik ajan bu yöntemle istendiğinde direk olarak hücre içine uygulanabilir.

Seçilen DKG hücresi ters mikroskopun görüntü alanının ortasına yerleştirildi. Daha sonra *patch* pipeti mikrooyuncu (Narishige, Herts, İngiltere) aracılığı ile önce kayıt solüsyonu içerisine ve kademeli olarak da hücre üzerine yerleştirildi. *Patch* kenetleme amplifikatörü Axoclamp 2B (Axon Instruments, Foster, CA, ABD) süresi ve frekansı stimulus programlayıcısı (Digitimer D4030, İngiltere) ile kontrol edilen elektrik dalgaları ile eksternal olarak tetiklendi. 100 pA hiperpolarize edici akım uygulaması (1 Hz, 100 ms süreli) ve elektrojenik potansiyelin ölçülmesi ile pipet direnci belirlendi. Bu esnada voltaj defleksiyonu giderilinceye kadar rezistans kompanzasyonu uygulandı ve voltaj defleksiyonunu gidermek için uygulanan akım amplifikatörden okunarak pipet direnci MΩ olarak

belirlendi. Bu çalışmada direnci 3-8 M Ω arasında değişen pipetler kullanıldı. Daha sonra osiloskop (Instek, Taipei, Tayvan) veya bilgisayar ekranında voltaj gözlenene kadar mikrooyunatıcı aracılığı ile pipet dikkatle aşağıya indirildi. Pipet ucu ile hücre yüzeyi arasındaki fiziksel temas direncin arttığının belirtisi olarak yaklaşık 0.5 mV'luk bir defleksiyon gösterdi. Mühür oluşması için pipet tutucuya silikon bir hortumla bağlı bir enjektörle çok hafif bir negatif basınç uygulandı. Birkaç dakika içerisinde 5-15 G Ω 'luk mühürler gelişti (çok iyi bir kenet gelişimi için G Ω mertebesinde mühüre ihtiyaç vardır). Osiloskop 20-50 mV/division'e ayarlanarak mühür rezistansı takip edildi. Membranı zedelememek için uygulanan akımın şiddeti -50 pA ile sınırlandırıldı. Tüm hücre diyaliz kayıt formuna geçildikten sonra akım kenedi modunda pipet ve hücre kapasitans kompanzasyonu uygulandı. Tüm hücre diyaliz formunun gerçekleştirilmesi için genelde hafif ilave negatif basınç uygulandı. Hem akım kenedi kayıt modunda hem voltaj kenedi kayıt modunda yukarıda ifade edilen hususlar benzer şekilde gerçekleştirildi.

Akım kenetleme kayıdı modunda önce İMP ölçüldü ve voltaj enjeksiyonu ile membran potansiyeli istenilen voltta tutuldu. Kontrol kayıtlarının alınmasını takiben ilaç uygulamasına geçildi ve ilacın AP ve AP parametreleri üzerine etkisi incelendi.

Amplifikatör çıktıları osiloskop üzerinde ve bilgisayar ekranında görüntüldü (Instek PM3305, 35 MHz, two channel oscilloscope, Taipei, Tayvan) ve pClamp 7 (Axon Instruments, Foster, CA, ABD) programı ile kişisel bilgisayara kayıt edilerek analiz edildi.

4.1.2.4. Kanal İletkenliğinin İyonik Temelinin Biyofiziksel Olarak Belirlenmesi

4.1.2.4.1. Zıtlanma Potansiyelinin Hesaplanması

Zıtlanma potansiyelleri membran iletkenliğinin iyonik temelinin biyofiziksel olarak belirlenebilmesi amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu amaçla Nernst Denklemi kullanılmaktadır. Nernst Denklemine göre, aşağıdaki parametreler göz önünde bulundurularak hesaplama yapılmaktadır;

$$E = (RT) / (ZF) \ln (c_d/c_i) \text{ dir.}$$

$$R \text{ (Genel gaz sabiti)} = 8.3143 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

$$F \text{ (Faraday sabiti)} = 96\,500 \text{ C mol}^{-1}$$

$$T \text{ (Mutlak sıcaklık)} = (273 + \text{ }^\circ\text{C}) \text{ K}$$

$$Z = \text{İyon Değerliği}$$

$$c_d = \text{Hücre dışı iyon molar konsantrasyonu}$$

$$c_i = \text{Hücre içi iyon molar konsantrasyonu}$$

Örneğin, 20°C'de bu tez çalışmasında kullanılan solüsyonların iyon konsantrasyonu göz önüne alındığında K⁺, Cl⁻ ve Ca⁺²'un zıtlanma potansiyelini hesaplayacak olursak;

$$E_K^+ = (RT)/(ZF) \ln (K_d/C_i)$$

$$E_K^+ = (8.3143 \times 293)/(1 \times 96500) \ln (140/3)$$

$$E_K^+ = -97 \text{ mV}$$

$$E_{Cl^-} = (RT)/(ZF) \ln (Cl_d/Cl_i)$$

$$E_{Cl^-} = (8.3143 \times 293)/(-1 \times 96500) \ln (138,2/142,2)$$

$$E_{Cl^-} = +0.72 \text{ mV}$$

$$E_{Ca^{+2}} = (RT)/(ZF) \ln (Ca_d/Ca_i)$$

$$E_{Ca^{+2}} = (8.3143 \times 293)/(2 \times 96500) \ln (2/0.1)$$

$$E_{Ca^{+2}} = 37.82 \text{ mV bulunur.}$$

Hücrelerin İMP ölçüldükten sonra hücreler en az 5 dakika bu membran potansiyelinde tutuldu ve depolarize edici akım enjeksiyonu ile AP aktive edildi. Ard potansiyele sahip hücreler (daha önce aksiyon potansiyeli depolarize edici ard potansiyellerinden ($I_{Ca(Cl)}$) akımlarının sorumlu olduğu tespit edilmiştir) -40/-120 mV arasında 10 mV'luk aralıklarla tutularak AP'leri aktive edildi. Bu protokolle elde edilen AP'lerinin zıtlanma potansiyeli hesaplanarak bu zıtlanma potansiyeli K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} kanallarının hücre içi ve hücre dışı solüsyonlardaki konsantrasyonlarına göre Nernst Denkleminde hesaplanan zıtlanma potansiyelleri ile karşılaştırıldı. K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} için zıtlanma potansiyellerinin sırasıyla -97 mV, +0,7 mV ve 37,82 mV olduğu tespit edildi.

4.1.3. Farmakolojik Ajan:

Levetirasetam (ucb L059): Stok solusyonu 30 mM olarak çift distile deiyonize su içerisinde hazırlandı. Son konsantrasyonlar ekstrasellüler solusyon içerisinde sulandırılarak 30 μ M, 100 μ M ve 300 μ M konsantrasyonlarda uygulandı.

4.1.3.1. İlaç Uygulaması:

Bu çalışmada ekstrasellüler ilaç uygulaması kayıt edilen elektrofizyolojik verilerin farmakolojik yaklaşımlarla tanımlanmasına imkan sağladı.

DKG hücrelerine ekstrasellüler ilaç uygulaması, ekstrasellüler basınçla mikroperfüzyonla yapıldı. İlaçların ekstrasellüler mikroperfüzyonu, ucu genişletilmiş bir *patch* pipeti aracılığıyla, düşük basınçlı mikroejeksiyonla gerçekleştirildi. Pipetler ekstrasellüler kayıt solüsyonunda hazırlanmış olan etkisi araştırılan ajanın istenilen konsantrasyonu ile dolduruldu. İlaç uygulama pipeti temiz bir metal yüzeye hafifçe dokundurularak ucu kırıldı ve ilaç akımını sağlamak için yaklaşık 10 µm çap elde edildi. İlaçla dolu pipet, pipet tutucu mikrooyunatıcıya yerleştirildi (WPI, Berlin, Almanya) ve silikon tüp aracılığı ile basınç süresi ve şiddeti ayarlanabilen basınç kaynağına (Pneumatic Pump, WPI, Berlin, Almanya) bağlandı (\approx 4-5 kPa basınç, 1-10 s tek adımla ve sürekli perfüzyonla uygulandı). Kayıt alınan hücreden kontrol verileri elde edildikten sonra, ilaç uygulama pipeti mikroskop altında mikrooyunatıcı aracılığı ile ekstrasellüler kayıt solüsyonuna daldırılarak ilgili hücrenin 50-100 µm uzağına yerleştirildi. Her ilaç uygulamasından sonra ekstrasellüler kayıt solüsyonu birkaç defa taze solüsyon ile değiştirilerek hücreler yıkandı ve sonraki kayıtlar aynı lamelin uzak noktalarındaki hücrelerden yapıldı.

4.1.3.2. Elektrofizyolojik Verilerin Analizi

Elektrofizyolojik veriler deney esnasında bilgisayarın hafızasına kayıt edilerek daha sonra pCLAMP 7.0 (Axon Inst, Foster, CA, ABD) analiz programı kullanılarak analiz edildi. Elektrofizyolojik veriler 1 KHz frekansında dijitalize

edilerek (Digidata 1200, Axon Inst, Foster, CA, ABD) bilgisayar hafızasında kayıt edildi.

Çalışmada kullanılan akım kenetleme koşullarında parametre olarak AP eşik değeri, pik amplitüdü, AP'nin süresi ve ard potansiyellerin (depolarize edici ve hiperpolarize edici) amplitüt ve bu potansiyellerin İMP'ne dönme zamanı ölçülerek belirlendi.



Şekil 4.1: Elektrofizyolojik Kayıt Sisteminin Genel Görünüşü

4.2. *In Vivo Hot Plate* Testinde Nosiseptif Davranış Yöntemiyle Ağrı Eşiğinin Belirlenmesi

Deneyisel çalışmalarda ortalama ağırlıkları 30 g (30 ± 5 g) olan BALB-C cinsi erkek fareler kullanıldı. Hayvanların buldukları ortamın sıcaklığı 22-25 °C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda, her kafeste 5 hayvan konarak optimal şartlar sağlandı. Hayvanlar standart pellet halindeki sıçan yemleri ve musluk suyuyla beslendi.

4.2.1. *Hot Plate* Testi

Sıcak bir zemin üzerine yerleştirilen hayvanın ısı uyarısına vermiş olduğu cevap süresi ölçülerek ağrı eşiğinin tespitine yönelik bir termal akut ağrı modelidir. Çalışmada fareler için uygun büyüklükteki *hot plate* analjezometre (Harvard, Edenbridge, İngiltere) kullanıldı. 50 ± 0.5 °C'ye ayarlanmış ve yanları plastik saydam bir bariyerle hayvanların dışarı çıkmaları engellenecek şekilde kapatılmış tabla bölümüne fareler bırakılarak test uygulandı. Farelerin tablaya bırakıldıkları andan itibaren, ekstremitelerini hızla çekmeleri veya yalamalarına kadar geçen süre saniye cinsinden kronometre kullanılarak belirlendi. Bu testin uygulanması esnasında ortamın sessizliğine büyük önem verildi ve hayvan 60 sn içerisinde cevap vermediği takdirde doku hasarını önlemek amacıyla bu sıcak tabla üzerinden alındı ve çalışmaya dahil edilmedi. Deneylerden önce hem normal hem de diyabetik farelere 1 hafta süreyle *hot plate* testi uygulanarak, bütün hayvanların deney şartlarına alışmaları sağlandı.



Şekil 4.2: Hot-plate analjezimetre

4.2.1.1. Normal Farelerde *Hot Plate* Testi

Fareler rasgele seçilerek 4 grup oluşturuldu. İlk grup kontrol grubu, diğer üç grup ise LEV uygulanacak gruplar olarak belirlendi ve ağrı eşiği çalışmalarına başlamadan önce tüm guruplardaki hayvanların kuyruklarını işaretlemek suretiyle hayvanlar numaralandırıldı. Başlangıçta farelere herhangi bir enjeksiyon yapılmadan önceki ağrı eşiği değerleri belirlendi. 15'er dakika aralıklarla bu işlem iki defa tekrarlandı ve bu işlemi takiben kontrol grubundaki hayvanlara intraperitoneal (ip) serum fizyolojik (n=8), diğer üç gruba ise sırasıyla ip 60 mg/kg (n=8), 300 mg/kg (n=8) ve 900 mg/kg (n=8) LEV uygulandı. Enjeksiyonun yapıldığı an 0. dakika olarak kabul edildi ve her 15 dakika aralıkla tüm gurupların ağrı eşiği değerleri ölçüldü. Bu işlem tüm guruplara 75 dakika boyunca uygulandı.

4.2.1.2. Diyabetik Farelerde *Hot Plate* Testi

Çalışmanın bu kısmında kullanılan 60 adet fareye STZ, 250 mg/kg olacak şekilde 0.1 M fosfat-sitrat tamponunda (pH:4.5) çözdürülerek ip enjeksiyonla tek doz olarak uygulandı. Bir hafta sonra kuyruk veninden kan alınarak, glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukozu 250 mg/dl'yi geçen fareler, diyabetik olarak kabul edildi. Farelerin açlık kan glukoz düzeylerini saptamak için kan örnekleri, 8-10 saatlik açlık sonrasında sabah 9.00 – 10.00 saatleri arasında alındı.

Diyabet oluşumundan önce farelerin açlık kan glukoz düzeyi 123 ± 3.2 mg/dl iken diyabet oluşumun takiben 412 ± 15.0 mg/dl olarak ölçüldü. Diyabet oluşumundan iki hafta sonra *hot plate* testiyle bu hayvanların ağrı eşiği değerleri incelendi. Fareler 15'erli gruplara bölünerek dört gurup oluşturuldu. Birinci guruba ip serum fizyolojik uygulandı (n=15). Diğer üç guruba ise sırasıyla ip 20 mg/kg (n=15), 100 mg/kg (n=15) ve 200 mg/kg (n=15) dozlarda LEV uygulandı. Enjeksiyon yapılmadan 30 dakika önce tüm grupların kontrol kayıtları alındı ve enjeksiyonun yapıldığı zaman 0. dakika olarak kabul edildi ve enjeksiyonu takiben 15'er dakika arayla toplam 75 dakikalık sürede ağrı eşiği değerleri ölçüldü.

4.3. İstatistiksel Metod

Bütün değerler; ortalama, standard hata (AO \pm SH) olarak belirlendi. İstatistiksel analizler ve grafikler sırasıyla; SPSS 12.0 ve Sigma Plot 8.0 programları kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirme, *Student's t* testi ve

Çift yönlü varyans analizi kullanılarak hesaplandı. Çift yönlü varyans analizinin Post-Hoc hesaplaması için ise *Dunnet's* testi kullanıldı. Bağımsız guruplarda, iki gubun karşılaştırması için *Student's t* testi, l gurupların karşılaştırması için ise varyans analizi (*Dunnet's* testi) kullanıldı. Tüm analizlerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Giriş

Bu tez çalışmasında bir antiepileptik ilaç olan LEV'in *in vivo* ve *in vitro* yaklaşımlarla ağrı üzerine etkisi olup olmadığı incelendi. *In vitro* çalışmalar tüm hücre diyaliz patch kenetleme tekniğini, *in vivo* yaklaşımlar ise *hot plate* testini kapsamaktadır. Aşağıda her iki deney protokolü ile elde edilen bulgular yer almaktadır.

5.1.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyonu Sinir Hücre Kültürlerinde Aksiyon Potansiyeli Bulguları

Bu çalışmanın ilk aşamasında LEV'in sıçan DKG sinir hücre kültürlerinde uyarılabilirlik üzerine muhtemel etkisini tüm hücre diyaliz *patch* kenetleme tekniği kullanarak incelendi. Tüm hücre akım kenedi modunda NaCl esaslı hücre dışı ve KCl esaslı *patch* pipet solusyonları kullanıldı.

Tüm hücre diyaliz *patch* kenetleme tekniğinin akım kenedi formuyla toplam 21 kültüre sıçan DKG sinir hücresinden kayıt alındı. Hücrenin stabil bir membran potansiyeline sahip olmasına dikkat edildi. Çünkü ancak zarar görmemiş hücreler stabil bir membran potansiyeline, AP'ne ve aktif-pasif membran özelliklerine sahip olmaktadır. Kayıt alınan hücrelerin ortalama İMP -52.4 ± 2.26 mV' tu (n=21). AP'leri 100 pA ile 1400 pA arasında, 5 msn süren depolarize edici akım dalgalarıyla aktive edildi. AP ortalama pik amplitüdü 30.2 ± 3.18 mV'tu (n=21). 0 mV'ta ortalama AP süresi ise 2.57 ± 0.16 ms idi (n=21). Depolarize edici akım enjeksiyonuyla AP oluşturulduğunda, AP oluşturacak minimum akım şiddetindeki kritik depolarizasyon değeri (eşik değeri) ise -

30.4±2.3 mV olarak belirlendi (n=21) (Tablo 5.1). İstirahat giriş direnci (input rezistansı) ise; -50 ila -650 pA ve 100 ila 200 msn süren hiperpolarize edici akım enjeksiyonlarıyla 180±28 MΩ olarak belirlendi (n=21).

		n
Ortalama İstirahat Membran Potansiyeli (mV)	-52.4±2.26	21
Aksiyon Potansiyeli Ortalama Eşik Değeri (mV)	-30.4±2.3	21
Aksiyon Potansiyeli Ortalama Pik Amplitüdü (mV)	30.2±3.18	21
Ortalama Aksiyon Potansiyeli Süresi (0 mV'ta) (msn)	2.57±0.16	21
Aksiyon Potansiyeli Aktivasyonu İçin Gerekli Ortalama Depolarizasyon (pA)	650±200	21

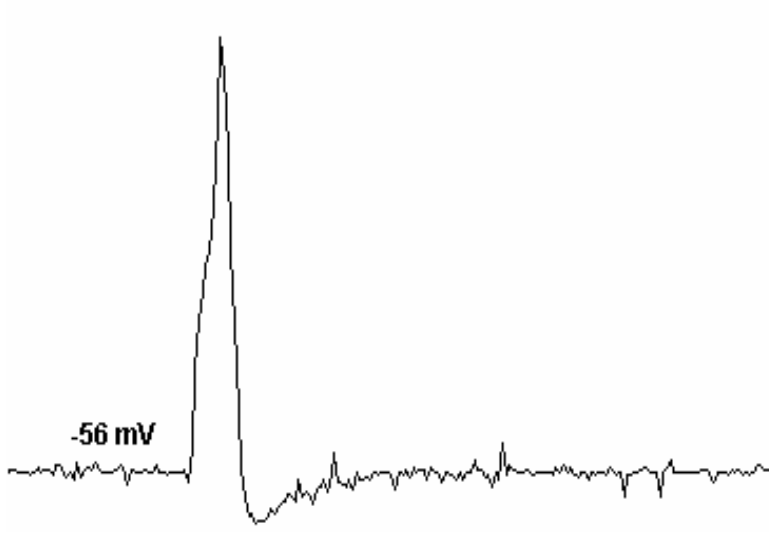
Tablo 5.1. Tüm hücre diyaliz modu geliştirilmesinden sonra en az 5 dakika süreyle stabil bir membran potansiyeline sahip hücrelerden alınan AP kayıtları ve AP parametreleri ortalama değerleri.

5.2. Sıçan Dorsal Kök Gangliyonu Hücrelerinde Aksiyon Potansiyeli ve Aksiyon Potansiyeli Sonrası Ard Potansiyel Kayıtları ve Genel Özellikleri

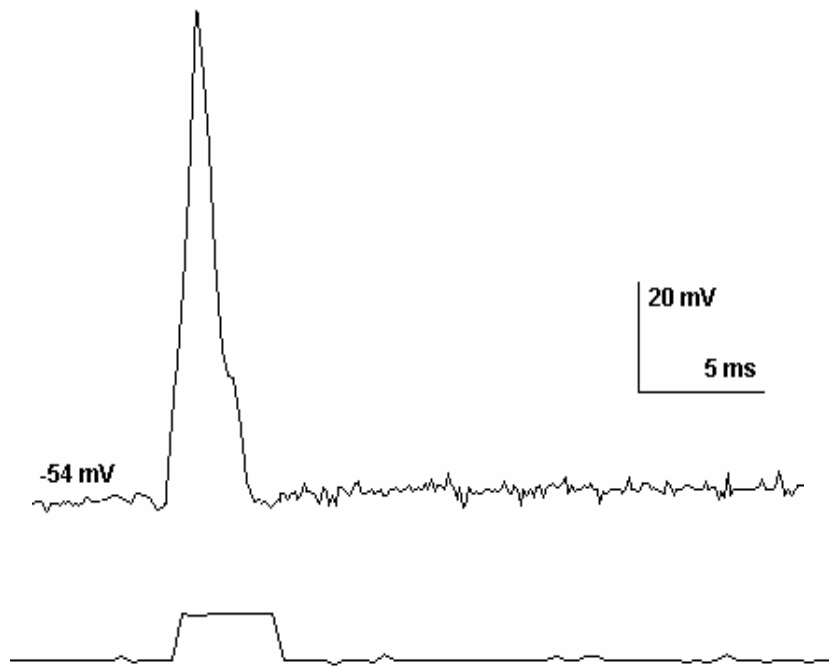
Tüm hücre akım kenedi modu kayıtları esnasında, bütün kayıtlarda aynı ekstrasellüler solüsyon (NaCl esaslı) ve hücre içi *patch* pipet solüsyonu (KCl esaslı) kullanıldı. Yine AP oluşumu için uygulanan stimulus süresi (5 msn) aynı, stimulus büyüklüğü ise (100 pA ila 1400 pA) ise büyük ölçüde benzerdi.

Ancak tüm bu parametrelerin ve İMP'nin benzer olmasına karşın AP'ni takiben oluşan ard potansiyeller farklılık gösterdi. Şöyle ki; DKG nöronlarında AP'ni takiben üç farklı ard potansiyel gözlenebilir. Birincisi sadece depolarize edici ard potansiyel, ikincisi sadece hiperpolarize edici ard potansiyel üçüncüsü ise başlangıçta hiperpolarize edici ard potansiyeli takip eden depolarize edici ard potansiyeldir (Şekil 5.1). Bu farklı özellikteki ard potansiyeller, aynı gün hazırlanmış, aynı yaştaki hücre kültürlerinde farklı nöronlarda çalışıldığı zaman dahi gözlenebilmektedir. Şöyle ki; hücre büyüklüğünden veya İMP değerinden ard potansiyel tahmin edilemez. AP esnasında hücre içerisine Ca^{+2} girişi hem depolarize edici ard potansiyelden hem de hiperpolarize edici ard potansiyelden sorumludur. Deney protokollerinde kullanılan kayıt solüsyonu içeriğinden dolayı deneyler esnasında her iki tipteki ard potansiyele sahip hücrelerden kayıt alınmıştır.

A

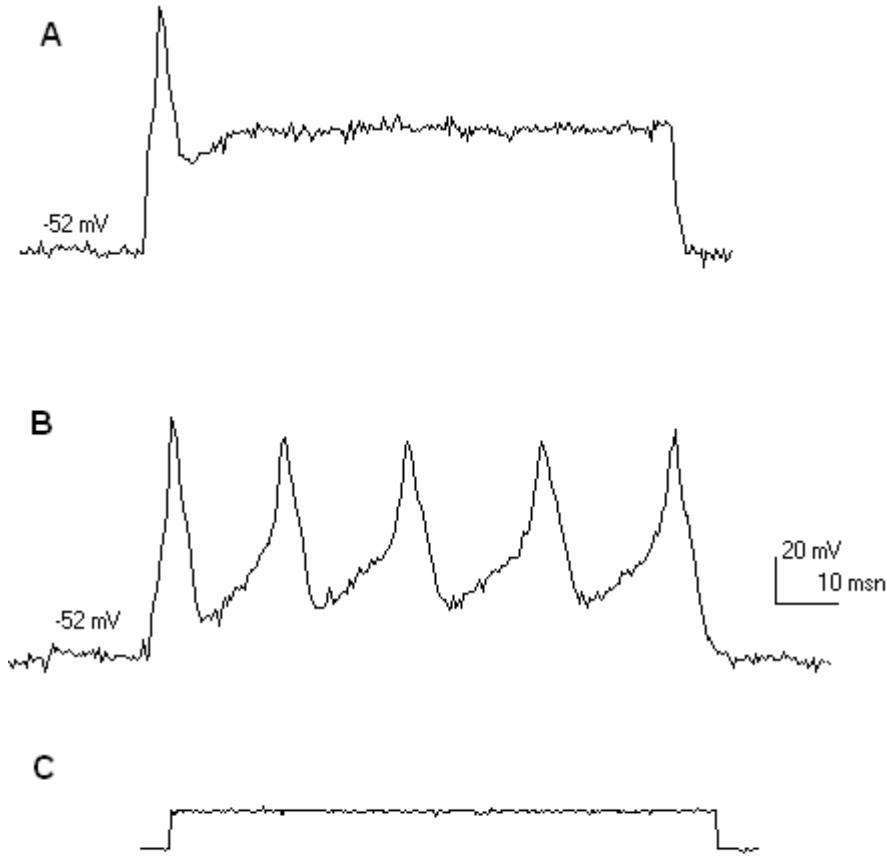


B



Şekil 5.1: DKG nöronlarında 5 ms süren uyarıya cevap olarak ortaya çıkan farklı tiplerde ard potansiyel kayıtları. A) AP'ni takiben hiperpolarize edici ard potansiyele sahip bir DKG nöronundan alınan örnek bir orijinal kayıt B) AP'ni takiben depolarize edici ard potansiyele sahip bir DKG nöronu örnek orijinal kayıt.

Depolarize edici ard potansiyel ekstatatör bir etkiye sahiptir. Şöyle ki depolarize edici ard potansiyele sahip hücrelere birkaç 100 msn süren uyarım verilmesi sonucunda bazı DKG nöronlarında çoklu ateşlemeli AP oluşabilir (n=4, Şekil 5.2). DKG nöronlarının çoğu depolarize edici akım enjeksiyonu sonucu tek bir AP üretir, bu uyarı birkaç 100 msn sürse dahi değişmez. Bu tezde sonuçlanan deneylerin % 85'inde uzun süreli uyarımlarda dahi tek bir AP oluşmuştur.



Şekil 5.2: Aynı DKG nöronunda 100 msn süren uyarıya cevap olarak oluşan AP'leri. A) DKG hücresinde 100 msn süren uyarıya cevap olarak oluşan tek bir AP gösteren bir örnek kayıt B) Aynı DKG hücresinde 100 msn süren uyarıya cevap olarak 5 tane ard arda oluşan AP gösteren örnek bir kayıt. C) 100 msn süren uyarı.

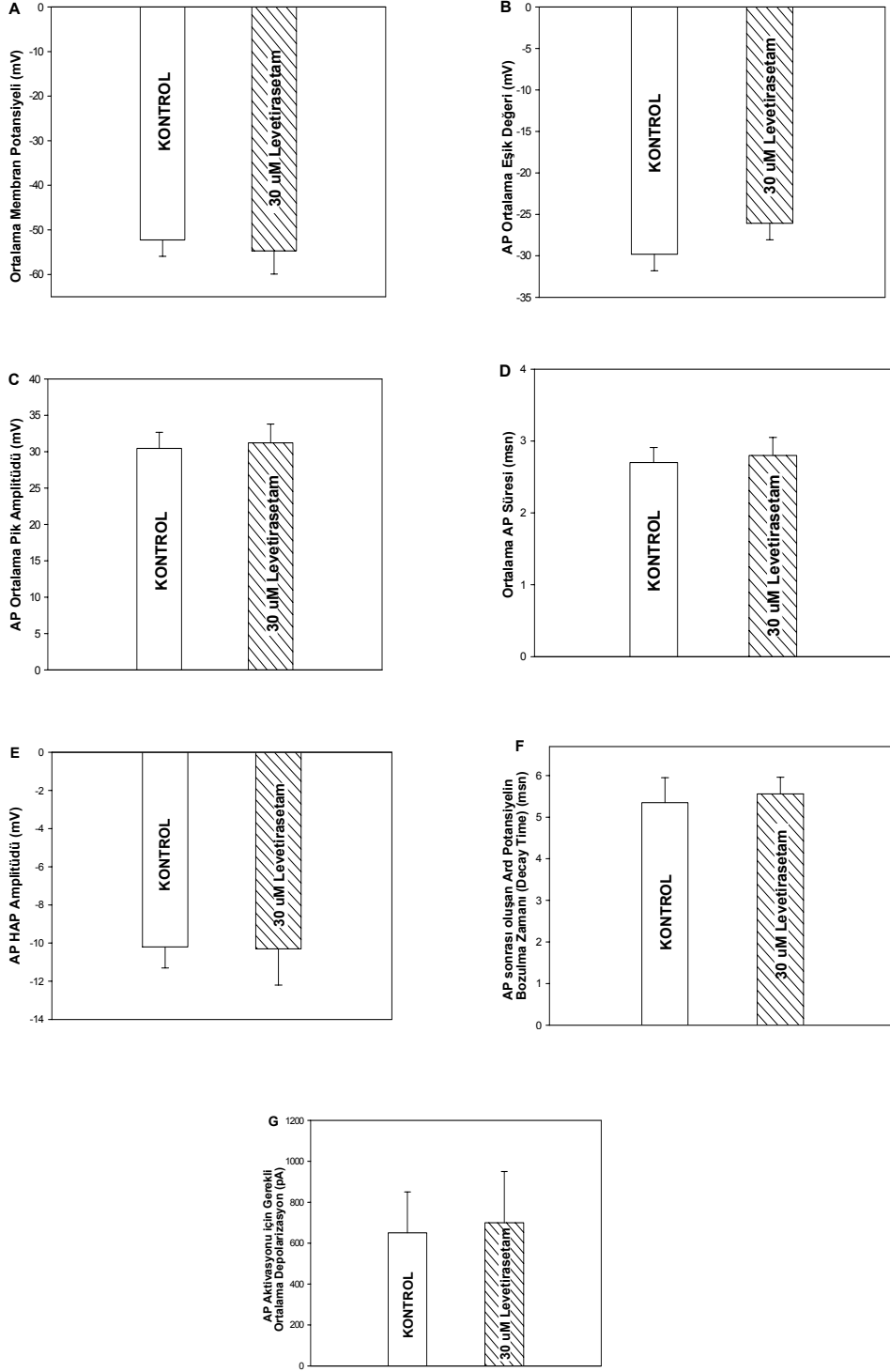
5.3. Levitirasetamın Sıçan Dorsal Kök Gangliyonu Sinir Hücreleri Uyarılabilirliği Üzerine Etkileri

LEV'in DKG hücreleri uyarılabilirliği üzerine olan etkileri, AP'leri aktive edilerek, AP parametrelerinde meydana gelen değişikliklerden tespit edilmeye çalışıldı. Bu amaçla alınan kayıtlarda ortalama membran potansiyeli, AP ortalama eşik değeri, AP ortalama pik amplitüdü, 0 mV'ta ölçülen ortalama AP süresi, AP sonrası oluşan hiperpolarize edici ard potansiyelin pik amplitüdünün % 63'üne dönme zamanı (decay time) ve AP aktivasyonu için gerekli ortalama depolarizasyon miktarı ölçüldü.

Ekstrasellüler olarak üç farklı dozda 30 μ M, 100 μ M ve 300 μ M LEV uygulandı. Uygulanan en düşük doz LEV (30 μ M), İMP'ni -52.25 ± 2.5 mV'tan -54.71 ± 3.56 mV'a hiperpolarize etti. Ancak meydana gelen hiperpolarizasyon istatistiksel olarak anlamlı değildi. Yine benzer şekilde ölçülen diğer tüm AP parametreleri kontrol kayıtları ve 30 μ M LEV uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi (Şekil 5.3). İMP'den aktive edilen AP parametreleri ve 30 μ M LEV uygulamasının AP parametreleri üzerine etkisi Tablo 5.2'de ve Şekil 5.3'de sunulmuştur.

AKSİYON POTANSİYELİ PARAMETRELERİ	KONTROL	LEV (30 uM)	n	p	
Ortalama İstirahat Membran Potansiyeli (mV)	-52.25±2.5	-54.71±3.56	7	>0.05	FY
Aksiyon Potansiyeli Ortalama Eşik Değeri (mV)	-29.8±1.79	-26.06±2.03	7	>0.05	FY
Aksiyon Potansiyeli Ortalama Pik Amplitüdü (mV)	30.45±4.7	31.22±4.05	7	>0.05	FY
Ortalama Aksiyon Potansiyeli Süresi (0 mV'ta) (msn)	2.7±0.17	2.8±0.24	7	>0.05	FY
Aksiyon Potansiyeli Sonrası Oluşan Hiperpolarize Edici Ard Potansiyelin Pik Amplitüdü (mV)	-10.2±0.3	-10.3±0.35	7	>0.05	FY
Aksiyon Potansiyeli Sonrası Oluşan Hiperpolarize Edici Ard Potansiyelin Pik Amplitüdünün %63'üne Dönme Zamanı (Decay Time) (msn)	5.35±0.6	5.56±0.4	7	>0.05	FY
Aksiyon Potansiyeli Aktivasyonu İçin Gerekli Ortalama Depolarizasyon (pA)	650±200	700±250	7	>0.05	FY

Tablo 5.2: Uygulanan en düşük doz levetirasetamın (30 µM), AP uyarılabilirliği üzerine etkileri, FY= Fark Yok.

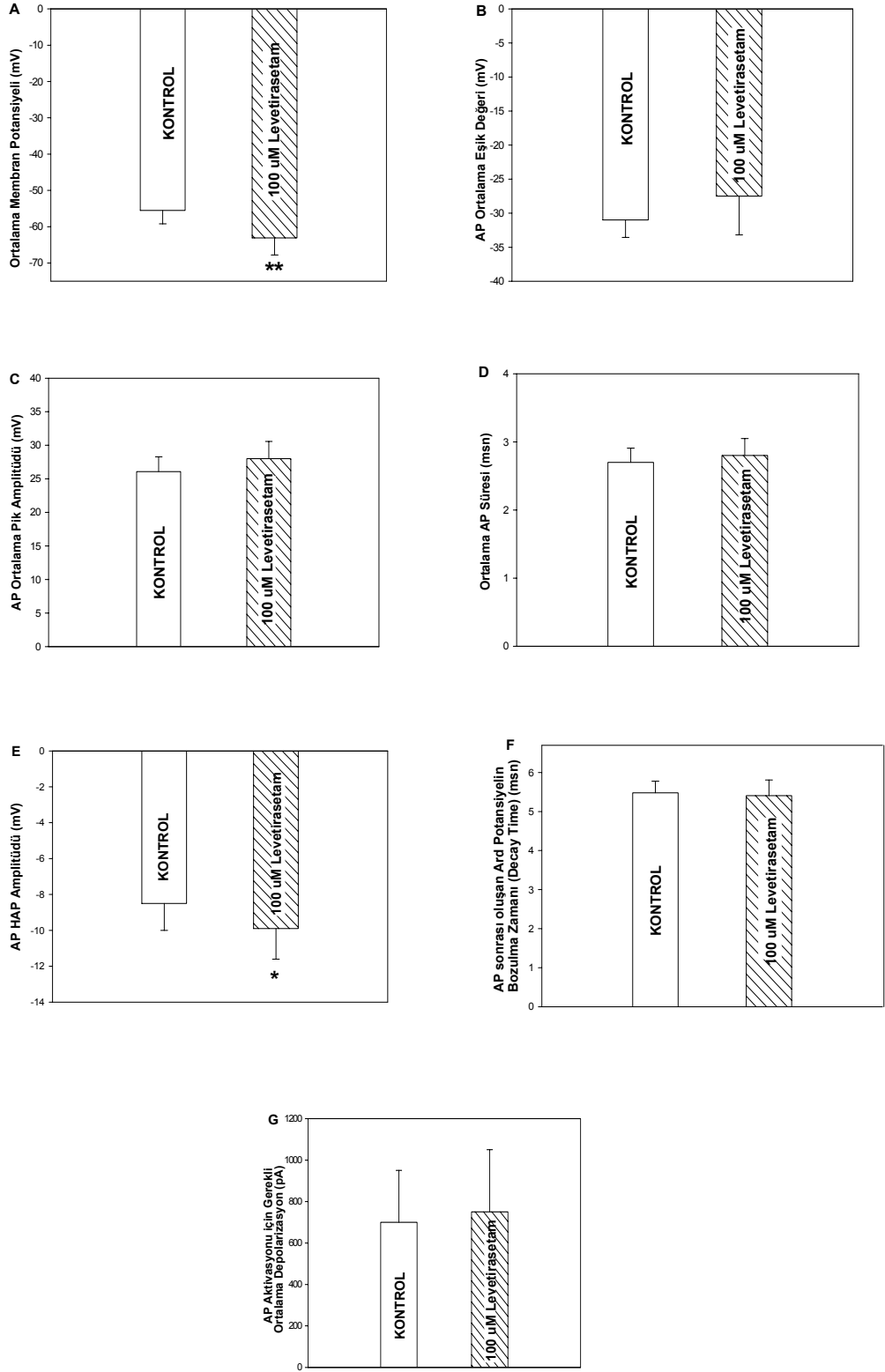


Şekil 5.3: Düşük doz levettirasetamın (30 μ M) AP uyarılabilirliği üzerine etkileri. A) Ortalama membran potansiyeli B) AP ortalama eşik değeri C) AP pik amplitüdü D) Ortalama AP süresi (0 mV'ta) E) AP sonrası oluşan hiperpolarize edici ard potansiyelin pik amplitüdü F) AP sonrası oluşan hiperpolarize edici ard potansiyelin pikinin %63'üne dönme zamanı (Decay time) G) AP aktivasyonu için gerekli ortalama depolarizasyon (n=7).

Ekstrasellüler olarak uygulanan 100 μ M LEV ise; İMP'ni, -55.5 ± 3.7 mV'tan -63.1 ± 4.7 mV'a doğru hiperpolarize etti ($p < 0.01$). Aynı zamanda AP sonrası oluşan hiperpolarize edici ard potansiyelin pik amplitüdü de istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttı. -8.5 ± 0.25 mV olarak ölçülen AP sonrası oluşan hiperpolarize edici ard potansiyelin pik amplitüdü 100 μ M LEV uygulaması sonrası -9.9 ± 0.37 mV olarak ölçüldü ($p < 0.05$). AP ortalama pik amplitüdünde, 0 mV'ta ölçülen ortalama AP süresinde, AP eşik değerinde, AP sonrası ard potansiyelin % 63'üne dönme zamanında ve AP aktivasyon için gerekli ortalama depolarizasyon değeri ise kontrol kayıtları ve 100 μ M LEV uygulaması sonrası karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlenmedi (Şekil 5.5). İMP'den aktive edilen AP'leri parametrelerinin kontrol kayıtları ve 100 μ M LEV uygulamasının AP parametreleri üzerine etkisi Tablo 5.3'de ve Şekil 5.4'de sunulmuştur.

AKSİYON POTANSİYELİ PAREMETRELERİ	KONTROL	LEV (100 uM)	n	p	
Ortalama İstirahat Membran Potansiyeli (mV)	-55.5±3.7	-63.1±4.7	7	<0.01	**
Aksiyon Potansiyeli Ortalama Eşik Değeri (mV)	-31±2.56	-27,5±5.69	7	>0.05	FY
Aksiyon Potansiyeli Ortalama Pik Amplitüdü (mV)	26.08±2.1	28±2.5	7	>0.05	FY
Ortalama Aksiyon Potansiyeli Süresi (0 mV'ta) (msn)	2.43±0.18	2.65±0.15	7	>0.05	FY
Aksiyon Potansiyeli Sonrası Oluşan Hiperpolarize Edici Ard Potansiyelin Pik Amplitüdü (mV)	-8.5±0.25	-9.9±0.37	7	<0.05	*
Aksiyon Potansiyeli Sonrası Oluşan Hiperpolarize Edici Ard Potansiyelin Pik Amplitüdünün %63'üne Dönme Zamanı (Decay Time) (msn)	5.48±0.54	5.41±0.67	7	>0.05	FY
Aksiyon Potansiyeli Aktivasyonu İçin Gerekli Ortalama Depolarizasyon (pA)	700±250	750±300	7	>0.05	FY

Tablo 5.3: İMP ve 100 µM LEV uygulaması ile indüklenen hiperpolarize membran potansiyelinden aktive edilen AP parametreleri, *p<0.05, **p<0.01, FY= Fark Yok

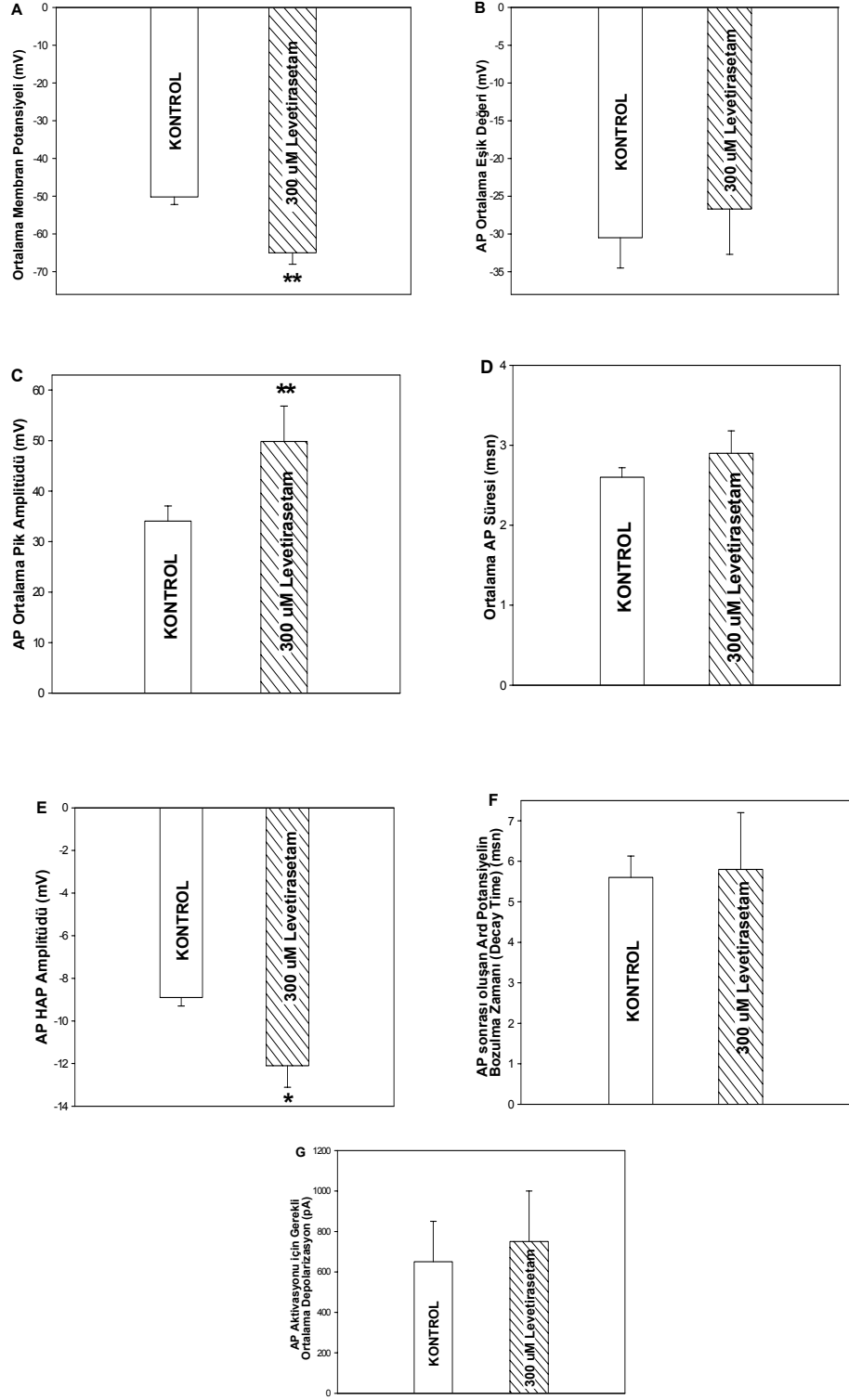


Şekil 5.4: Levetirasetamın (100 μ M) AP uyarılabilirliği üzerine etkileri. A) Ortalama membran potansiyeli B) AP ortalama eşik değeri C) AP pik amplitüdü D) Ortalama AP süresi (0 mV'ta) E) AP sonrası oluşan hiperpolarize edici ard potansiyelin pik amplitüdü F) AP sonrası oluşan hiperpolarize edici ard potansiyel pikinin % 63'üne dönme zamanı G) AP aktivasyonu için gerekli ortalama depolarizasyon (n=7).

Uygulanan en yüksek konsantrasyon LEV (300 μM), membran potansiyelinde ve giriş direncinde geçici bir değişikliğe neden oldu. İMP’de meydana gelen hiperpolarizasyona (-15 mV) giriş direncinde de meydana gelen ortalama 90 M Ω ’luk bir artış eşlik etti (Şekil 5.5A). 300 μM LEV uygulamasına bağlı hiperpolarizasyondan sonra AP eşik değerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Ancak kontrol şartlarında yaklaşık 20 mV’luk potansiyel değişim meydana getirebilecek depolarize edici akım enjeksiyonuna ihtiyaç varken, 300 μM LEV uygulamasından sonra ise yaklaşık 40 mV’luk bir potansiyel değişim meydana getirebilecek depolarize edici akım enjeksiyonuna ihtiyaç olduğu belirlendi. Burada İMP’nde meydana gelen -15 mV’luk bir hiperpolarizasyonun etkisi de söz konusudur. Bu da göstermektedir ki; 300 μM LEV uygulamasından sonra aktivasyon için daha büyük amplitütlü depolarize edici akım enjeksiyonuna ihtiyaç duyulmaktadır (Şekil 5.5G). AP ortalama pik amplitüdü ölçüldüğünde ise 300 μM LEV hiperpolarize edici etkisinin yanı sıra, kontrol kayıtları esnasında alınan 34.0 ± 2.7 mV olan AP ortalama pik amplitüdünü 49.8 ± 5.4 mV’a yükseltmiştir ($p < 0.01$, Şekil 5.5C). Ortalama AP süresi (0 mV’ta), AP sonrası oluşan ard potansiyelin % 63’üne dönme zamanı ve AP aktivasyon için gerekli ortalama depolarizasyon değeri, kontrol kayıtları ve 300 μM LEV uygulaması sonrası karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır (Şekil 5.5D, F, G). İMP’nden aktive edilen AP parametrelerinin kontrol kayıtları ve 300 μM LEV uygulamasını takiben etkisi tablo 5.4 ve Şekil 5.5’de sunulmuştur.

AKSİYON POTANSİYELİ PARAMETRELERİ	KONTROL	LEV(300 uM)	n	p	
Ortalama İstirahat Membran Potansiyeli (mV)	-50.2±4.12	-65±4.9	7	p<0.01	**
Aksiyon Potansiyeli Ortalama Eşik Değeri (mV)	-30.5±1.19	-26.7±2.7	7	p>0.05	FY
Aksiyon Potansiyeli Ortalama Pik Amplitüdü (mV)	34.0±2.7	49.8±5.4	7	p<0.01	**
Ortalama Aksiyon Potansiyeli Süresi (0 mV'ta) (msn)	2.6±0.12	2.9±0.3	7	p>0.05	FY
Aksiyon Potansiyeli Sonrası Oluşan Hiperpolarize Edici Ard Potansiyelin Pik Amplitüdü (mV)	-8.9±0.4	-12.1±1.0	7	p<0.05	*
Aksiyon Potansiyeli Sonrası Oluşan Hiperpolarize Edici Ard Potansiyelin Pik Amplitüdünün %63'üne Dönme Zamanı (Decay Time) (msn)	5.6±0.53	5.8±0.4	7	p>0.05	FY
Aksiyon Potansiyeli Aktivasyonu İçin Gerekli Ortalama Depolarizasyon (pA)	650±200	750±250	7	p>0.05	FY

Tablo 5.4: Uygulanan en yüksek doz levetirasetamin (300 µM), DKG nöronlarında AP uyarılabilirliği üzerine etkileri, *p<0.05, **p<0.01, FY= Fark Yok.



Şekil 5.5: AP uyarılabilirliği üzerine, uygulanan en yüksek doz levamisole (300 μM), etkileri. A) Ortalama membran potansiyeli B) AP ortalama eşik değeri C) AP pık amplitüdü D) Ortalama AP süresi (0 mV'ta) E) AP sonrası oluşan hiperpolarize edici ard potansiyelin pık amplitüdü F) AP sonrası oluşan ard potansiyelin %63'üne dönme zamanı (Decay time) G) AP aktivasyonu için gerekli ortalama depolarizasyon, (n=7).

Uygulanan tüm dozlarda uygulamayı takiben LEV'in hiperpolarize edici etkisinin geri dönüşümlü olup olmadığı incelendi. İlaç uygulamasından kısa bir süre sonra, ilaç verilmesi kesildiğinde hücrenin başlangıçtaki İMP'ne döndüğü gözlemlendi. Bu da etkinin geri dönüşümlü olduğunu göstermektedir.

5.4. Levitiresetamın Çoklu Ateşlemeli Aksiyon Potansiyeli Üzerine Etkileri

Bu çalışmada LEV'in sıçan DKG hücrelerinde membran hiperpolarizasyonunu artırarak uyarılabilirliği azalttığı belirlenmiştir. Sıçan DKG hücreleri spontan ritmik aktivite göstermeyen özellikle ağrı duyusunun iletilmesinde bilinen rolleri olan duyusal nöronlardır.

Bu çalışmada genel olarak 5 msn süren uyarılar verilmiş ve buna cevap olarak ortaya çıkan AP'leri kayıt edilmiştir. Sıçan DKG hücreleri spontan ritmik aktivite göstermediğinden dolayısıdır ki 100 msn süren uyarılarda dahi çoğunlukla (% 85) tek bir AP oluşumu meydana getirmişlerdir. 100 msn süren uyarı sonucunda oluşan çoklu ateşlemeli AP esnasında Ca^{+2} girişiyle, Ca^{+2} bağımlı Cl^{-} iletkenliğindeki artışa paralel olarak depolarizasyonun artması ve uzaması sonucu gelişir (n=4). LEV çoklu ateşlemeli AP gösteren hücrelere uygulandığında 4 ± 2 olan ateşlemeleri 2 ± 2 'ye indirgemektedir ($p < 0,01$).

5.5. Levitiresetamla Aktive Olan Membran Akımlarının İyonik Temelinin Biyofiziksel Yaklaşımlarla Belirlenmesi

Kültüre sıçan DKG hücrelerinin ortalama İMP kontrol şartlarında (NaCl esaslı ekstrasellüler kayıt solüsyonu ve KCl esaslı intrasellüler kayıt solüsyonu kullanıldığında) ortalama -52.4 ± 2.3 mV (n=21) olduğu tespit edildi. En az 5 dakika süreyle İMP'nin bu değerler etrafında sabit olduğu (bu sürede bazı

hücrelerde istirahat membran potansiyelinde maksimum 4 mV değişiklik gözlemlendi) belirlendikten sonra ekstrasellüler LEV uygulandı. Ekstrasellüler olarak LEV 30 µM, 100 µM ve 300 µM lık üç farklı konsantrasyonu uygulandı. Uygulanan en düşük doz LEV (30 µM) İMP'ni -2 ± 1 mV hiperpolarize etmektedir. Aynı zamanda LEV uygulanan ara dozuda (100 µM) ise İMP'ni -8 ± 2 mV hiperpolarizasyona neden oldu ($n=7$, $p<0.05$) Daha sonra bu etkinin doz bağımlı olup olmadığını kontrol amacıyla kullanılan en yüksek doz LEV (300 µM) benzer şekilde İMP -15 ± 4 mV'luk ($n=7$, $p<0.01$) hiperpolarize ettiği gözlemlendi.

Tüm hücre diyaliz *patch* kenetleme kayıt formunun akım kenetleme formunda ekstrasellüler LEV uygulaması öncesi ve sonrası -40 mV ila -100mV arasında oluşan AP sonrası ard potansiyel değerlerinin pik amplitüdü ölçüldü. Kayıt formu için kullanılan hücre içi ve hücre dışı solüsyonlardaki iyon konsantrasyonları göz önünde bulundurularak Nernst denklemi, K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} için hesaplanan zıtlanma potansiyelleri ile karşılaştırıldı. Nernst denklemi kullanılarak akım kenetleme deneylerinde K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} için zıtlanma potansiyellerinin sırasıyla -97 mV, +1,07 mV ve +39.8 mV olduğu tespit edildi.

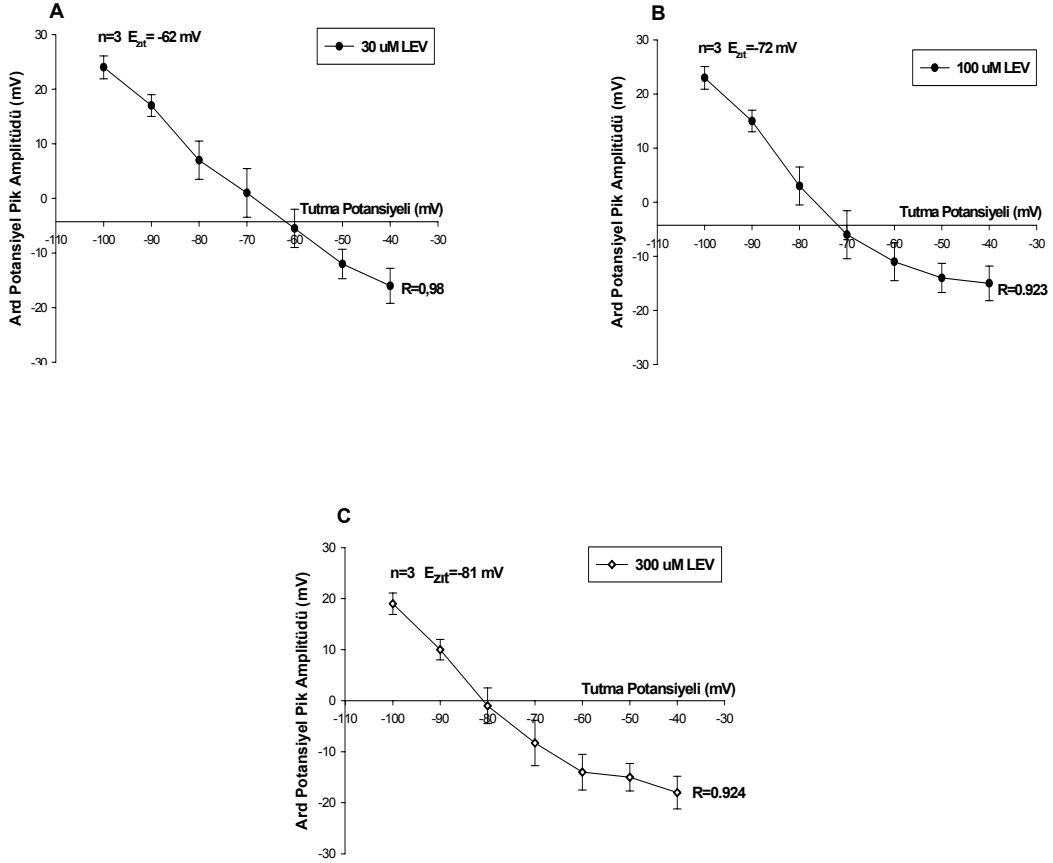
Akım kenetleme deneylerinde 30 µM LEV ekstrasellüler olarak uygulandığında aktive olan membran hiperpolarizasyonun zıtlanma potansiyelinin -62 ± 4 mV olduğu tespit edildi ($n=3$). 100 µM ve 300 µM LEV ekstrasellüler olarak uygulandığında ise membran hiperpolarizasyonun zıtlanma potansiyelini sırasıyla -72 ± 4 mV ve -81 ± 3 mV olduğu tespit edildi (Şekil 3.6, $n=3$ her biri için).

Deneysel olarak kullanılan solüsyonlardan Nernst denkleminde göre hesaplanan zıtlanma potansiyeli ile elde edilen değer -97 mV 'a daha yakın olduğu için LEV'in ekstrasellüler uygulanması ile aktive olan membran akımlarının K^+ kanal akımı olabileceği kabul edildi. Aynı zamanda K kanal iletkenliğinde meydana gelen artışta bu fikri desteklemektedir (Şekil 5.7).

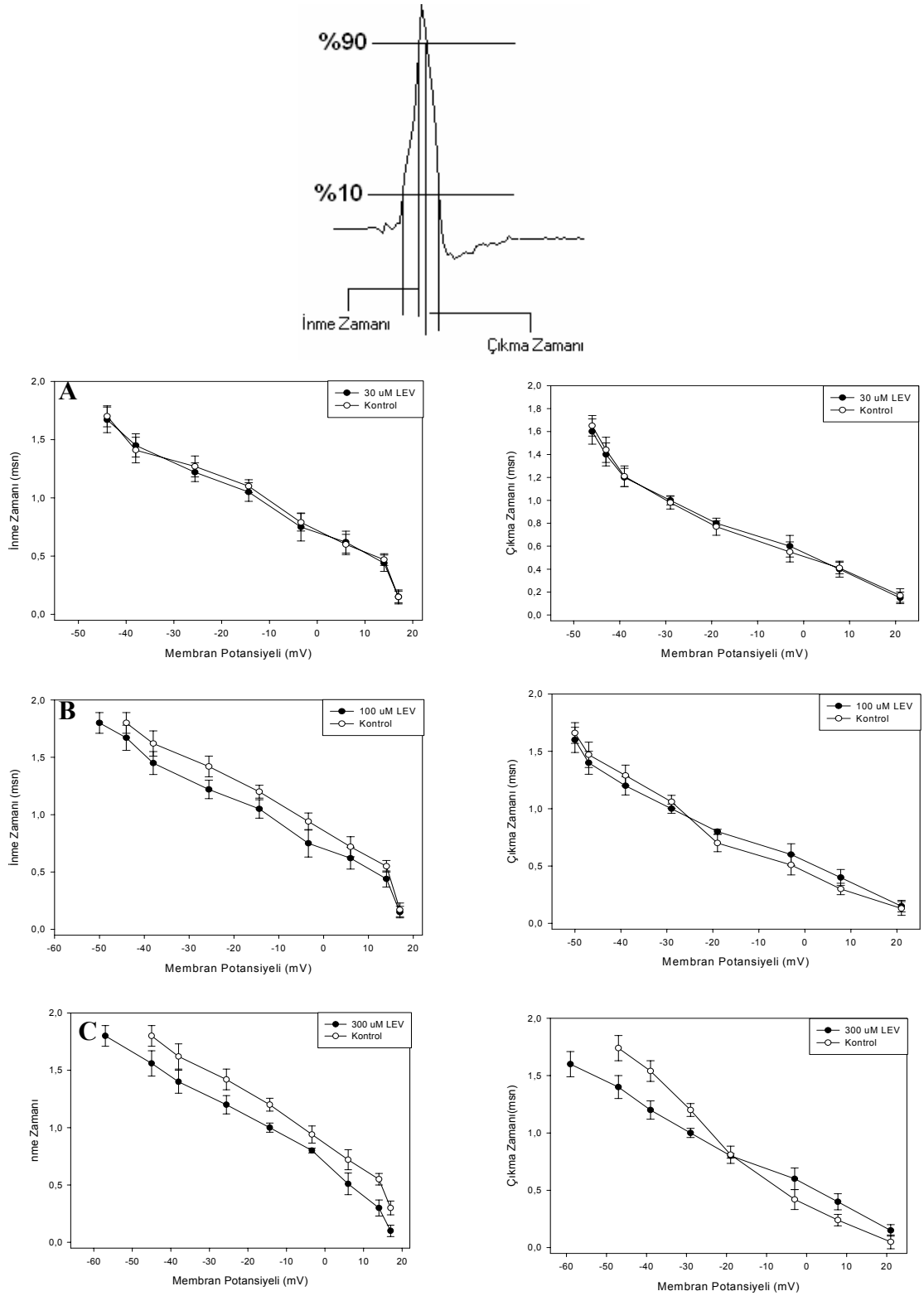
Yine AP çıkış ve iniş zamanından sorumlu olan sırasıyla Na^+ ve K^+ kanal iletkenliğinden meydana gelen zaman bağımlı değişim incelenecek olursa LEV'in, Na^+ ve K^+ kanal iletkenliği üzerine etkisi tespit edilebilir. AP'nin pik değerinin % 10 ve % 90 değerleri arasındaki süre AP'nin çıkan ve inen fazları için kanal iletkenlik süresini ve dolayısıyla hızını tespiti olanaklı kılar (112, 237). LEV'in uygulan 30 ve 100 μM dozlarının Na^+ iletkenliği üzerine etkisi incelendiğinde LEV'in çıkan faz süresini ve aktive olan Na^+ kanal iletkenlik hızını etkilemediği tespit edildi. Sadece LEV uygulanan en yüksek dozu 300 μM , Na^+ iletkenliğinde geçici bir artışa neden oldu (Şekil 3.7, $n=7$ her bir doz için), bu Na^+ iletkenliğinde meydana gelen geçici artış da AP pik amplitüdünde meydana gelen artışla uyum içindedir.

LEV'in 30 μM dozunun K^+ kanal iletkenliği üzerine etkisi incelendiğinde düşük doz LEV'in inen faz süresini, dolayısıyla inen fazdan sorumlu olan K^+ kanal iletkenliği istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değiştirmediği görüldü. Ancak uygulanan 100 ve 300 μM LEV, AP süresi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değiştirmeden K^+ kanal iletkenliği artırmaktadır. Bu artışın nedeni daha fazla sayıda K^+ kanalının aktive olması neden olabilir (Şekil 5.7, $n=7$ her bir doz için). LEV'in K^+ iletkenliğinde meydana getirdiği bu artış membranda meydana gelen hiperpolarizasyonunda nedeni olabilir. Aynı zamanda bu biyofiziksel yaklaşımla

ortaya konulan bu bulgu, diğer biyofiziksel yaklaşımlarla ortaya konulan bulguları da desteklemektedir.



Şekil 5.6. LEV uygulamasına bağlı olarak tüm hücre diyaliz akım kenetleme kayıt formunda aktive olan membran hiperpolarizasyonunun iyonik temelini zıtlanma potansiyeli hesaplanarak biyofiziksel olarak belirlenmesi. A) -40 mV ila -100 mV tutma potansiyelinde tutulan membranın kontrol kayıtları ve 30 μ M LEV'in membranın zıtlanma değeri hemen hemen aynıdır. Zıtlanma potansiyeli 30 μ M LEV ve kontrol kayıtları için sırasıyla -62 mV ve -60 mV 'tur ($n=3$). B) 100 μ M LEV'in uygulaması ile membran yaklaşık olarak -72 mV'ta zıtlanmıştır. Zıtlanma değerinin hesabı için membran -40 mV ila -100 mV tutma potansiyelinde tutulmuştur ($n=3$). C) -40 mV ila -100 mV tutma potansiyelinde tutulan membranın 300 μ M LEV'in uygulamasının ard potansiyele etkisi. Bu nöronlardan alınan kayıtlarda ard potansiyel için zıtlanma değeri -81 mV'tur. ($n=3$).



Şekil 5.7. AP'nin pik değerinin % 10 ve % 90 değerleri arasındaki süreden faydalanarak AP'nin çıkan ve inen fazları için sırasıyla Na^+ ve K^+ kanal iletkenliğinde meydana gelen zaman bağımlı değişimin belirlenmesi. En üste bir AP'nin çıkan ve inen fazları için geçen sürenin örnek gösterimi görülmektedir. A) 30 μM LEV Na^+ ve K^+ kanal iletkenliğine etkisi B) 100 μM LEV Na^+ ve K^+ kanal iletkenliğine etkisi C) 300 μM LEV Na^+ ve K^+ kanal iletkenliğinde olan etkisi görülmektedir ($n=7$ her bir doz için).

5.6. Levetiresetamın Normal ve Diyabetik Farelerde Ağrı Eşiği Üzerine Etkisi

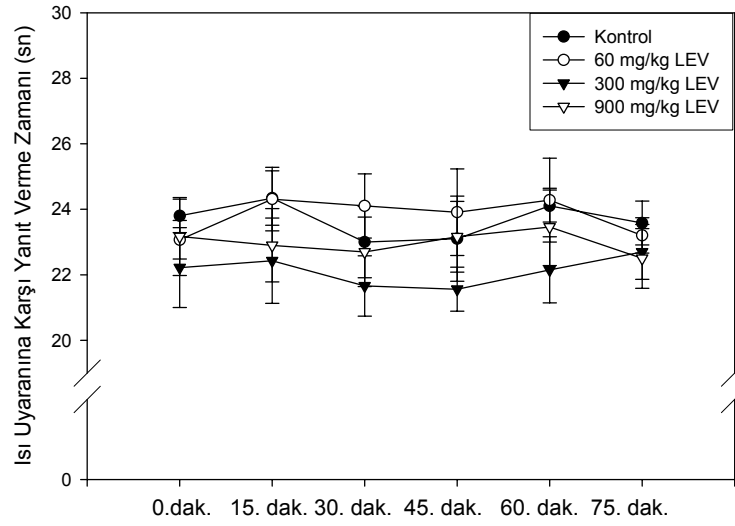
5.6.1. Normal Farelerde Levetiresetamın Ağrı Eşiğine Etkisi

LEV'in normal farelerde ağrı eşiği üzerine olan etkisi *hot plate* testi aracılığı ile incelendi. Farelerin sıcak bir zemin üzerine bırakılıp ısı uyarana davranışsal cevap oluşturmasına kadar geçen süre ölçüldü. Bu ısı uyarana karşı oluşan davranışsal cevap, hayvanın ön ayakların yalaması, ayaklarını hızla karnına doğru çekmesi veya zıplaması, ağrı eşiği olarak ifade edildi.

LEV uygulamasından önce ve sonra ağrı eşiği değerleri ölçüldü. LEV enjeksiyonu öncesi ağrı eşiği değerleri 60, 300 ve 900 mg/kg guruplarında sırası ile 23.0 ± 0.6 , 22.2 ± 1.2 e 23.2 ± 1.1 sn olarak kaydedildi (n=8 her bir gurup için). Yine kontrol gurubunda serum fizyolojik enjeksiyonu öncesi ağrı eşiği 23.8 ± 0.5 sn idi (n=8). Hem LEV uygulanan gurupların, hem de serum fizyolojik uygulanan gurubun enjeksiyon öncesi değerleri arasında farklılık yoktu. LEV (60, 300 ve 900 mg/kg (i.p.)) uygulanan her 3 dozunda da enjeksiyonun 15., 30., 45., 60. ve 75. dakikalarından sonra ölçülen değerlerde enjeksiyon öncesi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Aynı zamanda kontrol değerleri ve LEV gurupları karşılaştırıldığında da benzer şekilde bir değişiklik gözlenmedi (Tablo 5.5).

Ağrı Eşiği Değerleri (sn)						
	0. dakika	15. dakika	30. dakika	45. dakika	60. dakika	75. dakika
Kontrol	23.8±0.5	24.3±0.8	23.0±1.1	23.1±1,3	24.1±0.5	23,6±0.7
60 mg/kg LEV	23.0±0.6	24.3±0.9	24.1±0.9	23.9±1.2	24.3±1.2	24.2±0.6
300 mg/kg LEV	22.2±1.2	22.4±1.3	21.6±0.9	21.5±0.7	22.1±1.0	22.7±0.8
900 mg/kg LEV	23.2±1.1	22.9±1.1	22.7±1.9	23.1±1.0	23.4±1.2	22.5±0.9

Tablo 5.5: Normal farelerin hot-plate testinde ağrı eşiği değerleri (n=8 her bir uygulama gurubu için).



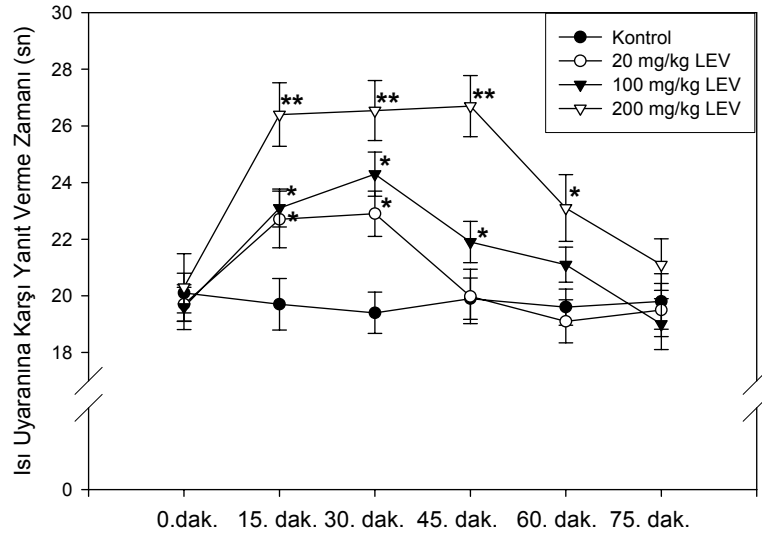
Şekil 5.8: LEV'in (60, 300 ve 900 mg/kg, i.p.) hot-plate testi uygulanan normal farelerde ısı uyarısına karşı verdiği yanıtın ortalama±SH değerleri (n=8, her bir uygulama gurubu için).

5.6.2. Diyabetik Farelerde Levetiresetamın Ağrı Eşiğine Etkisi

STZ indüklemesi ile diyabet oluşturulan farelerde, diyabetik nöropati meydana geldiği bilinmektedir (269). Diyabetik nöropatinin ağrı eşiği üzerine etkisi incelendiğinde, diyabetik nöropatinin bu çalışmada farelerde ağrı eşiğini yaklaşık olarak % 20 oranında azalttığı gözlemlendi. Normal farelerde ağrı eşiği süresi 23.8 ± 0.5 sn iken bu değer diyabetli farelerde 20.1 ± 0.7 sn'ye düştü ($p < 0.05$, Tablo 3.5 ve 3.6). Diyabetik farelerde, LEV'in ağrı eşiği üzerine etkisi zaman ve doz bağımlı olarak incelendi. Öncelikli olarak LEV uygulanmadan önce serum fizyolojik uygulanan diyabetik farelerin kontrol kayıtları alındı. Daha sonra LEV'in 3 farklı dozu 20, 100 ve 200 mg/kg olarak diyabetik farelere uygulandı ve 75 dakika boyunca 15 dakika aralıklarla ağrı eşiği ölçümleri alındı. 20 mg/kg ve 100 mg/kg LEV uygulamasından önce ağrı eşiği değerleri ölçüldüğünde her iki grupta için sırasıyla 19.7 ± 0.6 sn ve 19.6 ± 0.8 sn idi. 20 mg/kg ve 100 mg/kg LEV uygulamasını takiben ağrı eşiği sırasıyla 15. dakikada 22.7 ± 1.0 sn ve 23.1 ± 0.6 sn'ye yükseldi, 30. dakikada ise yine sırasıyla 22.9 ± 0.8 sn ve 24.3 ± 0.8 sn olarak belirlendi. Aynı zamanda 100 mg/kg LEV, 45. dakikada ağrı eşiğini 21.7 ± 0.8 sn çıkardı. Tüm bu artışlar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). 20 mg/kg LEV uygulaması sonrası 45. 60. ve 75. dakikalarda ise ağrı eşiği değişmedi. Yine aynı şekilde 100 mg/kg LEV ise 60. ve 75. dakikalarda ise ağrı eşiğini üzerine etkisi belirlenemedi (Tablo 5.6). 200 mg/kg LEV uygulaması ise 15., 30., 45. ve 60. dakikalarda ağrı eşiğini uygulama öncesi değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırırken, 75. dakikada ölçülen ağrı eşiği değerleri LEV uygulama öncesi ağrı eşiğiyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı (Tablo 5.6, Şekil 5.9)

	Ağrı Eşiği Değerleri (sn)					
	0. dakika	15. dakika	30. dakika	45. dakika	60. dakika	75. dakika
Kontrol	20,1±0.7	19.7±0.91	19.4±0.73	19.9±1,1	19.6±0.6	19.8±0.8
20 mg/kg LEV	19.7±0.6	22.7±1.0*	22.9±0.8*	19.9±0.9	19.1±0.7	19.5±0.9
100 mg/kg LEV	19.6±0.8	23.5±0.6*	24.6±0.8*	21.7±0.7	21.1±0.6	18,5±0.9
200 mg/kg LEV	20.3±0.6	26.4±1.2**	26.5±1.0**	26.7±1.2**	22.8±0.8*	20.7±0.7

Tablo 5.6: Hot-plate testi uygulanan diyabetik farelerin ağrı eşiği değerleri (n=15 her bir uygulama gurubu için, *p<0.05, ** p<0.01).



Şekil 5.9: LEV'in (20, 100 ve 200 mg/kg, i.p.) hot-plate testi uygulanan diyabetik farelerde ısı uyarımına karşı verdiği yanıtın ortalama±SH değerleri, n=15 her bir uygulama gurubu için, *p<0.05, **p<0.01

6. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında LEV'in analjezik etkisi, sıçan DKG hücre kültürlerinde klasik bir biyofiziksel yöntem olan hücresel elektrofizyoloji (tüm hücre diyaliz *patch* kenetleme) ve normal ve diyabetik farelerde nosiseptif davranış testi (*hot plate* testi) kullanılarak incelendi. DKG hücreleri (trigeminal nöronlarla birlikte) primer duyuşal nöronlar olup, nöronların somatosensoryal yolakla oluşturdukları zincirin ilk halkasını teşkil ederler. DKG nöronları Na⁺ kanalları (129, 260) ve purin reseptörleri (177) gibi ağrı ile alakalı hücreşel yapıları selektif olarak eksprese ederler. Normal koşullarda, DKG nöronları sakindir, uyarıldıklarında ise AP'leri ateşleyerek mesajı beyine iletirler. Kültüre DKG hücreleri de ağrı iletiminde rol oynayan çeşitli iyon kanalları ve fonksiyonel reseptörlere sahip olduğundan nosisepsiyonla ilgili *in vitro* hücreşel model olarak yaygın kabul görmekte ve nosisepsiyonun hücreşel mekanizmasının aydınlatılması çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (249). Bir nosiseptif davranış testi olan *hot plate* testi ise *in vivo* olarak ağrı eşiğı değerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında *in vitro* elektrofizyolojik bulguların yanı sıra, *in vivo* nosiseptif davranış testi ile ağrı eşiğı değerleri belirlenerek, LEV'in ağrı üzerine etkisi ile ilgili birbirini tamamlayıcı bulgular elde edildi.

Nöronların uyarılabilirliğindeki değişiklik epilepsinin temelinde yatan en belirgin özelliklerden biridir (63). Normalde her sinir hücresi ya kendiliğinden belli bir frekansta veya diğer hücrelerden aldığı girdilerin cebirsel toplamına göre elektriksel boşalım lar yapar. Fakat bazı durumlarda bu düzen bozulur ve büyük

bir nöron topluluğu birlikte (senkron) ve anormal biçimde boşalım yapmaya başlamasıyla epileptik nöbetler ortaya çıkar. Episodik nörolojik bozukluklarda mutant iyon kanalları rol oynamaktadır, özellikle aşırı derecede membran uyarılabilirliği bunun bir göstergesidir. AEİ AP süresine etki ederek veya frekansının azaltarak etki edebileceği gibi İMP'ni hiperpolarize ederek de etki gösterebilir (229, 245).

Bazı AEİ ağrı oluşumunu önlemede alternatif bir model olarak kullanılabilir (97). LEV'in ağrı üzerindeki etkileriyle ilgili klinik düzeyde çok az da olsa bilgi mevcut olup, bu etkinin hücresel mekanizması bilinmemektedir. Bununla beraber LEV'in duyu sinir hücrelerindeki elektrofizyolojik etkileri bilinmemektedir. Bu çalışmada LEV'in DKG hücrelerinde uyarılabilirlik üzerine ne tür değişikliklere sebep olduğu ve uyarılabilirliğin belirtisi olarak da AP'leri ve parametreleri kullanılarak bu ilacın ağrı iletim yollarındaki muhtemel etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Bir nöronda AP'nin depolarizasyon evresini hücre dışından hücre içine Na^+ kanallarından Na^+ girişi meydana getirirken, AP'nin repolarizasyon evresini ise Na^+ kanallarına göre oldukça geç aktive olan K^+ kanalları vasıtasıyla, hücre içinden hücre dışına doğru K^+ çıkışı sağlamaktadır (113, 183). Aynı zamanda AP esnasında hücre içine az da olsa Ca^{+2} girişi gerçekleşir ve bu da aynı zamanda hem depolarize edici ard potansiyelden hemde hiperpolarize edici ard potansiyelden sorumludur. Bu tez çalışmasındaki deneysel koşullarda AP esnasında Ca^{+2} girişi Ca^{+2} bağımlı Cl^- kanal (I_{ClCa}) iletkenliğinin artışı sağlayarak depolarize edici ard potansiyelin ortaya çıkmasını sağlarken (19, 52, 62), yine AP esnasında Ca^{+2} girişi, Ca^{+2} bağımlı K^+ kanallarını (I_{KCa}) aktive ederek

“hiperpolarize edici” ard potansiyellerinin ortaya çıkmasına da yol açabilir. Hangi tip ard potansiyelin ortaya çıkacağı ya bu zıt yönde etki eden iyon kanallarından daha fazla aktif olanın yansması şeklinde ya da hücrede Ca^{+2} artışının meydana geldiği noktaya topoğrafik olarak daha yakın olan kanal tipinin aktivasyonu ile belirlendiği sanılmaktadır. Bazı hücrelerde AP'nin ardından önce hiperpolarize edici ve onu takiben de depolarize edici ard potansiyellerin ortaya çıktığı sıçan DKG hücrelerinde de gösterilmiştir (19). Duyusal nöronların uyarılabilirliğinin düzenlenmesinde baskın olan Ca^{+2} kanal aktveli iletkenlik önemli rol oynar. Bu çalışmada kullanılan patch kenetleme tekniği, iyon akımının elektriksel olarak ölçülebilmesi, AP kaydı ve benzeri birçok elektrofizyolojik olayların belirlenmesiyle birlikte, iyonların rol aldığı patofizyolojik süreçlerin ortaya konarak tedavi hedeflerinin saptanmasında önemli ilerlemeler sağlamıştır.

6.1. Tüm Hücre Diyaliz Patch Kenetleme Tekniği Akım Kenetleme Modu Bulguları

Bu çalışmanın ilk kısmında tüm hücre diyaliz patch kenetleme tekniği akım kenetleme formunda AP kayıtları alınarak, LEV'in AP ve AP parametreleri üzerine etkisi incelendi. LEV doz bağımlı olarak DKG hücrelerinde membran potansiyelini hiperpolarize etmekte ve AP sonrası hiperpolarize edici ard potansiyelin amplitüdünü artırmaktadır. Bu bulgu LEV'in, kobay hipokampal nöronlarında AP'ni hiperpolarize edici etkisi ile uyumludur (156). LEV'in bu çalışmada gözlenen uyarılabilirliği baskılayıcı etkisi sıçan hipokampal nöronlarında epileptiform ateşlemeleri ve AP frekansını azaltıcı etkisi ile de paraleldir (32, 160, 176). Sıçan DKG hücreleri spontan ritmik aktivite

göstermeyen özellikle ağrı duyusunun iletilmesinde bilinen rolleri olan duyuşal nöronlardır (249). Bu nedenle, bu çalışmada DKG'ları uzun süren uyarılara dahi çoğunlukla tek bir AP oluşumu meydana getirmişlerdir. Çoklu ateşlemeli AP gösteren az sayıdaki DKG hücresine LEV uygulandığında İMP hiperpolarize olmakta ve AP frekansı azalmaktadır. Bu bulgu hipokampal nöronlarda meydana gelen çoklu ateşlemeli AP sayısının azalması bulgusuyla uyumludur (32, 160, 176).

Önemli bir biyofiziksel yaklaşım olan zıtlanma potansiyeli protokolleri, ilaç uygulamasına alınan hücreşel cevaba hangi iyon kanalının aktive olduğuna yönelik değerli kanıtlar sağlar. Tüm hücre diyaliz patch kenetleme modunun akım kenetleme formunda elde edilen zıtlanma potansiyeli -81 mV iken, Nernst denklemi ile hesaplanan (materyal metot, sayfa 57) K^+ zıtlanma potansiyeli ise -97 mV'tur. Deney esnasında ölçülen zıtlanma potansiyeli ile teorik olarak hesaplanan K^+ zıtlanma potansiyelinin birbirine oldukça yakın olduğu görölmektedir. Deney koşullarında K^+ kanallarının % 100 seçici geçirgenlik göstermesi veya zıtlanma potansiyelinin hesaplanması için kullanılan protokolün % 100 doğru sonuç vermesi beklenemez. Fakat Nernst denklemine göre hesaplanarak K^+ için beklenen ve akım kenetleme deneyleriyle elde edilen sonuçlar için sadece -16 mV'luk bir fark bulunması, hem bu klasik biyofiziksel protokolün güvenilirliğini ortaya koymakta, hem de aktive olan akımların K^+ kanal akımı olduğu düşüncesini desteklemektedir. Kayıt koşullarında akım kenetleme deneyleri esnasında K^+ ile birlikte aktif olabilen Cl^- ve Ca^{+2} için Nerst denkleminden hesaplanan sırasıyla -1,07 ve +36 mV potansiyel hesaplanan -97 mV K^+ zıtlanma potansiyeline göre çok daha uzaktır. Aynı zamanda AP'nin inen

fazından sorumlu olan K^+ kanal iletkenliği meydana gelen zaman bağımlı değişim üzerine LEV etkisi incelendiğinde, LEV'in, K^+ kanal iletkenliğinde bir artışla birlikte membranda hiperpolarizasyon meydana getirdiği g6r6ld6. Bu ilave biyofiziksel yaklaşımda, etkinin K^+ kanalları aracılığıyla olabileceğini g6steren bir başka kanıttır. Ancak t6m bunların yanı sıra bu etkinin K^+ kanalları 6zerinden olduğunu s6ylemek bu tezin bulgularıyla açıklanamaz. Bu etkinin K^+ kanalları 6zerinden olduğunu s6ylemek için voltaj kenetleme ve spesifik K^+ kanal blok6r6 çalışmalarıyla bu bulguların desteklenmesi gerekmektedir. Bu bulguların aksine sıçan ve kobay hipokampal n6ronlarında LEV ile ilgili yapılan çalışmalar bu ilacın gecikmiş doğrultucu K^+ kanal akımlarını baskılayarak AP sayısını azalttığını ve AP s6uresini uzattığını ortaya koymuştur (156).

LEV'in DKG h6crelerinde hiperpolarize edici ard potansiyelleri 6zerine etkisi, LEV'in Ca^{+2} bağımlı K^+ kanal iletkenliğini etkileyebileceğini g6stermektedir. Aynı zamanda membran hiperpolarizasyonundaki artışa input rezistansındaki artışın eşlik etmesi bu esnada bir iyon kanalının açıldığını ve bu kanalların y6ksek ihtimalle Ca^{+2} bağımlı K^+ kanalları olabileceğini g6steren ilave bir biyofiziksel delildir. 6nk6 şayet IMP'nde hiperpolarizasyon değilde depolarizasyon g6zlenseydi, bu depolarizasyona input rezistansındaki azalma eşlik edecek, dolayısıyla AP ateşlemek için membran potansiyeli eşiğe ulaşacaktı. Bu alışmada LEV'in Ca^{+2} kanalları 6zerine etkisi incelenmedi. LEV'in bu etkisinin, Ca^{+2} bağımlı K^+ kanalları aracılığıyla olabileceğini g6steren bu bulguların aksine, Ca^{+2} kanalları 6zerine etkisi ile ilgili yapılan h6cresel alışmalar LEV'in sıçan hipokampal n6ronlarında YVAKK'nı inhibe ettiğini (175) 6zellikle de selektif olarak N tipi Ca^{+2} kanallarını blokladığını, epileptiform

aktivite esnasında artan $[Ca^{2+}]_i$ miktarını azalttığını göstermektedir (188). Yine benzer şekilde PC12 sıçan feokromositoma hücrelerinde yapılan çalışmalar LEV'in, G proteini kenetli nöropeptid ve nörotransmitter aktivasyonu ile artan IP_3 bağımlı $[Ca^{2+}]_i$ miktarını konsantrasyon bağımlı olarak azalttığı ortaya koymuştur (42). Tüm bunların yanı sıra LEV DVAKK akımlarını etkilememektedir (152). Tüm bu çalışmalar, ilave çalışmalarla LEV'in DKG'larında benzer etkilerinin olup olmadığını incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Akım kenetleme koşullarında aktif olan bir başka iyon kanalı olan Na^+ kanallarının açılması ise membranda hiperpolarizasyon değil depolarizasyon meydana getirir. Membran depolarizasyonundan sorumlu olan Na^+ kanalları üzerine LEV'in etkisi incelendiğinde LEV'in depolarizasyon evresini bloklayıcı veya azaltıcı bir etkisi bulunmamaktadır. Aynı zamanda AP çıkan faz analizi yapılarak, Na^+ kanal iletkenliği meydana gelen zaman bağımlı değişim üzerine LEV etkisi incelendiğinde, LEV Na^+ kanal iletkenliğini etkilemediği görüldü. Sadece LEV'in 300 μM dozu Na^+ kanal iletkenliğinde geçici bir artış meydana getirdi. Muhtemelen bu artışta bu yüksek dozun meydana getirdiği hiperpolarizasyonla daha az sayıda Na^+ kanalının inaktive olması etkin olabilir. Bu bulgu, LEV'in sıçan ve kobay hipokampal nöronlarında Na^+ kanal iletkenliğini etkilemediğini ve AP süresinin değiştirmede gösteren çalışmaların bulguları ile uyum içindedir (156, 270). Bunun yanı sıra LEV, Na^+ bağımlı $Cl-HCO_3$ değişim mekanizmasını etkileyerek nöronal hücrelerde asidifikasyon meydana getirmekte ve nöronal hücrelerin uyarılabilirliğini azaltmaktadır (140). Bu son mekanizmaya yönelik yorum yapabilecek veri bu tez çalışmasından elde edilmemiştir.

Akım kenetleme deneyleriyle ortaya konulan zıtlanma potansiyelinin Cl⁻ denge potansiyelinden çok uzak olması bulgusu LEV'in hücrel etki mekanizmasının Cl⁻ kanalları aracılığıyla olmayacağını düşündüren indirek bir kanıttır. Bununla birlikte uzun süren uyarı sonucunda DKG hücrelerinde oluşan çoklu ateşlemeli AP esnasında Ca⁺² girişiyle, Ca⁺² bağımlı iletkenliğindeki artışa paralel olarak depolarizasyonun artması ve uzaması sonucu gelişir. LEV'in DKG hücrelerinde oluşan çoklu ateşlemeli AP inhibe etmesi bulgusu Ca⁺² bağımlı Cl⁻ kanallarını etkileyebileceğini göstermektedir. Ancak levitirasetamın Cl⁻ kanal iletkenliğini etkileyip etkilemediğini mevcut çalışmalarla direk olarak ortaya konulmamıştır.

Sıçan DKG sinir hücre kültürlerinde LEV'in istirahat membran potansiyelini hiperpolarize etmesi ve hiperpolarize edici ard potansiyelleri artırması bulgusu, bu antiepileptik ilacın uyarılabilmeyi azalttığını ve ağrı iletimi üzerine etkili olduğunu göstermektedir. Bu çalışmanın devamında LEV'in membran potansiyeli ve AP parametreleri üzerine olan etkilerinin mekanizmasının aydınlatılması amacıyla aşağıdaki yaklaşımlara gerek olduğu düşünülmektedir:

- LEV'in DKG hücrelerinde voltaj keneti çalışmaları ile K⁺ ve Ca⁺² kanalları üzerine etkileri belirlenerek LEV'in bu hücrelerde olası fizyolojik ve terapötik önemi hakkında bilgi elde etme,
- LEV'in DKG hücrelerinde Ca⁺² bağımlı K⁺ kanalları üzerine etkisinin bu kanalların spesifik blokörleri iberitoksin ve karibdotoksin kullanılarak belirlenmesi,

- Kùltùre edilmiş sıçan DKG hücrelerinde direk hücre içi Ca^{+2} görüntüleme tekniğiyle, KCl ile depolarizasyonun sağladığı $[Ca^{+2}]_i$ artışıını LEV'in etkileyip etkilemediğinin belirlenmesi,
- LEV'in membran akımları üzerine etkileri incelenerek hücre içi Ca^{+2} depoları ve Ca^{+2} tetiklemeli Ca^{+2} salıverilmesi ile etkileşiminin belirlenmesi,
- LEV'in DKG hücrelerinde Ca^{+2} kanal alt tipleri üzerine etkisinin olup olmadığının belirlenmesi.

Yukarıda ifade edilen noktaların aydınlatılmasının yanı sıra, ağrı üzerine ortaya konulan bu hücrenel etki mekanizmasının *in vivo* deneylerle desteklenmesi gerekmektedir. Zira teorik olarak inhibitör ve ekstatatör aminoasitler veya voltaj kapılı kanallar hem ağrı oluşumunda, hem de epilepside rol oynamaktadır. Bu nedenle antikonvulsanların bu tür ağrı oluşumunu önlemede alternatif bir model olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (234). Yıllardan beri epilepsi ilaçları nöropatik ağrının tedavisinde kliniklerde kullanılmaktadır. Hatta son yıllarda yapılan çalışmalar bugün AEİ'nin trigeminal nevralki ve ağrı veren diyabetik nöropati ile postherpetik nöropatilerin tedavisinde öncelikli olarak kullanıldığını göstermektedir (17, 204, 227). Yapılan çalışmalar yine benzer şekilde LEV'in nöropatik ağrı tedavisinde güvenli ve etkin bir profile sahip olduğunu göstermektedir (69).

Günümüzde kliniklerde kullanılan ilaçların bir çoğu, insanlar üzerinde kullanılmadan önce hücrenel ve hayvansal deney modeller ile test edilmekte, uzun yıllar süren çalışmalar sonucunda kullanımı uygunsu ancak lisans alabilmektedir. Bu çalışma elektrofizyolojik yaklaşımlarla bu antiepileptik ilacın ağrı üzerine

etkinliğinin olduğunu ortaya koyması ve hücrel olarak ortaya konulan bu etkinin, ilerleyen yıllarda bu ilacın kliniklerde efektif olarak kullanılabilme olasılığının olduğunu göstermektedir.

6.2. Hot-Plate Testi Bulguları

Bu çalışmanın bulguları LEV'in normal farelerde ağrı eşiği üzerine herhangi bir etkisi yokken, nöropatik ağrı oluşturulmuş farelerde analjezik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Yine benzer şekilde sıçanlarda yapılan ağrı eşiği deneylerinde LEV'in analjezik etkisinin, diyabetik sıçanlarda, kronik olarak sıkıştırılarak hasar oluşturulmuş sıçanlara göre daha güçlü olduğunu ortaya koymuştur (11). Bu durum, LEV'in iki farklı farmakolojik mekanizmaya sahip olabileceğini, bu nedenle insanlarda spesifik nöropatik ağrı durumlarında tercih edilebilirliğinin araştırmaya değer olduğunu göstermektedir.

LEV uygulanan normal farelerde *hot plate* testi uygulaması esnasında 900 mg/kg olan en yüksek dozda dahi ağrı eşiği düzeyleri değiştirmemiştir. Bu bulgular daha önceki çalışmalarla uyum içindedir. Lamotrojin, gabapentin, felbamat, karbamazepin ve fenitoin ile yapılan farklı akut ağrı testlerinde, hayvanlarda akut ağrı uyaranına karşı bu ilaçlarda aktivite eksikliği gözlenmiştir (115,164, 181, 221). Sadece tiagabinin *hot plate* testinde antinosiseptif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (118).

Bu çalışma LEV'in diyabetik farelerde analjezik etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. AEI'nin bir çoğunun farklı nöropatik ağrı modellerinde ağrıyı azaltıcı etkileri belirlenmiştir. Periferel nöropati oluşturulan ağrı modellerinde karbamazepin, lamatrojin ve gabapentin allodiniye karşı etkili olduğu ortaya

konmuştur (46, 116, 133, 174, 181). Yine kronik olarak sıkıştırılarak hasar oluşturulmuş sıçanlarda felbamat hiperaljeziyi ve allodiniyi azaltmaktadır (117).

Tüm bu çalışmalar, AEİ'nin çoğunun normal geçici nosiseptif sinyaller üzerine oldukça zayıf etkili olduklarını göstermektedir. Daha ziyade alladoni ve hiperaljeziyle oluşan sensitif sinyalleri inhibe ettikleri görülmektedir.

Bu çalışmada *hot plate* testi uygulanan diyabetik farelerde LEV'in kullanılan etkin dozu (20-200 mg/kg, i.p) epilepsi modelinde de etkindir (126). Bu da LEV'in antiepileptik tedavi için kullanılan dozunun kronik ağrılı hastalarda da medikal tedavi seçeneği olarak tercih edilebileceğini göstermektedir. Back ve Field sıçanlarda periferel nöropati modeli kullandıkları farklı çalışmalarda gabapentinin antiallodinik etkisi olduğunu göstermişlerdir (22, 82). Benzer şekilde Nakamura ve arkadaşları yine sıçanlarda diyabetle oluşan nöropatik ağrı modelinde lamotrojinin ve karbamazepin etkin olduğunu, ancak fenitoinin etkin olmadığını göstermişlerdir (174). Diyabet orjinli nöropatik ağrılı hastaların tedavisinde AEİ'dan olan gabapentin, lamotrijin, pregabalin ve okskarbazepin kullanılmaktadır (23, 73, 205).

Yapılan çalışmalar LEV'in birçok antiepileptik ilaçtan farklı etki mekanizmasına sahip olduğunu göstermektedir. Birçok antiepileptik ilaç, ya Na⁺ kanallarını bloklayarak (83, 151, 199, 225), ya DVAKK'nı inhibe ederek (134, 163) ya da γ -aminobutirik asit (GABA)'erjik iletimi kolaylaştırarak veya glutamaterjik nörotransmisyonu inhibe ederek etki göstermektedirler (119, 158). Ancak LEV'in etki mekanizmasının tüm bu AEİ'dan farklıdır.

Farelerde yapılan çalışmalarda LEV'in beyindeki bağlanma bölgesinin, sinaptik veziküllerin tamamında bulunan membran proteini SV2A olduğu

belirlenmiştir (154). Bu proteinin etki mekanizması bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalar SV2A'nın Ca^{+2} bağlayıcı protein sinaptotagminle etkileşim içinde olabileceğini ortaya koymuştur (24). SV2A'nın yokluğunda, sinaps sayısı ve yapısı etkilemeksizin AP bağımlı GABA'erjik nörotransmisyonunda azalma oluşabileceği ve bunun da epilepsili hastalarda nöbet oluşumuna katkıda bulunabileceği ifade edilmiştir (50). Farelerde LEV'in normal beyinde ve nöronlarda sinaptik salınımı değiştirmedeği, daha ziyade sadece patofizyolojik durumlarda SV2A'nın fonksiyonlarını module ettiğini bulunmuştur (50). Bu da bu çalışma bulguları olan LEV'in normal farelerden ziyade diyabet ile nöropatik ağrı oluşturulan fareler üzerinde antinöroseptif etki meydana getirmesiyle uyum içindedir. Daha önce sıçanlarda ve insanlarda yapılan çalışmalar bu çalışmayla benzer şekilde LEV'in nöropatik ağrı durumunda etkili olabileceğini göstermiştir (11, 74).

LEV'in etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte ilk defa bu çalışma, biyofiziksel yaklaşımlarla DKG sinir hücre kültürlerinde LEV'in membran potansiyeli ve AP sonrası oluşan hiperpolarize edici ard potansiyeli üzerine etkisini ortaya koydu. Aynı zamanda yine ilk defa bu çalışma ile diyabetik farelerde LEV'in *hot plate* testi ile ağrı eşiği olarak kabul edilen nöroseptif davranışın latansını uzatması bulgusunu gösterdi.

Sonuç olarak;

Bu çalışmanın bulguları LEV'in sıçan DKG sinir hücre kültürlerinde yapılan akım keneti çalışmalarında; istirahat membran potansiyelini hiperpolarize ettiği ve AP hiperpolarize edici ard potansiyellerini doz bağımlı olarak artırdığını ortaya koydu. Kullanılan zıtlama potansiyeli protokolü ve AP faz analizi

protokolü bu etkinin K⁺ iyon kanalları üzerinden olabileceğini göstermektedir. İyon kanalları üzerine olan bu etki ve kullanılan biyofiziksel protokoller *hot plate* testi ile gözlenen diyabetli farelerde LEV'in meydana getirdiği antihiperaljezik etkiye iyon kanallarının aracılık ettiğini ortaya koyma yönünden değerli bilgiler sağlamaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Abdulla FA, Smith PA. (2001). Axotomy- and autotomy-induced changes in Ca^{2+} and K^+ channel currents of rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 85: 644–658.
2. Adragna NC, Fulvio MD, Lauf PK. (2004). Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes. *J Membr Biol.* 201: 109-37.
3. Alvarez de la Rosa D, Zhang P, Shao D, White F, Canessa CM. (2002). Functional implications of the localization and activity of acid-sensitive channels in rat peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 99: 2326–231.
4. Angehagen M, Margineanu DG, Ben-Menachem E, Ronnback L, Hansson E, Klitgaard H. (2003). Levetiracetam reduces caffeine-induced Ca^{2+} transients and epileptiform potentials in hippocampal neurons. *Neuroreport* 14: 471-5.
5. Anger T, Madge DJ, Mulla M, Riddall D. (2001). Medicinal chemistry of neuronal voltage-gated sodium channel blockers. *J Med Chem.* 44: 115-37.
6. Anonim (2005). Basic Science of Chronic Pain. Erişim: (www.pmrehab.com/pain2.htm). Erişim tarihi 19.6.2005.
7. Anonim (2005). Diabetic Neuropathies: The Nerve Damage of Diabetes. Erişim: (www.diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/neuropathies). Erişim tarihi: 7.8.2005.
8. Anonim (2005). International Association for the study of pain. Erişim: (<http://www.iasp-pain.org/terms>). Erişim tarihi: 1.9.2005.
9. Anonim (2005). Ion Channels, Transmitters, Receptors & Disease Erişim: (<http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular>). Erişim tarihi: 9.10.2005.
10. Anonim (2005). The Voltage-gated Calcium Channel and Omega-Conotoxins (<http://grimwade.biochem.unimelb.edu.au/cone/omega.html>). Erişim tarihi: 9.10.2005.
11. Ardid D, Lamberty Y, Alloui A, Coudore-Civiale MA, Klitgaard H, Eschalier A. (2003). Antihyperalgesic effect of levetiracetam in neuropathic pain models in rats. *Eur J Pharmacol.* 473: 27-33.
12. Arias-Negrete SS, Kelley K, Chadee K. (1995). Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 208: 582–589.
13. Arner S, Myerson B. (1993). Opioids in neuropathic pain. *Pain Digest* 3-15.
14. Arreola J, Melvin JE, Begenisich T. (1998). Differences in regulation of Ca^{2+} -activated Cl^- channels in colonic and parotid secretory cells. *American Journal of Physiology* 274: 161-166.
15. Artigas P, Gadsby DC. (2002). Ion channel-like properties of the Na^+/K^+ Pump. *Ann NY Acad Sci.* 976: 31-40.
16. Artigas P, Gadsby DC. (2003). Na^+/K^+ -pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 501-5.

17. Attal N, Brasseur L, Parker F, Chauvin M, Bouhassira D. (1998). Effects of gabapentin on the different components of peripheral and central neuropathic pain syndromes: a pilot study. *Eur Neurol.* 40: 191-200.
18. Ayar A, Martin DJ, Ozcan M, Kelestimur H. (2001). Melatonin inhibits high voltage activated calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci Lett.* 313: 73-7.
19. Ayar A, Scott RH. (1999). The actions of ryanodine on Ca^{2+} -activated conductances in rat cultured DRG neurones; evidence for Ca^{2+} - induced Ca^{2+} release. *Naunyn - Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 359: 81-91.
20. Ayar A, Storer C, Tatham EL, Scott RH. (1996). Ryanodine, caffeine and intracellular photorelease of DM-nitrophen and diazo-2 modulates excitability of rat cultured sensory neurones. *Br J Pharmacol* 119: 315.
21. Baccaglini PI, Hogan PG. (1983). Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 80: 594-598.
22. Back SK, Won SY, Hong SK, Na HS. (2004). Gabapentin relieves mechanical, warm and cold allodynia in a rat model of peripheral neuropathy. *Neurosci Lett.* 368: 341-4.
23. Backonja M, Beydoun A, Edwards KR, Schwartz SL, Fonseca V, Hes M, LaMoreaux L, Garofalo E. (1998). Gabapentin for the symptomatic treatment of painful neuropathy in patients with diabetes mellitus: a randomized controlled trial, *JAMA* 280: 1831-1836.
24. Bajjalieh SM. (1999). Synaptic vesicle docking and fusion. *Curr Opin Neurobiol.* 9: 321-8.
25. Baker MD, Wood JN. (2001). Involvement of Na^{+} channels in pain pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* 22: 27-31.
26. Bazil CW, Battista J, Basner RC. (2005). Effects of levetiracetam on sleep in normal volunteers. *Epilepsy Behav.* 7: 539-42.
27. Beck H, Clusmann H, Kral T, Schramm J, Heinemann U, Elger C E. (1997). Potassium currents in acutely isolated human hippocampal dentate granule cells. *J Physiol.* 498: 73-85.
28. Benham CD, Evans ML, McBain CJ. (1992). Ca^{2+} efflux mechanisms following depolarization evoked calcium transients in cultured rat sensory neurones. *J. Physiol.* 455: 567-83.
29. Bialer M, Johannessen SI, Kupferberg HJ, Levy RH, Loiseau P, Perucca E. (1999). Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the fourth Eilat conference. *Epilepsy Res.* 34: 1- 41.
30. Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279: 403-436.

31. Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH. (1994). Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia* 37: 643-650.
32. Birnstiel S, Wulfert E, Beck SG. (1997). Levetiracetam (ucb LO59) affects in vitro models of epilepsy in CA3 pyramidal neurons without altering normal synaptic transmission. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 356: 611-8.
33. Birrell AM, Heffernan SJ, Anselin AD, McLennan S, Church DK, Gillin AG, Yue DK. (2000). Functional and structural abnormalities in the nerves of type I diabetic baboons: aminoguanidine treatment does not improve nerve function. *Diabetologia* 43: 110-116.
34. Bischoff U, Vogel W, Safronov BV. (1998). Na⁺-activated K⁺ channels in small dorsal root ganglion neurones of rat. *The Journal of Physiology* 510: 743-754.
35. Bond CT, Maylie J, Adelman JP. (2005). SK channels in excitability, pacemaking and synaptic integration. *Curr Opin Neurobiol.* 15: 305-11.
36. Brown CD, Dudley AJ. (1996). Chloride channel blockers decrease intracellular pH in cultured renal epithelial LLC PK1 cells. *Br J Pharmacol.* 118: 443-444.
37. Burchiel KJ. (1984). Spontaneous impulse generation in normal and denervated dorsal root ganglia: sensitivity to alpha-adrenergic stimulation and hypoxia. *Exp Neurol.* 85: 257-72.
38. Burgess DL, Jones JM, Meisler MH, Noebels JL. (1997). Mutation of the Ca²⁺ channel beta subunit gene *Cchb4* is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell.* 88: 385-92.
39. Burgess DL, Noebels JL. (1999). Single gene defects in mice: the role of voltage-dependent calcium channels in absence models. *Epilepsy Res.* 36: 111-22.
40. Burgess GM, Mullaney I, McNeill M, Dunn PM, Rang HP. (1989). Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. *J. Neurosci.* 9: 3314-3325.
41. Caffrey JM, Eng DL, Black JA, Waxman SG, Kocsis JD. (1992). Three types of sodium channels in adult rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 592: 283-97.
42. Cataldi M, Lariccia V, Secondo A, di Renzo G, Annunziato L. (2005). The antiepileptic drug levetiracetam decreases the inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent [Ca²⁺]_i increase induced by ATP and bradykinin in PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 313: 720-30.
43. Catterall WA. (1998). Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium.* 24: 307-23.
44. Catterall WA. (2002). Molecular mechanisms of gating and drug block of sodium channels *Novartis Found Symp.* 241: 206-18.
45. Chad JE, Eckert R. (1986). An enzymatic mechanism for calcium current inactivation in dialysed Helix neurones. *J Physiol.* 378: 31-51.

46. Chapman V, Suzuki R, Chamarette HL, Rygh LJ, Dickenson AH. Effects of systemic carbamazepine and gabapentin on spinal neuronal responses in spinal nerve ligated rats. *Pain* 75: 261–272.
47. Cherednichenko G, Hurne AM, Fessenden JD, Lee EH, Allen PD, Beam KG, Pessah IN. (2004). Conformational activation of Ca^{2+} entry by depolarization of skeletal myotubes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 15793-8.
48. Clare JJ, Tate SN, Nobbs M, Romanos MA. (2000) Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. *Drug Discov Today*. 5: 506-520.
49. Cosford NDP, Meinke PT, Stauderman KA, Hess SD. (2002). Recent advances in the modulation of voltage-gated ion channels for the treatment of epilepsy. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 1: 81-104.
50. Crowder KM, Gunther JM, Jones TA, Hale BD, Zhang HZ, Peterson MR, Scheller RH, Chavkin C, Bajjalieh SM. (1999). Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 15268-73.
51. Cummins TR, Dib-Hajj SD, Black JA, Waxman SG. (2000). Sodium channels and the molecular pathophysiology of pain. *Progress in Brain Research*. Sandkuhler J, Bromm B, Gebhart GF (Editörler). Elsevier, Amsterdam, 129: 3–19.
52. Currie KPM, Scott RH. (1992). Calcium activated currents in cultured neurones from rat dorsal root ganglia. *Br J Pharmacol*. 106: 593-602.
53. Currie KPM, Wooton JF, Scott RH. (1995). Activation of Ca^{2+} -dependent Cl^- currents in cultured rat sensory neurones by flash photolysis of DM-nitrophen . *J Physiol*. 482: 291-307,
54. D'Amelio M, Callari G, Gammino M, Saia V, Lupo I, Salemi G, Ragonese P, Savettieri G. (2005). Levetiracetam in the treatment of vascular chorea: a case report. *Eur J Clin Pharmacol*. 60: 835-6.
55. D'Ascenzo M, Vairano M, Andreassi C, Navarra P, Azzena GB, Grassi C. (2004). Electrophysiological and molecular evidence of L-(Cav1), N- (Cav2.2), and R- (Cav2.3) type Ca^{2+} channels in rat cortical astrocytes. *Glia*. 45: 354-63.
56. DeBin JA, Strichartz GR. (1991). Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon* 29: 1403-1408.
57. Decker MW, Meyer MD. (1999). Therapeutic potential of neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists as novel analgesics. *Biochem. Pharmacol*. 58: 917–923.
58. Devor M, Janig W, Michaelis M. (1994). Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats. *J Neurophysiol*. 71: 38-47.
59. Devor M, Wall PD, Catalan N. (1992). Systemic lidocaine silences ectopic neuroma and DRG discharge without blocking nerve conduction. *Pain* 48: 261–268.

60. Devor M. (1994). The pathophysiology of damaged peripheral nerves. Textbook of Pain. 3. baskı. Wall PD, Melzack, R. (Editörler). Churchill Livingstone, Edinburgh, Sayfa: 79–101.
61. Devor M. (1999). Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. Pain. 6: 27-35.
62. Dichter MA, Fischbach GD. (1977). The action potential of chick dorsal root ganglion neurons maintained in culture. J physiol. 267: 281-298.
63. Dichter MA. (1998). Mechanisms of action of new antiepileptic drugs. Adv Neurol. 76: 1-9.
64. DiPalma JR, DiGregorio GJ. (1994). Management of low back and neck pain by analgesics and adjuvant drugs: an update. Mt Sinai J Med. 61: 193-6.
65. Dixon DM, Valkanov M, Martin RJ. (1993). A patch clamp study of the ionic selectivity of the large conductance, Ca²⁺-activated chloride channel in muscle vesicles prepared from *Ascaris suum*. J Memb Biol. 131: 143-149.
66. Djouhri L, Bleazard L, Lawson SN. (1998). Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea pig dorsal root ganglion neurons. J Physiol 513: 857–872.
67. Dubyak GR. (2004). Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms. Adv Physiol Educ. 28: 143-54.
68. Dudel J, W Kuffler. (1961). Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction. J Physiol. 155: 542-562.
69. Dunteman ED. (2005). Levetiracetam as an adjunctive analgesic in neoplastic plexopathies: case series and commentary. J Pain Palliat Care Pharmacother. 19: 35-43.
70. Dunteman ED. (2005). Levetiracetam as an adjunctive analgesic in neoplastic plexopathies: case series and commentary. J Pain Palliat Care Pharmacother. 19: 35-43.
71. Eckert R, Chad JE. (1984). Inactivation of Ca channels. Prog Biophys Mol Biol. 44: 215-67.
72. Edry-Schiller J, Ginsburg S, Rahamimoff R. (1991). A chloride channel in isolated fused synaptosomes from Torpedo electric organ. J Physiol. 438: 627-647.
73. Eisenberg E, Lurie Y, Braker C, Daoud D, Ishay A. (2001). Lamotrigine reduces painful diabetic neuropathy: a randomized, controlled study, Neurology 57: 505–509.
74. Enggaard TP, Klitgaard NA, Sindrup SH. (2005). Specific effect of levetiracetam in experimental human pain models. Eur J Pain. Baskıda
75. Evans MG, Marty A. (1986). Calcium-dependent chloride currents in isolated cells from rat lacrimal glands. J Physiol. 378: 437-460).

76. Everill B, Kocsis JD. (1999). Reduction in potassium currents in identified cutaneous afferent dorsal root ganglion neurons after axotomy. *J Neurophysiol* 82: 700–708.
77. Everill B, Rizzo MA, Kocsis JD. (1998). Morphologically identified cutaneous afferent DRG neurons express three different potassium currents in varying proportions. *J Neurophysiol* 79: 1814–1824.
78. Fang X, Djouhri L, Black JA, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Lawson SN. (2002). The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *J Neurosci.* 22: 7425-33.
79. Fang X, McMullan S, Lawson SN, Djouhri L. (2005). Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat *in vivo* *J Physiol* 565: 927–943.
80. Fay MA, Sheth RD, Gidal BE. (2005). Oral absorption kinetics of levetiracetam: the effect of mixing with food or enteral nutrition formulas. *Clin Ther.* 27: 594-8.
81. Fernandez-Fernandez JM, Nobles M, Currid A, Vazquez E, Valverde MA. (2002). Maxi K⁺ channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line *Am J Physiol Cell Physiol.* 283: 1705 - 1714.
82. Field MJ, McCleary S, Hughes J, Singh L. (1999). Gabapentin and pregabalin, but not morphine and amitriptyline, block both static and dynamic components of mechanical allodynia induced by streptozocin in the rat. *Pain* 80: 391–398.
83. Fischer W, Kittner H, Regenthal R, De Sarro G. (2004). Anticonvulsant profile of flunarizine and relation to Na⁺ channel blocking effects. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 94: 79-88.
84. Forda SR, Kelly JS. (1985). The possible modulation of the development of rat dorsal root ganglion neurones by the presence of 5-HT containing neurones of the brainstem in dissociated cell culture. *Devl Brain Res* 22: 55–65.
85. Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW. (1987). Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol.* 394: 149-72
86. Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW. (1987). Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J Physiol.* 394: 173-200.
87. Galvani L. (1791). De viribus electricitatis in motu musculari commentarius. *Bon. Sci. Art. Inst. Acad. Comm.* 7: 363–418.
88. Ganong WF. (1995). *Tıbbi Fizyoloji*. 16. baskı. Editör : Doğan. A. Barış Kitabevi, İstanbul. Bölüm 19, 365-386.
89. Garcia-Anoveros J, Derfler B, Neville-Golden J, Hyman BT, Corey DP. (1997). BNaC1 and BNaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1459-1464,

90. Gee MD, Lynn B, Basile S, Pierau FK, Cotsell B. (1999). The relationship between axonal spike shape and functional modality in cutaneous C-fibres in the pig and rat. *Neuroscience* 90: 509–518.
91. Gessner G, Heinemann SH. (2003). Inhibition of hEAG1 and hERG1 potassium channels by clofilium and its tertiary analogue LY97241. *Br J Pharmacol.* 138: 161-71.
92. Gilchrist HD, Allard BL, Simone DA. (1996). Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. *Pain* 67: 179-188.
93. Gispen WH, Biessels GJ. (2000). Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends in Neurosciences* 23: 542–549.
94. Gohar O (2005). Contribution of ion channels in pain sensation. *Modulator* 19: 9-13.
95. Gold MS, Shuster MJ, Levine JD. (1996). Characterization of six voltage gated K⁺ currents in adult rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 75: 2629–2646.
96. Gottmann K, Rohrer H, Lux HD. (1991). Distribution of Ca²⁺ and Na⁺ conductances during neuronal differentiation of chick DRG precursor cells *Journal of Neuroscience* 11: 3371-3378.
97. Guay J.(2003). Oxcarbazepine, topiramate, zonisamide, and levetiracetam: potential use in neuropathic pain. *Am J Geriatr Pharmacother.* 1:18-37.
98. Guyton CA, Hall JE. (2000). *Textbook of medical physiology* tenth edition
99. Hall J, Stow R, Sorensen JO, Dolly D, Owen D. (1994). Blockade by dendrotoxin homologues of voltage-dependent K⁺ currents in cultured sensory neurones from neonatal rats. *Br J Pharmacol* 113: 959–967.
100. Hall ZW. 1992 *An Introduction to Molecular Neurobiology* book. Sayfa: 81-120
101. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391: 85-100.
102. Handwerker HO, Kobal G. (1993). Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiol Rev* 73: 639-671.
103. Hanon E, Klitgaard H. (2001). Neuroprotective properties of the novel antiepileptic drug levetiracetam in the rat middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia. *Seizure.* 10: 287-93.
104. Harper AA, Lawson SN. (1985). Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities *J Physiol.* 359: 47-63.
105. Hauser WA, Hesdorffer DC. (1990). *Epilepsy: Frequency, Causes and consequences.* New York: Demos.
106. Hay CH, Trevethick MA, Wheeldon A, Bowers JS, de Belleruche JS. (1997). The potential role of spinal cyclooxygenase-2 in the development of Freund's complete adjuvant-induced changes in hyperalgesia and allodynia. *Neuroscience* 78: 843–850.

107. Heinemann U, Lux HD, Gutnick MJ. (1977). Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Expl Brain Res.* 27: 237-243.
108. Henderson G, Pepper CM, Shefner SA. (1982). Electrophysiological properties of neurons contained in the locus coeruleus and mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in vitro. *Exp. Brain Res.* 45: 29-37.
109. Herzog RI, Cummins TR, Waxman SG. (2001). Persistent TTX-Resistant Na⁺ Current Affects Resting Potential and Response to Depolarization in Simulated Spinal Sensory Neurons. *The Journal of Neurophysiology* 86: 1351-1364.
110. Hille B. (1992). *Ionic channels of excitable membranes.* Sunderland: Sinauer Associates.
111. Hingtgen CM, Vasko MR. (1994). Prostacyclin enhances the evoked-release of substance P and calcitonin gene-related peptide from rat sensory neurons. *Brain Res.* 655: 51–60.
112. Hodgkin AL, Huxley AF (1952). The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116: 473–496.
113. Hodgkin AL, Huxley AF. (1990). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. 1952. *Bull Math Biol.* 5: 25-71.
114. Hoffmann EK, Dunham PB. (1995). Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int Rev Cytol.* 161: 173-262.
115. Hunter JC, Gogas KR, Hedley LR, Jacobson LO, Kassotakis L, Thompson J, Fontana DJ. (1997). The effect of novel anti-epileptic drugs in rat experimental models of acute and chronic pain. *Eur J Pharmacol.* 324: 153-60.
116. Hwang JH, Yaksh TL. (1997). Effect of subarachnoid gabapentin on tactile-evoked allodynia in a surgically induced neuropathic pain model in the rat. *Reg. Anesth.* 22: 249–256.
117. Imamura Y, Bennett GJ. (1995). Felbamate relieves several abnormal pain sensations in rats with an experimental peripheral neuropathy. *J. Pharmacol Exp Ther.* 275: 177–182.
118. Ipponi A, Lamberti C, Medica A, Bartolini A, Malmberg-Aiello P. (1999). Tiagabine antinociception in rodents depends on GABA(B) receptor activation: parallel antinociception testing and medial thalamus GABA microdialysis. *Eur J Pharmacol.* 368: 205–211.
119. Johannessen CU, Johannessen SI. (2003). Valproate: past, present, and future CNS Drug *Rev.* 9: 199-216.
120. Johnston GA. (1996). GABAC receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol Sci.* 17: 319-323.
121. Julius D, Basbaum AI. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-10.

122. Kandel ER, Schwartz JH. (1991). Directly Gated Transmission at Central Synapses. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, (Editörler). Principles of Neural Science. 3rd Ed. New York, Amsterdam: Elsevier Science Publishing. Sayfa: 153-172.
123. Kass RS, Sanguinetti MC. (1984). Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J Gen Physiol.* 84: 705-26.
124. Kim D, Song I, Keum S, Lee T, Jeong MJ, Kim SS, McEnery MW, Shin HS. (2001). Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca²⁺ channels. *Neuron.* 31: 35-45.
125. Kim DS, Choi JO, Rim HD, Cho HJ. (2002). Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Mol Brain Res* 105: 146–152.
126. Klitgaard H, Matagne A, Gobert J, Wulfert E. (1998). Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *Eur J Pharmacol.* 353: 191-206.
127. Klugbauer N, Lacinova L, Marais E, Hobom M, Hofmann F. (1999). Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci.* 19: 684-91.
128. Koerber HR, Druzinsky RE, Mendell LM. (1988). Properties of somata of spinal dorsal root ganglion cells differ according to peripheral receptor innervation. *J Neurophysiol* 60: 1584–1596.
129. Kostyuk PG, Veselovsky NS, Fedulova SA, Tsyndrenko AY. (1981). Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-III: potassium currents. *Neuroscience* 6: 2439–2444.
130. Kostyuk PG, Veselovsky NS, Fedulova SA. (1981). Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-II. Calcium currents. *Neuroscience* 6: 2431-2437.
131. Krishtal O. (2003). The ASICs: signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci.* 26: 477-83.
132. Kwan P, Brodie MJ. (2002). Refractory epilepsy: A progressive, intractable but preventable condition? *Seizure.* 11: 77–84.
133. LaBuda CJ, Little PJ. (2005). Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. *J Neurosci Methods.* 144: 175-81.
134. Lacinova L. (2004). Pharmacology of recombinant low-voltage activated calcium channels. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3: 105-11.
135. Lai HC, Grabe M, Jan YN, Jan LY. (2005). The S4 voltage sensor packs against the pore domain in the KAT1 voltage-gated potassium channel. *Neuron* 47: 395-406.

136. Lamberty Y, Margineanu DG, Klitgaard H. (2000). Absence of Negative Impact of Levetiracetam on Cognitive Function and Memory in Normal and Amygdala-Kindled Rats. *Epilepsy Behav.* 1: 333-342.
137. Laughlin TM, Tram KV, Wilcox GL, Birnbaum AK. (2002). Comparison of Antiepileptic Drugs Tiagabine, Lamotrigine, and Gabapentin in Mouse Models of Acute, Prolonged, and Chronic Nociception *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 302: 1168-1175
138. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 53: 597-652.
139. Lee DS, Goodman S, Dean DM, Lenis J, Ma P, Gervais PB, Langer A. (2002). Randomized comparison of T-type versus L-type calcium-channel blockade on exercise duration in stable angina: results of the Posicor Reduction of Ischemia During Exercise (PRIDE) trial. *Am Heart J.* 144: 60-7.
140. Leniger T, Thone J, Bonnet U, Hufnagel A, Bingmann D, Wiemann M. (2004). Levetiracetam inhibits Na⁺-dependent Cl⁻/HCO₃⁻ exchange of adult hippocampal CA3 neurons from guinea-pigs. *Br J Pharmacol.* 142: 1073-80.
141. Leppert MF, Singh N. (1999). Susceptibility genes in human epilepsy. *Semin. Neurol.* 19: 397-405.
142. Levi-Montalcini R, Dal Toso R, della Valle F, Skaper SD, Leon A. (1995). Update of the NGF saga. *J Neurol Sci.* 130: 119-27.
143. Liesl C, Birinyi S, Simon JG, Richard JL, Graham MN. (2005). Block of voltage-gated potassium channels by Pacific ciguatoxin-1 contributes to increased neuronal excitability in rat sensory neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 175-186.
144. Lingueglia E, de Weille JR, Bassilana F, Heurteaux C, Sakai H, Waldmann R, Lazdunski M. (1997). A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. *J Biol Chem.* 272: 29778-83.
145. Lockard J, Ward AA. (1980). *Epilepsy: A Window to Brain Mechanisms* Raven Press, New York. Sayfa: 97-121.
146. Loscher W, Honack D, Bloms-Funke P. (1996). The novel antiepileptic drug levetiracetam (ucb L059) induces alterations in GABA metabolism and turnover in discrete areas of rat brain and reduces neuronal activity in substantia nigra pars reticulata. *Brain Res.* 735: 208– 216.
147. Loscher W, Honack D. (1993). Profile of ucb L059, a novel anticonvulsant drug, in models of partial and generalized epilepsy in mice and rats. *Eur J Pharmacol.* 232: 147– 158.
148. Loscher W. (2005). How to explain multidrug resistance in epilepsy? *Epilepsy Curr.* 5: 107-12.

149. Lu Z, Klem AM, Ramu Y. (2002). Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J Gen Physiol.* 120: 663-76.
150. Lu Z. (2004). Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels.; *Annu Rev Physiol.* 66: 103-29.
151. Lucas PT, Meadows LS, Nicholls J, Ragsdale DS. (2005). An epilepsy mutation in the beta1 subunit of the voltage-gated sodium channel results in reduced channel sensitivity to phenytoin. *Epilepsy Res.* 64: 77-84.
152. Lukyanetz EA, Shkryl VM, Kostyuk PG. (2002). Selective blockade of N-type calcium channels by levetiracetam. *Epilepsia* 43: 9-18.
153. Luzhkov VB, Aqvist J. (2005). Ions and blockers in potassium channels: insights from free energy simulations. *Biochim Biophys Acta.* 1747: 109-20.
154. Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, Fuks B. (2004). The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 9861-6.
155. MacRury SM, Gordon D, Wilson R, Bradley H, Gemmell CG, Paterson JR, Rumley AG, MacCuish AC. (1993). A comparison of different methods of assessing free radical diabetes and peripheral vascular disease. *Diabetic Medicine* 10: 331-335.
156. Madeja M, Margineanu DG, Gorji A, Siep E, Boerrigter P, Klitgaard H, Speckmann EJ. (2003). Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action? *Neuropharmacology.* 45: 661-71.
157. Maeno-Hikichi Y, Chang S, Matsumura K, Lai M, Lin H, Nakagawa N, Kuroda S, Zhang JF. (2003). A PKC epsilon-ENH-channel complex specifically modulates N-type Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci.* 6: 468-75.
158. Makarska-Bialek K, Kaminski RM, Czuczwar SJ. (2005). Influence of the antagonist of the glycine site of NMDA receptors, MRZ 2/576, on the anticonvulsant activity of conventional antiepileptic drugs in mice. *Pharmacol Rep.* 57: 458-66.
159. Malcangio M, Bowery NG. (1996). GABA and its receptors in the spinal cord. *TIPS* 17: 457-462.
160. Margineanu DG, Klitgaard H. (2000). Inhibition of neuronal hypersynchrony in vitro differentiates levetiracetam from classical antiepileptic drugs. *Pharmacol Res.* 42: 281-5.
161. Margineanu DG, Klitgaard H. (2003). Levetiracetam has no significant gamma-aminobutyric acid-related effect on paired-pulse interaction in the dentate gyrus of rats. *Eur J Pharmacol.* 466: 255-61.
162. Marrion NV, Adams PR. (1992). Release of intracellular calcium and modulation of membrane currents by caffeine in bull-frog sympathetic neurones. *J Physiol.* 445: 515-35.
163. Martin DJ, McClelland D, Herd MB, Sutton KG, Hall MD, Lee K, Pinnock RD, Scott RH. (2002). Gabapentin-mediated inhibition of voltage-activated Ca²⁺ channel currents

- in cultured sensory neurones is dependent on culture conditions and channel subunit expression. *Neuropharmacology* 42: 353-66.
164. Mashimoto S, Ushijima I, Suetsugi M, Akimoto T, Watanabe K, Yamada M. (1998). Stress-dependent antinociceptive effects of carbamazepine: a study in stressed and nonstressed rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol Psychiatry* 22: 159–168.
165. Max MB, Schafer SC, Culnane M, Dubner R, Gracely RH. (1988). Association of pain relief with drug side-effects in postherpetic neuralgia: a single-dose study of clonidine, codeine, ibuprofen and placebo. *Clin Pharmacol Ther.* 43: 363-71.
166. McBurney RN, Neering IR. (1985). The measurement of changes in intracellular free calcium during action potentials in mammalian neurones. *J Neurosci Methods.* 13: 65-76.
167. McCleskey EW. (1994). Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr Opin Neurobiol.* 4: 304-12.
168. McCormack K. (1994). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and spinal nociceptive processing. *Pain* 59: 9-43.
169. McQuay H, Carroll D, Jadad AR, Wiffen P, Moore A. (1995). Anticonvulsant drugs for management of pain: a systematic review. *BMJ.* 311: 1047-52.
170. Metz AE, Jarsky T, Martina M, Spruston N. (2005). R-type calcium channels contribute to afterdepolarization and bursting in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci.* 25: 5763-73.
171. Miller RJ. (1987). Multiple calcium channels and neuronal function. *Science.* 235: 46-52.
172. Miller RJ. (1991). The control of neuronal Ca²⁺ homeostasis. *Prog Neurobiol.* 37: 255-285.
173. Mitterdorfer J, Grabner M, Kraus RL, Hering S, Prinz H, Glossmann H, Striessnig J. (1998). Molecular basis of drug interaction with L-type Ca²⁺ channels. *J Bioenerg Biomembr.* 30: 319-34.
174. Nakamura-Craig M, Follenfant RL. (1995). Effect of lamotrigine in the acute and chronic hyperalgesia induced by PGE₂ and in the chronic hyperalgesia in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Pain* 63: 33–37.
175. Niespodziany I, Klitgaard H, Margineanu DG. (2001). Levetiracetam inhibits the high-voltage-activated Ca(2+) current in pyramidal neurones of rat hippocampal slices. *Neurosci Lett.* 306: 5-8.
176. Niespodziany I, Klitgaard H, Margineanu DG. (2003). Desynchronizing effect of levetiracetam on epileptiform responses in rat hippocampal slices. *Neuroreport.* 14: 1273-6.
177. Norenberg W, Illes P. (2000). Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362: 324-39.

178. Ohlenschlager O, Hojo H, Ramachandran R, Gorlach M, Haris PI. (2002). Three-dimensional structure of the S4-S5 segment of the Shaker potassium channel. *Biophys J.* 82: 2995-3002.
179. Orstavik K, Weidner C, Schmidt R, Schmelz M, Hilliges M, Jorum E, Handwerker H, Torebjork E. (2003). Pathological C-fibres in patients with a chronic painful condition. *Brain* 126: 567-78.
180. Paek A. (2005). Effects of Treatment on Endocrine Function in Patients with Epilepsy. *Curr Treat Options Neurol.* 7: 273-280.
181. Pan HL, Eisenach JC, Chen SR. (1999). Gabapentin suppresses ectopic nerve discharges and reverses allodynia in neuropathic rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 288: 1026-30.
182. Park SY, Choi JY, Kim RU, Lee YS, Cho HJ, Kim DS. (2003). Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression by axotomy and neurotrophins in rat dorsal root ganglia. *Mol Cells.* 16: 256-9.
183. Pehlivan F. (1997). *Biyofizik 2.* Baskı Ankara. Sayfa 102.
184. Perez-Reyes E, Wei XY, Castellano A, Birnbaumer L. (1990). Molecular diversity of L-type calcium channels. Evidence for alternative splicing of the transcripts of three non-allelic genes. *J Biol Chem.* 265: 20430-6.
185. Perucca E. (1999). The clinical pharmacokinetics of the new antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 9: 7-13.
186. Piccolino M. (1998). Animal electricity and the birth of electrophysiology: The legacy of Luigi Galvani. *Brain Res Bull.* 46:381-407.
187. Pietrobon D, Hess P. (1990). Novel mechanism of voltage-dependent gating in L-type calcium channels. *Nature.* 346: 651-5.
188. Pisani A, Bonsi P, Martella G, De Persis C, Costa C, Pisani F, Bernardi G, Calabresi P. (2004). Intracellular calcium increase in epileptiform activity: modulation by levetiracetam and lamotrigine. *Epilepsia.* 45: 719-28.
189. Platika D, Baizer L, Fishman MC. (1985). Sensory neurons 'immortalized' by fusion with neuroblastoma cells. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 98: 301-304.
190. Pleuvry BJ, Lauretti GR. (1996). Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. *Pharmacol. Ther.* 71: 313-324.
191. Popovic M, Biessels GJ, Isaacson RL, Gispen WH. (2001). Learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats in a novel spatial/object discrimination task. *Behavioural Brain Research* 122: 201-207.
192. Prado WA. (2001). Involvement of calcium in pain and antinociception. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34: 449-461.
193. Randall AD, Tsien RW. (1997). Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology.* 36: 879-93.

194. Rasband MN, Park EW, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Trimmer JS. (2001). Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 13373-13378.
195. Rathouz M, Trussell L. (1998). Characterization of outward currents in neurons of the avian nucleus magnocellularis. *J Neurophysiol.* 80: 2824-35.
196. Raymon HK, Thode S, Zhou J, Friedman GC, Pardin JR, Barrere C, Johnson RM, Sah DW. (1999). Immortalized human dorsal root ganglion cells differentiate into neurons with nociceptive properties. *J Neurosci.* 19: 5420-8.
197. Reaven GM, Thompson LW, Nahum D, Haskins E. (1990). Relationship between hyperglycemia and cognitive function in older NIDDM patients. *Diabetes Care* 13: 16-21.
198. Reis J, Wentrup A, Hamer HM, Mueller HH, Knake S, Tergau F, Oertel WH, Rosenow F. (2004). Levetiracetam influences human motor cortex excitability mainly by modulation of ion channel function--a TMS study. *Epilepsy Res.* 62: 41-51.
199. Remy S, Urban BW, Elger CE, Beck H. (2003). Anticonvulsant pharmacology of voltage-gated Na⁺ channels in hippocampal neurons of control and chronically epileptic rats. *Eur J Neurosci.* 17: 2648-58.
200. Ritchie JM, Straub RW. (1957). The hyperpolarization which follows activity in mammalian non-medullated fibres. *J Physiol.* 136: 80-97.
201. Robertson B. (1989). Characteristics of GABA-activated chloride channels in mammalian dorsal root ganglion neurones. *J Physiol.* 411: 285-300.
202. Rodger C, Pleuvry BJ. (1993). Protective effect of flunarizine and nifedipine alone and in combination with anticonvulsant drugs against PTZ-induced seizures in mice. *Neuropharmacology* 32: 257-263.
203. Rola R, Szulczyk PJ, Witkowski G. (2003). Voltage-dependent Ca²⁺ currents in rat cardiac dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 961: 171-8.
204. Rosenberg JM, Harrell C, Ristic H, Werner RA, de Rosayro AM. (1997). The effect of gabapentin on neuropathic pain. *Clin J Pain.* 13: 251-5.
205. Rosenstock J, Tuchman M, LaMoreaux L, Sharma U. (2004). Pregabalin for the treatment of painful diabetic peripheral neuropathy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Pain* 110: 628-638.
206. Rottingen J, Iversen JG. (2000). Ruled by waves? Intracellular and intercellular calcium signalling. *Acta Physiol Scand.* 169: 203-19.
207. Ruby K, Angel A. (1997). Muscarinic Modulation of the Oscillatory and Repetitive Firing Properties of Entorhinal Cortex Layer II Neurons. *The Journal of Neurophysiology* 77: 1813-1828
208. Rudomin P. (1990). Presynaptic inhibition of muscle spindle and tendon organ afferents in the mammalian spinal cord. *Trends Neurosci.* 13: 499-505.

209. Ryan CM. (1988). Neurobehavioral complications of type I diabetes, Examination of possible risk factors. *Diabetes Care* 11: 86-93.
210. Schanne FA, Kane AB, Young EE, Farber JL. (1979). Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*. 206: 700-2.
211. Schaufele N, Diener M. (2005). Pharmacological characterisation of voltage-dependent Ca²⁺ channels in isolated ganglia from the myenteric plexus. *Life Sci*. 77: 2489-99.
212. Schild JH, Kunze DL. (1997). Experimental and modeling study of Na⁺ current heterogeneity in rat nodose neurons and its impact on neuronal discharge. *J Neurophysiol*. 78: 3198-209.
213. Schmader KE. (2002). Epidemiology and Impact on Quality of Life of Postherpetic Neuralgia and Painful Diabetic Neuropathy. *Clinical Journal of Pain*. 18: 350-354.
214. Schmeichel AM, Schmelzer JD, Phillip A. (2003). Low Oxidative Injury and Apoptosis of Dorsal Root Ganglion Neurons in Chronic Experimental Diabetic Neuropathy. *Diabetes* 52: 165-171.
215. Scott RH, Gorton VJ, Harding L, Patel D, Pacey S, Kellenberger C, Hietter H, Bermudez I. (1997). Inhibition of neuronal high voltage-activated calcium channels by insect peptides: a comparison with the actions of omega-conotoxin GVIA. *Neuropharmacology*. 36: 195-208.
216. Scott RH, McGuirk SM, Dolphin AC. (1988). Modulation of divalent cation-activated chloride ion currents. *Br J Pharmac*. 94: 653-662.
217. Scott RH, Pearson HA, Dolphin AC. (1991). Aspects of vertebrate neuronal voltage-activated calcium currents and their regulation. *Neurobiology* 36: 485-520
218. Scott RH, Sutton KG, Dolphin AC. (1993). Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *Trends Neurosci*. 16: 153-60.
219. Scribner KA, Akana SF, Walker CD, Dallman MF. (1993). Streptozotocin-diabetic rats exhibit facilitated adrenocorticotropin responses to acute stress, but normal sensitivity to feedback by corticosteroids. *Endocrinology* 133: 2667-2674.
220. Scribner KA, Walker CD, Cascio CS, Dalman MF. (1991). Chronic streptozotocin diabetes in rats facilitates the acute stress response without altering pituitary or adrenal responsiveness to secretagogues. *Endocrinology* 129: 99-108.
221. Shimoyama N, Shimoyama M, Davis AM, Inturrisi CE, Elliott KJ. (1997). Spinal gabapentin is antinociceptive in the rat formalin test. *Neurosci. Lett*. 222: 65-67.
222. Siegelbaum SA, Koester J. (1991). Ion channels. In: *Principles Of Neuronal Sciences*, ed: Kandel, E.R., and Schwartz, J.H. New York: Elsevier).
223. Sills GJ, Leach JP, Fraser CM, Forrest G, Patsalos PN, Brodie MJ. (1997). Neurochemical studies with the novel anticonvulsant levetiracetam in mouse brain. *Eur J Pharmacol*. 325: 35-40.

224. Sima AA, Sugimoto K. (1999). Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia*. 42: 773-788.
225. Sitges M, Galvan E, Nekrassov V. (2005). Vinpocetine blockade of sodium channels inhibits the rise in sodium and calcium induced by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Neurochem Int*. 2005 Jun;46(7):533-40.
226. Sobko A, Peretz A, Shirihai O, Etkin S, Cherepanova V, Dagan D, Attali B. (1998). Heteromultimeric delayed-rectifier K⁺ channels in schwann cells: developmental expression and role in cell proliferation. *J Neurosci*. 18: 10398-408.
227. Solaro C, Messmer Uccelli M, Uccelli A, Leandri M, Mancardi GL. (2000). Low-dose gabapentin combined with either lamotrigine or carbamazepine can be useful therapies for trigeminal neuralgia in multiple sclerosis. *Eur Neurol*. 44: 45-8.
228. Southall MD, Vasko MR. (2000). Prostaglandin E(2)-mediated sensitization of rat sensory neurons is not altered by nerve growth factor. *Neurosci. Lett*. 287: 33-36.
229. Speckmann EJ, Walden J, Bingmann D. (1990). Contribution of calcium ions to epileptogenesis. *Journal of Basic and Clinical Physiol Send Pharmacol*. 1: 95-105.
230. Steinlein OK, Noebels JL. (2000). Ion channels and epilepsy in man and mouse. *Curr Opin Genet Dev*. 10: 286-91.
231. Stewart R, Liolitsa D. (1999). Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. *Diabetic Medicine* 16: 93-112.
232. Suzuki R, Dickenson A. (2000). Neuropathic pain: nerves bursting with excitement. *Neuroreport* 11: R17-R21.
233. Suzuki R, Stanfa L, Kowaluk E, Williams M, Jarvis M, Dickenson A. (2001). The effect of ABT-702, a novel adenosine kinase inhibitor, on the responses of spinal neurons following carrageenin inflammation and peripheral nerve injury. *Br. J. Pharmacol*. 132: 1615-1623.
234. Swerdlow M. (1984). Anticonvulsant drugs and chronic pain. *Clin Neuropharmacol*. 7: 51-82.
235. Tanelian DL, Victory RA. (1995). Sodium channel blocking agents: their use in neuropathic pain conditions. *Pain Forum* 4: 75- 80.
236. Taylor CP. (1999). Mechanisms of new antiepileptic drugs. *Adv Neurol*. 79: 1011-26.
237. Taylor RE. (1963). Cable theory. In *physical techniques in biological research*. Editor: Nastuk WL. Newyork Academic pres. 219-262
238. Taylor WR, Jones DT, Green NM. (1994). A method for alpha-helical integral membrane protein fold prediction. *Proteins*. 18: 281-94
239. Thomas AP, Bird GS, Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Putney JW. (1996). Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J*. 10: 1505-1517.

240. Tottene A, Volsen S, Pietrobon D. (2000). Alpha(1E) subunits form the pore of three cerebellar R-type calcium channels with different pharmacological and permeation properties. *J Neurosci.* 20: 171-8.
241. Tottene AM, Daniela P. (1996). Functional Diversity of P-Type and R-Type Calcium Channels in Rat Cerebellar Neurons. *The Journal of Neuroscience* 16: 6353–6363.
242. Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN. (1995). Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *J Physiol* 483: 747-758.
243. Tsien RW, Hess P, McCleskey EW, Rosenberg RL. (1987). Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 16: 265-90
244. Tun PA, Nathan DM, Perlmutter LC. (1990). Cognitive and affective disorders in elderly diabetics. *Clinics in Geriatric Medicine* 6: 731–746.
245. Uematsu D, Araki N, Greenberg JH, Reivich M. (1990). Alterations in cytosolic free calcium in the cat cortex during bicuculline-induced epilepsy. *Brain Res Bull.* 24: 285-288.
246. Ullrich N, Bordey A, Gillespie YG, Sontheimer H. (1998). Expression of voltage-activated chloride currents in acute slices of human gliomas. *Neuroscience* 83: 1161-1173.
247. Urenjak J, Obrenovich TP. (1996). Pharmacological modulation of voltage-gated Na⁺ channels: a rational and effective strategy against ischemic brain damage. *Pharmacol Rev.* 48: 21-67.
248. Valevay AY, Hackman JC, Holohean AM, Wood PM, Katz JL, Davidoff RA. (1999). GABA-Induced Cl⁻ current in cultured embryonic human dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 82: 1-9.
249. Vyklicky L, Knotkova-Urbancova H. (1996). Can sensory neurones in culture serve as a model of nociception? *Physiol Res* 45: 1-9.
250. Walden J, Grunze H, Bingmann D, Liu Z, Dusing R. (1992). Calcium antagonistic effects of carbamazepine as a mechanism of action in neuropsychiatric disorders: studies in calcium dependent model epilepsies. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2: 455-62.
251. Walden J, Grunze H, Mayer A, Dusing R, Schirmacher K, Liu Z, Bingmann D. (1993). Calcium-antagonistic effects of carbamazepine in epilepsies and affective psychoses. *Neuropsychobiology* 27: 171-5.
252. Walden J, Speckmann EJ, Witte OW. (1985). Suppression of focal epileptiform discharges by intraventricular perfusion of a calcium antagonist. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 61: 299-309.
253. Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M. (1997). Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem.* 272: 20975-8.

254. Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. (1997). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing Nature 386: 173-177.
255. Waldmann R. (2001). Proton-gated cation channels--neuronal acid sensors in the central and peripheral nervous system. Adv Exp Med Biol. 502: 293-304.
256. Wallquist W, Zelano J, Plantman S, Kaufman SJ, Cullheim S, Hammarberg H. (2004). Dorsal root ganglion neurons up-regulate the expression of laminin-associated integrins after peripheral but not central axotomy. J Comp Neurol. 480: 162-9.
257. Wang LX, Wang Z. (2003). Animal and cellular models of chronic pain. Advanced Drug Delivery Reviews 55: 949-965.
258. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. (1999). Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 7563-7568.
259. Wilson SM, Toth PT, Oh SB, Gillard SE, Volsen S, Ren D, Philipson LH, Lee EC, Fletcher CF, Tessarollo L, Copeland NG, Jenkins NA, Miller RJ. (2000). The status of voltage-dependent calcium channels in alpha 1E knock-out mice J Neurosci. 20: 8566-71.
260. Wood JN, Akopian AN, Baker M, Ding Y, Geoghegan F, Nassar M, Malik-Hall M, Okuse K, Poon L, Ravenall S, Sukumaran M, Souslova V. (2002). Sodium channels in primary sensory neurons: relationship to pain states. Novartis Found Symp. 241:159-68; discussion 168-72, 226-32.
261. Wood JN, Bevan SJ, Coote PR, Dunn PM, Harmor A, Hogan P, Latchman DS, Morrison C, Rougon G, Theveniau M. (1990). Novel cell lines display properties of nociceptive sensory neurons. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 241: 187-194.
262. Wu ZZ, Pan HL. (2004). Tetrodotoxin-sensitive and -resistant Na⁺ channel currents in subsets of small sensory neurons of rats. Brain Res. 1029: 251-8.
263. Yeomans DC, Pirec V, Proudfit HK. (1996). Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: behavioral evidence. Pain 68: 133-140.
264. Yoshida S, Matsuda Y. (1979). Studies on sensory neurons of the mouse with intracellular-recording and horseradish peroxidase-injection techniques J Neurophysiol 42: 1134-1145.
265. Yusaf SP, Goodman J, Pinnock RD, Dixon AK, Lee K. (2001). Expression of voltage-gated calcium channel subunits in rat dorsal root ganglion neurons. Neurosci Lett. 311: 137-41.
266. Zelman DC, Howland EW, Nichols SN, Cleeland CS. (1991). The effects of induced mood on laboratory pain. Pain 46: 105-11.

267. Zhang JM, Donnelly DF, Song XJ, Lamotte RH. (1997). Axotomy increases the excitability of dorsal root ganglion cells with unmyelinated axons. *J Neurophysiol.* 78: 2790-4.
268. Zillmann D, Rockwell S, Schweitzer K, Sundar SS. (1993). Does humor facilitate coping with physical discomfort? *Motivation Emotion* 17: 1-21.
269. Zimmermann M. (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 429: 23-37.
270. Zona C, Niespodziany I, Marchetti C, Klitgaard H, Bernardi G, Margineanu DG. (2001). Levetiracetam does not modulate neuronal voltage-gated Na⁺ and T-type Ca²⁺ currents. *Seizure* 10: 279-86.

8. ÖZGEÇMİŞ

19.01.1976 tarihinde Ankara'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Ankara'da tamamladım. 1997 yılında F.Ü. Mühendislik Fakültesi Elektrik-Elektronik Mühendisliğinden mezun oldum. 1998 yılı şubat ayında F.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Ana Bilim Dalında yüksek lisansa başladım. 1999 yılında öğretim görevlisi olarak önce F.Ü. Teknik Bilimler M. Y. O.'na daha sonra da, Tıp Fakültesi Biyofizik Ana Bilim Dalına atandım. 2001 yılında yüksek lisansımı bitirdikten sonra aynı yıl yine F.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Ana Bilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. 2002-2003 yılları arasında 9 ay süreyle elektrofizyolojik çalışmalar yapmak amacıyla Amerika Birleşik Devletlerinde (State of University NewYork) bulundum. Halen F.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik Ana Bilim Dalında öğretim görevlisi olarak çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk babasıyım.