

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

VALPROİK ASİT, ZİKONOTİD VE SPİNORFİNİN
SIÇAN DORSAL KÖK GANGLİYON SINIR HÜCRE
KÜLTÜRLERİNE ETKİLERİNİN MOLEKÜLER VE
ELEKTROFİZYOLOJİK İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

K. Tuğrul KUZGUN

ELAZIĞ – 2009

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Ramazan BAL

Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Ahmet AYAR _____

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Zülküf AKDAĞ _____

Prof. Dr. Ahmet AYAR _____

Doç. Dr. M. Said BERİLGİN _____

Doç. Dr. Engin ŞAHNA _____

Y. Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK _____

TEŞEKKÜR

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

Tez çalışması süresince yardımlarını gördüğüm Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK'e, öğretim görevlisi Dr. Mete ÖZCAN'a doktora öğrencisi İhsan SERHATLIOğLU'na, Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŐTİMUR'a, Doç. Dr. Selim KUTLU'ya, araştırma görevlileri Ergül ALÇİN'e, teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
KISALTMALAR LİSTESİ	vi
1.ÖZET	viii
2. ABSTRACT.....	10
3. GİRİŞ.....	1
3.1. AĞRI.....	1
3.1.1. PERİFERAL NOSİSEPTİF MEKANİZMALAR VE DUYARLILAŞMA	3
3.1.2.NOSİSEPSİYON VE DORSAL KÖK GANGLİYON HÜCRELERİ.....	5
3.1.3. AĞRI VE İYON KANALLARI.....	6
3.1.3.1. Voltaj Bağımlı Na ⁺ Kanalları.....	7
3.1.3.2. Voltaj Bağımlı Ca ²⁺ Kanalları	7
3.1.3.3.Asite Duyarlı İyon Kanalları (ASIC).....	9
3.1.3.4. Transient Reseptör Potansiyel (TRP) İyon Kanalları	10
3.1.3.5. Pürinerjik Sistem, Pürinerjik Reseptörler ve Ağrı Duyusu.....	12
3.1.3.6. P2Y Reseptörleri.....	13
3.1.4. NOSİSEPSİYON, AĞRI VE ANALJEZİDE PROTEİN KİNAZ C'NİN ROLÜ.....	14
3.1.5. AĞRI/NOSİSEPSİYON HÜCRESEL MEKANİZMASINA ELEKTROFİZYOLOJİK YAKLAŞIM	15
3.1.6. DENEYSEL AĞRI MODELLERİ.....	16
3.1.6.1. Davranışsal Çalışmalar	16
3.1.6.2. Fizyolojik Çalışmalar.....	16
3.1.6.3. Diğer Metodlar.....	17
3.2. ZİKONOTİD	17
3.3. VALPROİK ASİT	18
3.4. SPİNORFİN.....	19
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21

4.1.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinin Primer Kültürü.....	21
4.1.1.2. Kültür Vasatı.....	23
4.1.1.3. Kültür İçin Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri.....	23
4.1.1.4. Diseksiyon Malzemeleri	24
4.1.1.5. Diğer Ekipmanlar.....	24
4.1.1.6. Dorsal Kök Gangliyon Hücre Kültürü için Genel Prensipler	24
4.1.1.7. Dorsal Kök Gangliyonu Hücre Kültürü Protokolü	25
4.1.2. ELEKTROFİZYOLOJİ	27
4.1.2.1. Elektrofizyolojik Deney Düzenegi ve Protokoller.....	27
4.1.2.2. Akım Kenetleme Deneylerinde Kullanılan Kayıt Solüsyonları	29
4.1.2.2.1. Akım Kenetleme Deneyleri İçin Patch Pipeti Solüsyonu.....	30
4.1.2.2.2. Akım Kenetleme Deneyleri İçin Hücre Dışı Kayıt Solüsyonu.....	30
4.1.2.3. Zıtlanma Potansiyelinin Hesaplanması.....	31
4.1.2.4. İlaç uygulaması	32
4.1.3. Aksiyon potansiyellerinin kayıt edilmesi	33
4.1.4. Veri Analizi.....	34
4.2. HÜCRE İÇİ KALSİYUM GÖRÜNTÜLEME VE GÖRÜNTÜ ANALİZLERİ	34
4.2.1 Flüoresan $[Ca^{+2}]_i$ Görüntüleme	35
5.BULGULAR.....	39
5.1. ELEKTROFİZYOLOJİ	39
5.2. HÜCRE İÇİ FLÜORESAN KALSİYUM GÖRÜNTÜLEME BULGULARI	41
5.2.1. Valproik Asidin DKG Hücrelerinde Depolarizasyonla İndüklenen $[Ca^{2+}]_i$, Düzeyi Üzerine Etkileri	42
5.2.2. Zikonotidin DKG Hücrelerinde Depolarizasyonla İndüklenen Hücre İçi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	45
5.2.3. Spinorfinin DKG Hücrelerinde Depolarizasyonla İndüklenen Hücre İçi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	51
6. TARTIŞMA	57
7. KAYNAKLAR	68
8. ÖZGEÇMİŞ	80

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1: Akım Kenetleme Deneyleri İçin Patch Pipeti (Hücre İçi) Solüsyonu

Tablo 4.2: Akım Kenetleme Deneyleri İçin Hücre Dışı Kayıt Solüsyonu

Tablo 5.1: Valproik asidin (100 μM , 300 μM ve 1mM) bazal ve yüksek K^+ ile depolarizasyona bağlı hücre içi kalsiyum artışı (flüoresan oranı) üzerine etkileri

Tablo 5.2: Zikonotidin (1nM, 10 nM ve 1 μM) dozlarının bazal ve yüksek K^+ ile depolarizasyona bağlı hücre içi kalsiyum artışı (flüoresan oranı) üzerine etkileri

Tablo 5.3: Spinorfinin (10 μM) yüksek K^+ ile depolarizasyona bağlı hücre içi kalsiyum artışı (flüoresan oranı) üzerine etkileri

Tablo 5.4: Spinorfinin (100 μM) yüksek K^+ ile depolarizasyona bağlı hücre içi kalsiyum artışı (flüoresan oranı) üzerine etkileri

Tablo 5.5: Spinorfinin (300 μM) yüksek K^+ ile depolarizasyona bağlı hücre içi kalsiyum artışı (flüoresan oranı) üzerine etkileri

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1: CCD-kamera ataşmanı aracılığı ile çekilen fotoğrafta sıçan DKG sinir hücrelerinin aydınlık alan görünümü

Şekil 4.2: Flüoresan kalsiyum görüntüleme sisteminin fotoğrafik görünümü.

Şekil 5.1. Valproik asidin sıçan dorsal kök gangliyon sinir hücresi aksiyon potansiyeli eşik değeri üzerine doz bağımlı etkileri.

Şekil 5.2. Valproik asidin sıçan dorsal kök gangliyon sinir hücresi aksiyon potansiyeli pik değeri üzerine doz bağımlı etkileri.

Şekil 5.3. Valproik asidin sıçan dorsal kök gangliyon sinir hücresi aksiyon potansiyeli süresi üzerine doz bağımlı etkileri.

Şekil.5.4: Membran potansiyelinin (-40 / -120 mV) aksiyon potansiyeli hiperpolarize edici ard potansiyeli amplitütü üzerine etkileri.

Şekil 5.5. Valproik asitin (1 mM) sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi.

Şekil 5.6 Valproik asitin (1 mM) sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi.

Şekil 5.7. Zikonotid (1 μ M) Ön Uygulması yapılan sıçan DKG hücrelerinde Yüksek K^+ uygulamasının $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi.

Şekil 5.8. Zikonotid (1 nM) sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi

Şekil 5.9. Zikonotid (10 nM) sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi.

Şekil 5.10: Zikonotid (1 μ M) sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi

Şekil 5.11: Spinorfin Uygulması Yapılan Sıçan DKG Hücrelerinde Yüksek K^+ Uygulamasının $[Ca^{2+}]_i$ Düzeylerine Etkisi

Şekil 5.12: Spinorfinin (10 μ M) sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi.

Şekil 5.13: Spinorfinin (100 μ M) sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi.

Şekil 5.14: Spinorfinin (300 μ M) sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi.

KISALTMALAR LİSTESİ

[Ca²⁺]_i	: Hücre içi serbest kalsiyum
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
ADİK	: Aside Duyarlı İyon Kanalları
ADP	: Adenozin difosfat
AEİ	: Antiepileptik İlaç
AgCl	: Gümüş klorür
AP	: Aksiyon Potansiyeli
ATP	: Adenozin trifosfat
Ba²⁺	: Baryum İyonu
Ca²⁺	: Kalsiyum İyonu
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
Cl⁻	: Klor İyonu
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
IP₃	: İnoзитol trifosfat
İMP	: İstirahat Membran Potansiyeli
K⁺	: Potasyum İyonu
KCl	: Potasyum klorür
Li⁺	: Lityum İyonu
MΩ	: Megaohm

Mg⁺²	: Magnezyum İyonu
MgCl₂	: Magnezyum klorür
Mosm	: miliozmol
mV	: milivolt
nA	: nanoAmper
Na⁺	: Sodyum İyonu
NaCl	: Sodyum Klorür
NaHCO₃	: Sodyumbikarbonat
NGF	: Sinir Büyütme Faktörü
NH₄	: 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
SO₄⁻	: Sülfat
TEA	: Tetraetilamonyum
TTX	: Tetrodotoksin
VKPK	: Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları
VKSK	: Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları
YVAKK	: Yüksek Voltajla Aktive Olan Kalsiyum Kanalları

1.ÖZET

Bu çalışmanın amacı sıçan dorsal kök gangliyon (DKG) sinir hücrelerinde valproik asit, zikonotid ve spinorfinin etkilerini flüoresan kalsiyum görüntüleme yöntemleri ile belirlemektir. Valproik asitin etkileri patch kenetleme yöntemi ile de irdelenmiştir. Dorsal kök gangliyonları diseke edildi ve enzimatik ve fiziksel işlemlerle izole tek hücrelere ayrıştırılarak %5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C'de tutuldu. Tüm hücre diyaliz patch kenetleme tekniğinin akım kenetleme formu ile bu hücrelerden aksiyon potansiyelleri kaydedildi. Fluoresan kalsiyum görüntüleme deneyleri için, önceden yüzeyi kaplanmış lamellere ekilen DKG hücreleri kalsiyuma duyarlı boya olan Fura-2 AM (1 µM) ile yüklendi. Ters mikroskopa (40X, 1,3 NA objektif) bağlantılı CCD kamera ve yazılım programından oluşan kalsiyum görüntüleme sistemi kullanılarak her bir DKG sinir hücresinde hücre içi serbest kalsiyum düzeyi ([Ca²⁺]_i) 340/380 nm oranındaki değişikliklerden yararlanılarak belirlendi. Veriler eşleştirilmemiş t testi ile analiz edildi ve P <.05 anlamlı kabul edildi. Patch kenetleme deneyleri sadece valproik asit için yapıldı ve valproik asit uygulaması (30 µM, 100 µM ve 300 µM) aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine anlamlı bir etki etmedi (n=16). İlave olarak valproik asit (100 µM, n=10; 300µM, n=22 ve 1 mM, n=56) kalsiyum görüntüleme deneylerinde de yüksek K⁺ (KCl, 30 mM) ile indüklenen [Ca²⁺]_i cevaplarında bir değişiklik meydana getirmedi. Kalsiyum görüntüleme deneylerinde zikonotid (1nM, n=12; 10 nM, n=18 ve 1µM, n=14) KCl ile oluşturulan [Ca²⁺]_i artışlarını doz bağımlı ve güçlü bir şekilde inhibe etti. Yine aynı şekilde spinorfin de doz bağımlı olarak ama daha çok küçük çaplı DKG nöron alt tiplerinde (10µM, n= 22; 100 µM, n= 25 ve 300 µM, n=35) yüksek K⁺ ile indüklenen [Ca²⁺]_i cevaplarını inhibe etti. İlave olarak, spinorfin ile ön muamele

uygulanması sonrasında küçük çaplı nosiseptif özellikteki DKG hücreleri yüksek K^+ ile depolarizasyona cevapsızlık ortaya çıkarken, büyük çaplı non-nosiseptif hücrelerde yüksek K^+ ile indüklenen yüzde $[Ca^{2+}]_i$ cevapları etkilenmedi.

Bu çalışmanın bulguları zikonotid ve spinorfinin, hücre zarı uyarılabilirliği ve nörotransmitter salıverilmesinde anahtar rol oynayan kalsiyum sinyalleşmesini ve hücre içi serbest kalsiyumdaki değişiklikleri inhibe ettiğini ve etkin analjezik olma potansiyeli arz ettiklerini ama valproik asidin bu bağlamda etkisiz olduğunu göstermektedir. Spinorfin ve zikonotidin bu duyuşal hücrelerde hücre içi kalsiyum sinyallerine etkileri ilk defa bu tez çalışması ile ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Aksiyon potansiyeli, valproik asit, zikonotid, spinorfin, hücre kültürü, patch kenetleme, iyon kanalları.

2. ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of valproic acid, ziconotide and spinorphin on cultured rat dorsal root ganglion (DRG) neurones using fluorescence calcium imaging. The effects of valproic acid was also investigated by patch clamp trechnique. Dorsal root ganglia were dissected out and isolated as single cells by enzymatic and physical procedures and placed in humidified incubator containing 5% CO₂ at 37 °C. Action potentials were recorded from these cells using the whole celi current clamp mode of the patch clamp technique. For the fluorescence calcium imaging studies, the DRG neurons were cultured on coated coverslips and loaded with 1 umol Fura-2 AM. Free intracellular Ca²⁺ ([Ca²⁺];) responses were quantified by the changes in 340/380 ratio for individual DRG neurons using fluorescence imaging system consisting of CCD camera coupled to an inverted microscope (with a 40x, 1.30 NA objective) and software. Ali data were analyzed by using unpaired *t* test, *P* <05 defining statistical significance.

Patch clamp experiments were performed only for valproic acid and application of valproic acid (30 uM, 100 uM and 300 uM) action potential parameters (n=16). Furthermore, in fluorescence calcium imaging experiments valproic acid (100 uM, n=10; 300uM, n=22 ve 1 mM, n=56) did not have any significant effect on [Ca²⁺]; responses to membrane depolarisation by HIK⁺ (KC1, 30 mM). Again in calcium imaging experiments, ziconotide (1nM, n=12; 10 nM, n=18 ve 1uM, n=14) strongly inhibited the [Ca²⁺]; increase due to application of HIK⁺ in a dose dependent manner. Additionally spinorphin (10uM, n= 22; 100 uM, n= 25 ve 300 uM, n=35) inhibited the Ca²⁺ transients evoked with HIK⁺ in concentration dependant manner in a subpopulation of small-sized sensory neurons. Furthermore,

after application of spinorphin a significant percent of small-diameter nociceptive DRG neurones did not respond to stimulation by $H\ddot{I}K^+$ while the percentage of the response was not significantly changed in large-diameter non-nociceptive DRG neurones. Results from this study indicates that spinorphin and ziconotide but not valproic acid significantly inhibits calcium signalling, transient changes in free intracellular Ca^{2+} concentration which are key for the modulation of celi membrane excitability and neurotransmitter release, these agents may be effective analgesics. The effects of spinorphin and ziconotide on intracellular calcium signalling in this sensory neurones is established for the first time by this thesis study.

Key words: Action potential, valproic acid, ziconotide, spinorphin, celi culture, patch clamp, ion channels.

3. GİRİŞ

3.1. AĞRI

Uluslararası Ağrı Çalışma Derneği (*International Association for the Study of Pain*) ağrıyı “hoş olmayan, gerçek veya potansiyel doku hasarı veya tehditi ile birlikte bulunan, duyuşsal ve hissi deneyim” olarak tanımlamaktadır (43). Günlük yaşamda yaygın olarak hissedilen hoş olmayan bu duyu ilave doku hasarının gerçekleşmesine karşı koruyucu rol oynayarak “fonksiyonel ve canlı kalma” bağlamında homeostazise katkıda bulunur. Canlı organizmalar potansiyel tehlikelerden korunmak için yakın çevrelerindeki tehlikeleri algılayan özel sistemlere sahiptir. Ortamdaki zararlı uyarıları algılayan bu özel yapı “nosiseptör” olarak adlandırılmaktadır. Uyarılmaları için nispeten yüksek bir eşik değere sahip olan bu nosiseptörlerin şiddetli uyarılması, periferal nosiseptif uçlarda aksiyon potansiyellerinin oluşmasına ve bu elektriksel uyarıların uygun yolla merkezi sinir sistemine ulaşarak ağrı duyusunun oluşmasına ve bu yolla tehlikeli durumdan korunmak için cevapların ortaya çıkmasına yol açar.

Ağrı; süresi, sebebi, anatomik yerleşimi ve şiddetine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmakla beraber akut ağrı ve kronik ağrı olmak üzere iki esas gruba ayrılabilir (43, 86). Akut ağrı homeostazis için adeta *alarm sistemi* olarak görev yaparken; nosiseptif sistemin duyarlılığının artması ile karakterize kronik ağrı, homeostazise katkı sağlamaktan öte *bozuk bir alarm* olarak insanlarda yaşam kalitesini son derece olumsuz etkileyen ve sağlık yardımına başvurmaya en sık sebep olan, önemli ekonomik kayıplara da yol açan bir halk sağlığı problemidir. Polimodal nosiseptif mekanizmaların, duyarlılık artışının altında yatan mekanizmaların aydınlatılması özellikle kronik ağrı durumunun aydınlanarak tedavisine yönelik

gerçek hedeflerin ortaya çıkmasına katkıda bulunacaktır. Bu bağlamda endojen homeostatik kontrol mekanizmalarının ağrı algılaması ve ağrı cevaplarının ortaya çıkmasındaki rolünün ortaya konması son yıllarda giderek daha büyük önem arz etmektedir.

Uluslararası Ağrı Çalışma Grubu verilerine göre Dünya nüfusunu beşte biri baş ağrısı, kas spazmları, bel ağrısı, diş ağrısı ve post operatif ağrı gibi kanser dışındaki nedenlerle orta ve şiddetli ağrıdan muzdarip olduğu bilinmektedir (43, 72). Bu akut ağrılara ilave olarak, kronik ağrı çok daha önemli bir klinik problem olup depresyon ve/veya önemli yaşam kalitesi bozukluklarına yol açmaktadır. Yine Türkiye Baş Ağrısıyla Savaş Derneği, Türkiye Baş Ağrısı Derneği ve Türk Farmakoloji Derneği'nden oluşan bir konsorsiyumun 4036 kişi üzerinde gerçekleştirdiği Türkiye'nin ağrı haritasının çıkarılması üzerine yaptığı 'Türkiye Bilimsel Ağrı Araştırması' adlı çalışmaya göre ülke nüfusunun yaklaşık 48 milyonunun ağrı çekmekte olduğu; baş ağrısı, bel ile bacak ağrılarının en sık görülen ağrı türü olduğu bildirilmiştir (88).

Yukarıda ifade edilen tüm bu sınıflandırmalara ilaveten ağrı, somatik (kas iskelet), visseral (toraks, abdomen, pelvis), sinir ve sempatik kökenli ağrı şeklinde sınıflandırılabilir gibi; nosiseptif (somatik ve visseral) ve nosiseptif olmayan ağrı olmak üzere sınıflandırılabilir. Ağrı oluşumunun primer mekanizması düşünüldüğünde, nosiseptif ve nöropatik ağrı olmak üzere ağrı, iki ana gruba ayrılabilir ve psikojenik ağrı ise üçüncü tip olarak düşünülebilir (43, 72, 84).

Sinir sisteminin primer lezyonu veya disfonksiyonu sonucu gelişen nöropatik ağrı, hasar iyileştikten sonra devam ederek kronik bir hal alır ve koruyucu rolünden ziyade yaşam kalitesini olumsuz etkiler. Santral ve periferik olarak iki ana sınıfa

ayrılır. Periferal nöropatik ağrı beyin ve medulla spinaliste hasar sonucu gelişir (43, 84).

3.1.1. Periferal Nosisseptif Mekanizmalar Ve Duyarlılaştırma

Doğada çok farklı şekil ve sayıda ağrı veren veya duyuşsal nöronları nosisepsiyona duyarlılaştıran ajanlar olmasına rağmen, nosisseptif nöronlarda zararlı sinyalin transdüksiyonu ve duyarlılaşmaya aracılık eden hücreşel yolaklar nispeten daha az ve belirlidir (2, 41). Bütün ajanların nosisseptörleri uyarması için bu hücreleri depolarize etmesi gerekir. ATP ve protonlar gibi bazı ajanlar direk olarak içe yönelik akımları aktive ederek bunu sağlaması, bradikin gibi bazı ajanlar hücre içi sinyalleşme yolaklarını kullanarak bunu gerçekleştirirler. Duyarlılaştırma ise başlıca iki mekanizma üzerinden gerçekleşir: prostaglandin E2 (PGE2), adenzin ve serotonin hücre içi cAMP düzeyini artırarak duyuşsal nöronların uyarılabilmesini artırır. Bradikinin gibi ajanlar PKC'yi aktive ederek duyarlılığı artırır (2,41).

Kapsaisin, formalin veya Freund's adjuvanı gibi kimyasal maddeler veya cerrahi insizyon gibi doku hasarları yangı ve duyarlılaşmış ağrı durumunu gelişmesine yol açar. Artmış periferal ağrı duyarlılığı ATP, bradikinin, PGE2, protonlar, sinir büyütme faktörü ve tümör nekroz faktörü gibi yangı mediatörlerinin duyuşsal nöronlardan ve non nöronal yapılardan interlökinlerin salıverilmesi sonucu gelişmektedir (18,41,72). Periferal ağrı duyarlılaşması kavram ve mekanizması detaylı olarak alındığı mükemmel derlemeler mevcuttur. Bu tez çalışmasında primer afferent duyuşsal nöronlarda valproik asit, zikonotid ve spinorfinin nosisseptif etki mekanizması incelendiği için sadece periferal duyarlılaşma ve ağrı algılama mekanizmalarına kısaca değinilmiştir.

Bununla birlikte, istenmeyen etkilerden arınmış, uzun süreli bir analjezi sağlamak tıp alanındaki en büyük mücadelelerden biri olagelmıştır. Dünyada ağrı ve inflamasyon tedavisine yönelik ilaç maliyetinin yılda yaklaşık 19 milyar dolar civarında olduğu tahmin edilmektedir. Triptanların migren tedavisinde ve siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibitörlerinin inflamatuvar ağrı tedavisinde kullanımı gibi ağrı tedavisinde bazı önemli ilerlemeler olmasına rağmen, yeni ajanların keşfedilmesi de en büyük farmasötik hedeflerden birini oluşturmaktadır. Yine de, aspirin, opiatlar ve lokal anestezipler gibi eski ilaçlara dayalı tedavi hala ağrı tedavisinde esas yaklaşımları teşkil etmektedir (43).

Ağrı, çeşitli hücresele reseptörlerin, iyon kanallarının ve kimyasalların rol oynadığı multi-etiyolojik, kompleks bir süreçtir. Doku hasarı, beyine ağrı sinyallerinin gitmesini sağlayan sinyalleri başlatan kimyasal(ların) salıverilmesine yol çar. Bu sinyaller, nosiseptörlerle ve medulla spinaliste dorsal boynuz nöronları ile sinaps yapan ince az miyelinli (A-delta) ve miyelinsiz (C) grubu liflerle elektriksel formda taşınırlar. Noksus (hoş olmayan, kötü) uyarılar, hücre gövdeleri dorsal kök gangliyonu (DKG), trigeminal gangliyon ve nodoz gangliyonda yer alan primer duyuşal afferentlerle medulla spinalis aracılığı ile üst merkezlere iletilirler. Uçlarında yer alan mekanosensitif iyon kanallarını direk olarak aktive ettiği sanılmaktadır (38).

Dokuda hasarı takiben, primer afferent nöronlarda ortaya çıkan aşırı duyarlılığın iyon kanal ekspresyonunda değişme sonucu oluştuğuna yönelik güçlü kanıtlar elde edilmiştir (27). İyon kanalları, özellikle nosiseptif nöronlarda ağırlıklı olarak bulunan alt tipleri analjezik ilaç geliştirilmesi için cazip bir hedef teşkil etmektedir (92, 100).

Klinik araştırmalarda etik kısıtlamalar nedeniyle ağrı araştırmalarında deney hayvanı ve çeşitli hücresele modeller kullanılarak araştırmalar gerçekleştirilmekte ve bu alanda klinik önemi olan bilgiler elde edilmektedir. DKG nöronları ağrı için “hücresele model” olarak kabul edilmektedir (64, 91). DKG hücrelerinin primer kültüründen tüm hücre diyaliz patch kenetleme yöntemi ile kayıtlar alınarak iyon kanallarının nosisepsiyondaki rolü yaygın olarak çalışılmaktadır.

3.1.2.Nosisepsiyon Ve Dorsal Kök Gangliyon Hücreleri

DKG duyuusal sinirlere ait hücre gövdelerini ihtiva eder. DKG hücrelerinin çoğu mekanik uyarıya cevap verir ve buna göre bu hücreler geniş bağlamda düşük eşikli mekanoseptörler ve yüksek eşikli nosiseptörler olarak iki ana gruba ayrılabilir. Mekanik uyarının bu nöronların reseptif uçlarında yer alan mekanosensitif iyon kanallarını direk olarak aktive ettiği sanılmaktadır. Bununla beraber, bu iyon kanallarının moleküler yapısı ve fizyolojik ve farmakolojik özellikleri de tam anlaşılamamıştır (92, 93).

DKG nöronları hücre gövdelerinin çapına göre küçük, orta ve büyük çaplı olmak üzere üç alt sınıfa ayrılırlar. Genelde hücre gövde çapı < 30 µm olan DKG nöronları potansiyel nosiseptörler olarak değerlendirilirken, 30 µm’den büyük çaplı DKG nöronları da non-nosiseptif olarak kabul edilirler. Bu sınıflandırma A-delta ve C lifi afferentlerinde aksonal ileti hızı ile nöron çapı arasındaki pozitif ilişkiyi esas alan Harper ve Lawson’un (38) bu konudaki öncül çalışmalarını esas almaktadır. Miyelinsiz C-lifleri (noksius bilgiyi iletirler) küçük çaplı hücre gövdesine sahip nöronlardan köken alırken, miyelinli A-alfa ve A-beta lifleri (düşük eşikli non-noksius bilgileri iletirler) büyük çaplı hücre gövdesine sahip nöronlardan köken

alırlar. A-delta lifleri (nosiseptif olabilirler), orta ve küçük çaplı hücre gövdesine sahip nöronlardan köken alırlar.

Küçük çaplı DKG nöronları genelde miyelinsiz C-lifleri olup, nosiseptörlere ait olan bu C-lifleri de ağrı, kaşınma ve yanma duyularına ait bilgileri iletirler. A-alfa ve A-beta sinyalleri genelde proprioseptif sinyalleri taşırlar. Orta ve büyük çaptaki DKG hücreleri miyelinli aksonlara sahip olup düşük eşikli mekanoreseptörlerden bilgi taşırlar (38, 53, 94)

Klinik araştırmalarda etik kısıtlamalar nedeniyle ağrı araştırmalarında deney hayvanı ve çeşitli hücrenel modeller kullanılarak araştırmalar gerçekleştirilmekte ve bu alanda klinik önemi olan bilgiler elde edilmektedir. *İn vivo* olarak DKG nöronlarının uçlarında bulunan reseptörlerin, bu hücrelerin kültürü yapıldığı *in vitro* şartlarda hücre gövdelerinde ekprese olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle kültüre edilmiş DKG sinir hücrelerinin gövdeleri nosiseptif araştırmalar için iyi bir hücrenel model olarak kabul edilmektedir.

3.1.3. Ağrı Ve İyon Kanalları

Periferal primer duyusal afferent nöronlarda bulunarak hasar sonrası bu duyusal nöronların uyarılabilmelerini ve dolayısı ile ağrı duyusunun algılanmasını etkileyen pek çok iyon kanalı vardır (52). Voltaj bağımlı Na⁺ ve Ca⁺² kanalları, ligand kapılı iyon kanalları, transient reseptör potansiyel kanalları (TRP), asite duyarlı iyon kanalları (ASIC), ile pürinerjik P2X, kâinat, AMPA ve NMDA reseptörleri ağrı fizyopatolojisinde rol oynayan başlıca iyon kanalları olup bu konu güncel derlemelerde detaylı olarak ele alınmıştır (13, 52, 92, 93).

3.1.3.1. Voltaj Bağımlı Na⁺ Kanalları

Voltaj bağımlı sodyum kanalları primer duyuşal nöronlar dahil, akson boyunca elektriksel akım iletilmesinde anahtar rol oynar. Doku hasarı sonucunda, primer duyuşal nöronlarda gelişen hipereksitabilitede voltaj bağımlı sodyum kanallarının rol oynadığı ve kronik ağrılı nöropatilere katkıda bulunduğı bilinmektedir (52, 49).

Voltaj bağımlı Na⁺ kanalları tetrodotoksin (TTX) duyarlılıklarına göre: TTX-duyarlı ve TTX-dirençli olmak üzere 2 ana gruba ayrılırlar. Selektif NaV tetrodotoksin-dirençli kanallar (NaV 1.8 ve NaV 1.9) özellikle nosiseptif DKG nöronlarında eksprese olup; normal ve/veya patolojik ağrı algılanmasında rol oynadıklarından dolayı, nöropatik ağrı dahil inatçı ağrı olgularında güvenli yan etki profiline sahip periferel mekanizmaya yönelik analjezik geliştirilmesi için hedef teşkil etmektedirler (73).

3.1.3.2. Voltaj Bağımlı Ca²⁺ Kanalları

Voltaj bağımlı Ca²⁺ kanalları da başta DKG nöronları olmak üzere, dorsal boynuzda nörotransmitter salıverilmesinin kontrolünde rol oynayarak, nosiseptörlerde eksprese olurlar (14, 15). Voltaj bağımlı Ca²⁺ iyon kanalları poru oluşturan α -1 alt ünitesi ve onun fonksiyonu module eden β , γ ve α -25 yardımcı ünitelerinden oluşmaktadır. Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını kodlayan 10 farklı gen tespit edilmiş olup 3 ana alt gruba ayrılmaktadır: Cav1. ailesi (Cav1.1- 1.4, L-tipi akımlara karşılık gelmektedir), Cav2. ailesi (P/Q tipi akımlara karşılık gelmektedir), Cav2.2 (N-tipi akımlara karşılık gelmektedir), Cav2.3 (R- tipi akımlara karşılık gelmektedir) ve Cav3. (Cav3.1-3.3 T- tipi akımlara karşılık gelmektedir) (14, 15). 51

yardımcı alt ünitesinin nöropatik ağrı iletiminde önemli rol oynadığına dair kanıtlar elde edilmiştir. DKG nöronlarındaki düzeyi deneysel hasara bağlı ağrı deneylerinde belirgin olarak artmaktadır. Bu yardımcı alt ünitenin voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının modülasyonu yoluyla ağrıya katkıda bulunduğu sanılmaktadır.

Spinal kord düzeyinde ağrı iletiminde kritik rol oynadığından, ağrı kesici ajan araştırmalarında N-tipi kalsiyum kanalları özel ilgi görmektedir (3). N-tipi kalsiyum kanal blokerlerinin P maddesi gibi ağrı mediatörü nöropeptitlerin salıverilmesini inhibe ederek ağrıyı baskıladığı gösterilmiştir. Nöroseptörlerde spesifik olarak eksprese olmayan N-tipi kalsiyum kanallarının peptit yapıdaki blokerlerinin ciddi yan tesirleri olacağı için N-tipi kalsiyum kanallarının nöroseptif primer afferentlere özgü alt tiplerinin ve onların organik blokerlerinin geliştirilmesi çabaları devam etmektedir.

Diğer bir Ca^{2+} kanal alt tipi olan P/Q alt tiplerinin migren patogenezisinde rol aldığı ve bu kanala blokerlerinin bu amaçla umut vaat etmektedir (99).

T-tipi Ca^{2+} kanalları ilk defa duyuşal nöronlarda (DKG nöronları) tanımlanmasına ve nörosepsiyonda rolleri olduğuna dair bulgular olmasına rağmen spesifik blokerlerinin olmayışı T-tipi Ca^{2+} kanallarının nöropatik ağrıdaki rolünü ortaya koymada kısıtlama doğurmaktadır (29, 83).

İkincil Haberci Olarak Kalsiyum; Hücre içi serbest kalsiyum sinyalleri sekresyon ve kontraksiyonun kontrolü gibi kısa süreli cevaplar ile büyümenin kontrolü, hücre bölünmesi ve apoptozis gibi uzun süreli düzenlemelere kadar çok çeşitli hücreşel fonksiyonlara aracılık eder (8,9). Kalsiyum sinyallerinin uzaysal ve zamansal detayları pek çok hücrede yüksek ayrıntısına kadar aydınlatılmıştır.

Fosfolipaz C kenetli reseptörler aracılı olarak aktive olan kalsiyum sinyalleri başlıca iki kaynaktan kaynaklanmaktadır: endoplazmik retikulum kalsiyum depolarından kalsiyum salıverilmesi ve membran iyon kanalları aracılığı ile hücre dışından hücre içine kalsiyum girişi. İkinci mekanizmanın detayları daha az bilinmektedir. Kalsiyum depoları aracılı olarak “depo kontrollü ("store-operated)" Ca^{+2} kanalları aracılığı ile hücre içine kalsiyum girişi olduğu bilinmesine rağmen, hücre içi kalsiyum depolarının boşalmasının reseptörlerin fizyolojik aktivasyonunda nasıl rol oynadığı açık değildir.

Sinir hücrelerinde de kalsiyum transmitter salıverilmesi, aksiyon potansiyeli ateşlemesi ve uyarılabilmenin kontrolü, gen ekspresyonu ve enzim aktivasyonu gibi çeşitli hücresel fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynayan bir “ikincil habercidir (8, 9, 14, 15). Ayrıca Ca^{+2} iyonları nöronal hücre gelişmesi, farklılaşması ve nöronal hücre ölümünde de rol oynar (8,9). Bu nedenle hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonu ($[Ca^{+2}]_i$) sıkı bir kontrol altındadır (84). $[Ca^{+2}]_i$ düzeyindeki artış ya hücre dışından reseptör-aracılı veya voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları aracılığı ile kalsiyum girişi, ya da hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesi ile gerçekleşir (84).

3.1.3.3. Asite Duyarlı İyon Kanalları (ASIC)

Yangı esnasında hücre dışı pH düşer (<6) ve yangıya bağlı olarak gelişen doku asidozisi önemli ağrı kaynağıdır (56). Gelişen asidozis bir Na^+ kanal tipi olan ASIC kanallarını aktive eder. ASIC3 alt tipi ağrı ile alakalı olup DKG nöronlarında en fazla bulunan alt tiptir. ASIC3 hiperaljezi ve alodiniye katkıda bulunur (17, 62).

3.1.3.4. Transient Reseptör Potansiyel (TRP) İyon Kanalları

Bir katyon kanal ailesi olan TRP (Tranzient Reseptör Potansiyeli) iyon kanalları aktivasyon mekanizmaları ve iyonlara karşı geçirgenlikteki seçicilikleri yönünden diğer iyon kanallarından ayrılırlar. Bu grup iyon kanallarında bulunan TRP proteinleri ışık, ses, kimyasal ve mekanik uyarılara duyarlılık göstererek dokunma, tat ve koku başta olmak üzere duyu fizyolojisinde kritik rol oynar (24). Amino asit dizin homolojisi esas alınarak yapılan sınıflandırmaya göre memeli TRP kanalları 6 alt sınıfa ayrılmaktadır: TRPC (Kanonik), TRPV (Vaniloid), TRPM (Melastatin), TRPP (Polisistin), TRPML (Mukolipin) ve TRPA (Ankirin) (20, 21, 61) TRPV1, TRPV2, TRPV3 ve TRPM8 genel olarak termoreseptörler ve TRPV4 ve TRPA1 mekanoreseptörler olarak sınıflandırılmaktadır.

Belli tip TRP kanalları farklı ısı değişikliklerine duyarlıdır. TRPV1 konforu rahatsız edecek düzeyde sıcak ($>43^{\circ}\text{C}$) (13) ve TRPV2 çok sıcak derecelere ($>52^{\circ}\text{C}$) (12, 13) duyarlılık gösterirken; TRPV3 ($>30-39^{\circ}\text{C}$) (76) ve TRPV4 ($25-34^{\circ}\text{C}$) ise daha ılımlı ısı düzeylerinin algılanmasına duyarlıdır (36). TRPM8 ise serin ısı derecelerinin algılanması (58) ve TRPA1 soğuk sensörüdür (48). Isı duyarlı TRP kanalları dorsal kök gangliyonu ve trigeminal ganglion nöronlarında eksprese edilirken, TRPV3 ve TRPV4 aynı zamanda deri keratinositlerinde bulunmaktadır (64).

Kapsaisin reseptörü veya vaniloid reseptörü olarak da bilinen TRPV1 reseptörlerinin özellikle duyu nöronlarda ve nosiseptörlerde bulunması bu alt tipin doku hasarı ve inflamasyonla ilgilidir (22, 80, 84, 87). Yangı mediatörleri olan hücre dışı ATP, prostaglandin E₂, glutamat, sinir büyüme faktörü ve bradikininin dorsal kök ganglion hücrelerinde TRPV1 kanallarının duyarlılığını artırmaktadır (84,85).

Özellikle TRPV1 olarak bilinen kapsaisin reseptörünün keşfedilmesi, duyu sinir fonksiyonu ve ağrı kavramının anlaşılmasına önemli katkıları olmuştur. TRP kanallarının nosiseptif duyu iletiminde, duyu sinirinin aktivasyonu, nörotransmitter salınması ve inflamatuvar mediatörlerin salınması gibi süreçlerde rol aldığı tespit edilmiştir. Bu yaygın fonksiyonları, TRP kanallarının selektif inhibisyonunun ağrı dindirmede etkili olacağına güçlü kanıt niteliğindedir.

TRPV1 ilk olarak küçük ve orta çaplı DKG hücrelerinde, trigeminal ve nodöz gangliyon hücrelerinde tespit edilmiştir (13) ardından TRPV1 başka nöronal ve nöron olmayan hücrelerde de tanımlanmışsa da (37, 73) en yüksek ekspresyonu duyu sinir hücrelerindedir (72).

Genetik olarak fonksiyonel TRPV1 knock-out edilmiş farelerde kapsaisin, resiniferatoksin ve ısı (<50°C) uyarılarına cevabın kaybolduğu ancak zararlı mekanik uyarılara normal fizyolojik yanıtın devam ettiği tespit edilmiştir (12).

TRP reseptör kanal aktivitesi hem hücre dışından kalsiyum girişine sebep olarak hem de hücre içi organellerden kalsiyum salınmasına aracılık ederek $[Ca^{2+}]_i$ katkıda bulunur. TRP reseptör kanal ailesi arasında TRPCler, TRPVler, TRPM1, 2, 3, 6, 7 ve 8, TRPA1, TRPP2, 3, ve 5 ve TRPML1, 2, 3 kalsiyum girişine aracılık eder. Bu kanalların geçirgenlik oranı P_{Ca}/P_{Na} TRPM2 için 0.3, TRPV5 ve TRPV6 için ise >100 arasında değişmektedir. Son çalışmalar, bazı TRP kanal tiplerinin (ör. TRPV1 ve TRPM8) hücre içi kalsiyum salınma kanalı olarak görev yaptığını ortaya koymaktadır (88, 99). Ca^{2+} salınma kanalı fonksiyonu ile uyumlu olarak, TRPML1 (68) ve TRPP2 (47) gibi bazı az çalışılmış kanal alt tiplerinin hücre içi membranlarda lokalize olduğu bilinmektedir.

3.1.3.5. Pürinerjik Sistem, Pürinerjik Reseptörler ve Ağrı Duyusu

Hücre içi çeşitli fizyolojik rollerine ilave olarak, hücre dışı adenzin 5'-trifosfat (ATP) hem periferal (92) hem de santral sinir sisteminde bir nörotransmitter veya nöromodulatör olarak da rollere sahiptir (30). ATP sinaptik veziküllerde depolanır ve noradrenalin, asetilkolin veya diğer transmitterlerle birlikte salıverilir (77) ve kendilerine özgü hücre yüzeyi reseptörleri üzerinden etki eder.

Hücre ve doku hasarı olduğunda, ekzositoz veya plazma membranı taşıyıcılarının aktivasyonu yoluyla ATP hücre dışı ortama salıverilir. Eksitatör veya eksitatör olmayan pek çok hücre tipinin hücre yüzeyinde ATP veya diğer nükleotitler için spesifik reseptörler bulunur. Nükleotit reseptörleri P1 adenzin reseptörlerinin aksine P2 reseptörleri olarak adlandırılırlar.

Pürinerjik reseptörler, farmakolojik, biyokimyasal ve moleküler esaslara göre P1 (aynı zamanda adenzin reseptörleri olarak da adlandırılırlar) ve P2 reseptörler olarak iki esas gruba ayrılırlar. P2 pürin reseptörleri primer olarak ATP, ADP, UTP ve UDP'ye duyarlıdırlar.

P2 reseptörleri de moleküler yapıları ile sinyal transdüksiyon mekanizmalarındaki farklar sebebiyle P2X (ki bunlar ligand kapılı iyon kanallarıdır, iyonotropik reseptör) ve P2Y (ki bunlar da G protein-kenetli, metabotropik reseptörlerdir) olmak üzere iki esas alt gruba ayrılırlar (68). P2X ve P2Y reseptörlerinin hücre içi Ca^{2+} düzeylerini artırdığı bilinmektedir. P2X reseptörleri hücre içi kalsiyum düzeyini hücre membranından Ca^{2+} , Na^{+} ve K^{+} gibi seçici olmayan (non-selektif) katyonların hızla geçişine yol açarak artış sağlarken, P2Y reseptörlerinin sağladığı hücre içi Ca^{2+} artışı hücre içi depolardan kalsiyum

saliverilmesi yoluyla gerçekleşir (63). Memelilerde bu güne kadar 7 farklı P2X reseptörü (P2X₁-P2X₇) ve sekiz farklı P2Y reseptörü alt tipi (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ ve P2Y₁₄) klonlanarak P2 reseptör ailesinin üyesi olduğu kabul edilmiştir.

Doku hasarı sonucu ATP salıverildiğinden, ATP P2X₃ reseptör izoformunun hasarı algılamada (nosisepsiyon) rol aldığı kabul edilmektedir. Gerçekten de P2X₃ reseptörü olmayan farelerde ağrılı sinyallere ve hatta dokuyu yakmayacak düzeylere kadar varan ısı uyarımına (<45 °C) az duyarlılık gösterir (77).

3.1.3.6. P2Y Reseptörleri

Memelilerde bugüne kadar 8 farklı fonksiyonel P2Y reseptör alt tipi tespit edilmiştir. G-protein kenetli bu reseptörler tipik olarak hücre dışı N-terminali ve hücre içi C-terminali ihtiva eder (1, 51). P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ ve P2Y₆ G_{q/11}'e bağlanır ve fosfolipaz C'yi aktive eder ve hücre içi depolardan salıverilme yoluyla hücre içi serbest kalsiyum miktarında ([Ca²⁺]_i) artışa sebep olurken; P2Y₁₂, P2Y₁₃ ve P2Y₁₄ G_i'ye bağlanarak, adenilat siklazı inhibe eder ve hücre içi sAMP seviyesini azaltır.

P2Y₁₁ reseptör aracılı sinyalleşme farklı olup hem G_{q/11} hem de G_i'ye bağlanabilir ve böylece ligand bağlanmasını her iki hücre içi yolağa ilintilendirebilir. Bu sinyalleşme mekanizmalarına ilave olarak, P2Y reseptörleri nöronlar ve endokrin hücre serilerinde voltaj bağımlı N tipi Ca²⁺ kanallarını inhibe, yine nöronlarda G-protein kapılı içe yönelik düzeltici K⁺ kanallarını aktive eder (1, 51).

3.1.4. Nosisepsiyon, Ağrı Ve Analjezide Protein Kinaz C'nin Rolü

PKC enzim ailesinin enzimler, iyon kanalları ve membran reseptörleri gibi nosiseptörlerin uyarılma ve duyarlılaşmasında anahtar rol oynayan hücrenel komponentleri fosforile ederek aktive ettiği bilinmektedir. Aktivasyonu için Ca^{+2} ve fosfolipid gerektirir. Çeşitli dokularda yaygın ekspresyonu ve yaygın fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerdeki rolleri PKC enzimlerini pek çok hastalıkta tedavide hedef sinyal molekülleri haline getirmektedir (76).

Medulla spinalisin superfisial laminası gibi anatomik olarak periferel hasar bölgelerinden primer afferentlerle ağrı iletiminde rol oynadığı tespit edilmiş yapılarda PKC ekspresyonunun tespit edilmiş olması (42) bu enzim ailesinin rol aldığı hücrenel sinyalleşmenin nosisepsiyon/ağrı iletiminde rol aldığını vurgulamaktadır.

Literatür bilgileri PKC enzim ailesinin ağrı ve analjezi yolağındaki nöro-aksisde primer afferent nöronların uyarılması, ağrı mediatörleri etkisiyle duyarlılığının artırılmasından santral nosisepsiyona kadar çeşitli kademelerde rol alarak normal fizyolojik ağrı (doku hasarını önlemeye yönelik ağrı cevabı) ve patolojik ağrıda (doku hasarını önlemeye yönelik ağrı sinyaline göre daha şiddetli ve uzun süreli ağrı sinyali) rol oynadığını ve PKC inhibitörlerinin inflamatuvar ve nöropatik ağrı tedavisinde umut veren ajanlar olduğunu ortaya koymaktadır (45). PKC inhibitörlerinin bradikinin, epinefrin veya diğer inflamatuvar maddelerle indüklenmiş nosisepsiyonu blokladığı gösterilmiştir (2). PKC sinyalleşme yolağı duyuşal nöronların uyarılabilmesinin kontrolünde kritik rol oynar.

3.1.5. Ağrı/Nosisepsiyon Hücresel Mekanizmasına Elektrofizyolojik

Yaklaşım

Elektrofizyolojik yaklaşımlar, nöronların membran özelliklerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılan güçlü bir tekniktir. Fakat sadece elektrofizyolojik yaklaşımla, membran elektrik özelliği pozitif ve negatif değişiklikler olarak belirlendiğinden, kayıt edilen hücrede hangi iyonun membran geçirgenliğinin arttığını belirlemek güçtür. Bundan dolayı, elektrofizyolojik yöntemler, histokimyasal veya direk flüoresan görüntüleme teknikleri ile kombine edilerek daha güçlü yaklaşımlar sağlanmaktadır. Elektrofizyoloji akut ve kronik ağrı durumlarını gelişmesi altında yatan mekanizmaların araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Elektrofizyoloji, nöron veya nöron gruplarının fonksiyonlarını yansıtan voltaj değişiklikleri veya membran elektrik akımlarının neden olduğu elektriksel aktivitenin kayıt edildiği yöntemdir. Hücre dışı kayıtlar tek ünite veya alan potansiyellerinden oluşan dokudaki aksiyon potansiyeli ve büyük potansiyel değişikliklerinin kayıt edilmesini sağlarken, hücre içi ve patch kenetleme kayıtları tek bir nöron hatta iyon kanallarında voltaj veya akımların ölçülmesine imkan veren elektrofizyolojik teknikleridir. Elektrofizyolojik yaklaşımlar kullanılarak sinir sisteminde nöronal ağ fonksiyonu elektriksel sinyal olarak takip edilebilir. Ağrı durumunda nosiseptif yolakta meydana gelen değişiklikler ile ağrı ile alakalı olarak ortaya çıkan bu değişikliklerin irdelenmesinde elektrofizyolojik yaklaşımlar kesinlikle uygun teknik yaklaşımdır. Örneğin, bu proje çalışmasının da hücresel modelini oluşturan DKG hücrelerinde ağrılı uyaran ve transdüksiyonu elektrofizyolojik yaklaşımlar kullanılarak yaygın olarak çalışılmıştır (25, 94).

Patch kenetleme elektrofizyolojik yaklaşımlar nosiseptif sürecin moleküler mekanizması hakkında ayrıntılı bilgilerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu proje çalışmasındaki gibi primer DKG sinir hücre kültürlerinden ve spinal dilimlerde gerçekleştirilen in vitro patch kenetleme çalışmaları kronik ağrıda DKG'undan medulla spinalise sinaptik iletinin plastisite ve fonksiyonel değişikliklerin esaslarını inceleyerek aydınlatmıştır (34, 54).

3.1.6. Deneysel Ağrı Modelleri

3.1.6.1. Davranışsal Çalışmalar

Akut ağrının davranışsal çalışması genellikle aralarında termal, mekanik, elektriksel ve kimyasal uyanların da bulunduğu zararlı (noxious) uyanların tatbikini ve alınan cevapların kaydını gerektirir (4, 50). Bu testler sık bir şekilde analjeziklerin etkisini denemek için normal sağlıklı hayvanlarda kullanılır. Bununla birlikte, birçok klinik ağrı durumlarının akut ağrıdan açıkça farklı mekanizmalar içerdiği son yıllarda ortaya çıkmıştır. Bundan dolayı, tonik veya kronik ağrının hayvan modelleri inflamasyon veya sinir zedelenmesinden sonraki durumlar için gelişme kaydetmektedir (50, 70) nöropatik ağrının birçok hayvan modelleri, nöropatik ağrı tedavileri ve mekanizmalarının farklı yönlerini ortaya koymakta uygun ve kullanışlıdır.

3.1.6.2. Fizyolojik Çalışmalar

Ağrı çalışmasıyla ilgili farklı bir yaklaşım, zararlı uyan ile merkezi sinir sistemindeki ağrı ile ilişkili yapılarıdaki aktivasyonu doğrudan ölçmektir. Bu çalışmalar çeşitli nosiseptif reflekslerdeki çalışmayla birlikte beyindeki nöronlarda, dorsal boynuz nöronlarında, spinal köklerde ve periferel sinirlerdeki kayıtları

içerebilir. Sözü edilen çalışmalar *in vivo* veya *in vitro* şartlarda yapılabilmektedir (4). Bunların elektrofizyolojik metodlar açısından avantajı, daha iyi kontrol edilebilir olmaları, daha iyi nitelendirilebilir olabilmeleri ve bazı değişken etkileyici davranışsal ölçüme mecbur olmamalarıdır.

3.1.6.3. Diğer Metodlar

Ağrı mekanizmalarının çalışılmasında ayrıca faydalı başka tekniklerde vardır. Anatomik çalışmalar, zedelenmeden sonraki yapısal plastisite ile birlikte önemli ağrı-ilişkili transmitter modellerini, önemli nöral devreleri ortaya koyar. Son yıllarda mikrodiyaliz gibi farklı metodlarda *in vivo* olarak kimyasal değişiklikleri görüntüleme yeteneği, zararlı uyarana cevaptaki transmitter salınımını ölçme ihtimalini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca fMRI ve PET gibi fonksiyonel yapısal imaj tekniklerindeki hızlı ilerlemeler, özellikle ağrı sürecinin daha büyük ve yüksek integrasyonunu içeren ağrı mekanizmalarını çalışmayı mümkün kılmıştır.

3.2. ZİKONOTİD

Zikonotid; marine snaili *Conus magus*un zehirinde bulunan doğal olarak oluşan, sentetik 25 aminoasitlik bir peptiddir. Zikonotid, intratekal analjezi gereken hastalarda şiddetli, kronik ağrı tedavisi için kullanılmaktadır. Zikonotidin, kronik inflammatör ve nöropatik ağrı hayvan modellerinde intratekal olarak uygulanan morfinden en az 10 kat daha etkili olduğu ortaya konulmuştur (46, 91). Zikonotid, spinal kordu çevreleyen beyin omurilik sıvısına bırakılmak için harici bir mikroinfüzyon cihazı veya programlanabilir bir şekilde vücut içine yerleştirilmiş mekanik bir infüzyon pompası kullanarak bir intrathecal kateter yoluyla sürekli bir infüzyon şeklinde hastalara uygulanır. Ancak yalnızca tıp ürünlerinin intratekal

uygulanmasında deneyimli hekimler tarafından uygulanabilmesi bu analjeziğin kullanımını sınırlandırır.

Yeni bir non-opioid analjezik olan zikonotidin kalsiyum kanallarını özellikle N-tipi voltaj-duyarlı kalsiyum kanallarını bloklamaktadır (5, 46). Zikonotid opioid reseptörlere bağlanmaz ve zikonotidin farmakolojik etkileri opioid antagonistleriyle bloklanamaz (5, 46). Yine zikonotidin kolinerjik ve monoaminonerjik reseptörlerle de etkileşimi bulunmamaktadır.

Morfinden çok daha kuvvetli analjezik etkiye sahip olan ve bağımlılık oluşturamayabileceği ortaya konulan zikonotidin DKG hücrelerindeki $[Ca^{+2}]_i$ üzerinde ne tür değişikliklere sebep olduğu bilinmemektedir. Zikonotidin DKG hücrelerinde muhtemel etkisinin ne olduğunun ve etki mekanizmasının ortaya konması bu ağrı kesici özelliğinin belirlenmesi medikal yönden yeni açılımlara ışık tutmasına izin verecektir.

3.3. VALPROİK ASİT

Valproik asidin (2-propylpentanoic asit) (VPA) kimyasal formülü $C_8H_{16}O_2$ dir. Valerian bitkisinden elde edilen valproik asit, valerik asidin bir analogu olarak ilk defa 1882' de sentezlenmiştir. On yıllar boyunca ilacın tek kullanım şekli laboratuvarlardaki organik bileşikler için çözücü olarak kullanılmasıydı. 1962'de Fransız araştırmacı Pierre Eymard ve arkadaşları valproik asidin tedavi edici potansiyelini biraz da tesadüfi bir şekilde buldu. Araştırmacılar VPA'yı deneysel antikonvulsantlar için bir çözücü olarak kullanırken, valproik asidin bizzat kendisinin antikonvulsant aktiviteye sahip olduğunu anladılar (40). İlaç 1967'de epilepsi tedavisi için Fransada onaylandı ve 1978 yılında da Birleşik Devletlerde onaylandı. O günden

beri valproik asit migren ve bipolar bozukluk tedavisinde de kullanılmaktadır. Valproik asit (VPA) bir antikonvulsant ve psikolojik durum düzenleyici ilaç olarak başlıca epilepsi ve bipolar bozukluk tedavisinde klinik kullanımı olan bir kimyasal bileşiktir. Valproik asit ayrıca migren, başağrısı ve şizofren tedavisinde de kullanılmaktadır (40, 66).

Yapılan çalışmalar bazı antikonvulzanların ağrı oluşumunu engellemede alternatif bir model olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte VPA'nın duyuşal sinir hücrelerindeki elektrofizyolojik etkileri ve hücre içi kalsiyum miktarı üzerine etkileri bilinmemektedir. DKG hücrelerindeki AP parametreleri ve $[Ca^{+2}]_i$ üzerine valproik asidin etkilerinin araştırılması, bu ilacın ağrı iletim yollarındaki muhtemel etkilerinin belirlenmesine yönelik bilgi sağlayabilir.

3.4. SPINORFİN

Spinorfin, enkephalin ayrıştırıcı enzimleri inhibe eden sığır spinal kordundan elde edilen endojen bir ajandır. İnsan polymorphonuclear neutrophil kemotaksis, O_2 jenerasyonu ve eksositozis gibi bir takım inflammatör cevaplar oluşturur. Spinorfin PMN üzerindeki reseptörlere FMLP (N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine)'nin bağlanmasını baskılayarak, PMN fonksiyonunu inhibe eder (101, 102).

Yapılan çalışmalar spinorfinin anti-hiperaljezik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Yamamoto ve arkadaşları spinorfinin, bradikinin ile uyarılmış nosiseptif cevapları baskıladığını ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde spinorfin intracerebroventriküler olarak uygulandığında analjezik aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (44, 99, 102).

Yapılan bu çalışmalar spinorfinin etkili bir analjezik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte spinorfinin bu ağrı dindirici etkisinin hangi hücrel mekanizmayla olduğu tam olarak bilinmemektedir. Spinorfinin DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ üzerine etkilerinin ortaya konulması ağrı dindirici özelliğe sahip olan bu ajanın hangi mekanizmayla etkili olup olmayacağı konusunda değerli bilgiler sunacaktır.

Bu tez çalışmasında, sıçan duyuşal sinir hücre kültürlerinde spinorfin, zikonotid ve antiepileptik bir ilaç olan valproik asidin, membran uyarılabilirliğı ve hücre içi kalsiyum homeostasisine etkilerinin elektrofizyolojik ve moleküler (fluoresan kalsiyum görüntüleme yöntemi esaslı) olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Elektrofizyolojik çalışmalar sadece valproik aist için gerçekleştirilmiş, flüoresan kalsiyum görüntüleme çalışmaları her 3 ajan için de gerçekleştirilmiştir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında DKG primer hücre kültürü hazırlanarak hücrel ağrı modeli olarak kullanıldı. Bu tez çalışmasında toplan 22 adet 2 günlük yavru sıçan kullanılarak bunlardan farklı zamanlarda primer hücre kültürü hazırlanmıştır.

Bu amaçla kullanılan deney protokolünde önce DKG hücrelerinde valproik asit kullanılarak elektrofizyolojik kayıtlar alındı, ardından aynı protokolle hazırlanmış DKG hücrelerinde valproik asit, zikonotid ve spinorfin kullanılarak kalsiyum görüntüleme yöntemi ile çalışmalar yapıldı. Böylelikle bu üç ajanın muhtemel ağrı dindirici etkisinin olup olmadığı incelendi.

Tez çalışmasında kullanılan gereç ve yöntemler aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

4.1.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinin Primer Kültürü

Mevcut çalışmada, sıçan dorsal kök gangliyon (DKG) hücreleri izole tek hücreler halinde elde edilerek elektrofizyolojik kayıtlarda kullanılmak için, enzimsel ve mekanik işlemlere tabi tutuldu (6, 7).

Kültür Çözeltileri ve Kullanılan Kimyasal Ajanlar

- A) Etil Alkol: % 99- %100 saflıktaki etil alkol distile edilen su ile % 70'lik oranda hazırlandı ve püskürtme yapabilen bir ağızlığı bulunan şişede saklandı.
- B) Poly-L-Ornitin (Sigma; Steinham, Almanya): Poly-L-Ornitin stok solüsyonu 25 mg/ml olacak şekilde hazırlandı ve 10 ml'lik steril şişe içerisine 100 µl gelecek şekilde ayrıştırılarak – 20 ° C' de muhafaza edildi.

- C) Laminin (Sigma; Steinham, Almanya): Laminin stoğu 1 mg/ml olacak şekilde hazırlandı ve her bir 5 ml'lik steril cam şişeye 10 µl gelecek şekilde dağıtıldı. Stoklar – 70 ° C'de saklandı ve kültür hazırlanacağı gün 2 ml steril PBS ilave edilerek lamellerin üzerine ekildi.
- D) Steril su: Laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisinde, distile suyun 0.2 µm'lik filtrelerden süzülerek otoklavda daha önceden steril edilmiş cam şişelerde saklandı.
- E) Steril Fizyolojik Tamponlanmış Fosfat Çözeltisi (PBS) (Amresco, Solon, Ohio, ABD; magnezyum ve kalsiyum içermeyen): 100 ml bidistile suyun içerisinde 1 tablet PBS çözdürülerek, 0.45 µm kalınlıktaki filtreden süzülerek steril bir şişeye kondu.
- F) Sodyumbikarbonat (NaHCO₃; Sigma; Steinheim, Almanya): Kültür vasatının pH'sını ayarlamak amacıyla 1.2 mg/ml olacak şekilde medyuma eklendi.
- G) 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 kullanılacağı güne kadar -20 ° C'de saklandı.
- H) Kollegenaz (Sigma; Steinheim, Almanya): Steril su içerisinde % 1.25 olacak şekilde dilüe edildi ve -20 °C'de saklanmak üzere 1 ml'lik kısımlara ayrıldı.
- İ) Tripsin (Sigma; Steinheim, Almanya): Steril PBS içerisinde % 2.5 olacak şekilde dilüe edildi ve -20 ° C'de saklanmak üzere 1 ml'lik kısımlara ayrıldı.

- J) Deoksiribonükleaz (DNAz, Sigma; Steinheim, Almanya): Steril PBS içerisinde 1600 Kunitz/ml olacak konsantrasyonda hazırlandı ve -20 ° C'de saklanmak üzere 1 ml'lik kısımlara ayrıldı.
- K) At Serumu (Sigma; Steinheim, Almanya): -20 C'de saklanmak üzere 10 ml steril tüplere konuldu.
- L) Sinir Büyütme Faktörü (NGF, 2.5S) (Sigma; Steinheim, Almanya): Önce steril su içerisinde 100 µg/ml konsantrasyonda hazırlandı ve F14 içerisine 1 µg/ml olacak şekilde dilüe edildi ve -20 ° C'de saklanmak üzere 500µl'lik kısımlara ayrıldı.

4.1.1.2. Kültür Vasatı

100 mililitrelik kültür vasatları aşağıdaki solüsyonları içermektedir: 1 ml Penisilin/ Streptomisin (ICN, İngiltere) 120 mg NaHCO₃ (Sigma) 10 ml odifiye edilmiş Dulbeco medyumu (Gibco laboratuvarları, İngiltere) 10 ml at serumu (Sigma)

Bu içerikli karışım distile su ilave edilerek 100 mililitreye tamamlandı ve ardından filtreden süzülerek sterilize edildi. pH'sı kontrol edilerek kullanım anına kadar +4°C' de saklandı.

4.1.1.3. Kültür İçin Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri

Sterilizasyon amacıyla 0.22 µm porlara sahip filtre Steril geniş petri kutusu 94*16 mm ebata sahip, yuvarlak Steril küçük petri kutusu 35*10 mm ebata sahip, yuvarlak Steril 50 ml polipropilen koni tüp Steril 15 ml polipropilen koni tüp Cam mikroskop lameli 22* 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; 0.07* 0.03 mm uca ve 12 cm uzunluğa sahip

1 tane ince uçlu eğri forseps; 0.07* 0.03 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 Gangliyon Hücre Kültürü için Genel Prensipler

Hücre kültürünün yapılması ve muhafazası sırasında kontaminasyonlara karşı gerekli önlemler alındı. Kullanılan tüm cerrahi malzemeler, cam saklama kapları, Pastör pipeti, pipet ve pipet uçları otoklav (Nüve, Ankara) yardımıyla steril hale getirildi. Otoklavdan alınan malzemeler laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine alınmadan önce % 70'lik alkole tabi tutuldu ve böylelikle laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine yerleştirildi. Steril bir şekilde 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 bir hale getirildi. Hücre kültürünün koyulacağı inkübatörün nemi, gaz düzeyi, sıcaklığı ve temizliğine özen gösterildi.

Hazırlanan tüm solüsyonların pH'sı pH metre (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 baş harfleri yazılarak işaretlendi.

4.1.1.7. Dorsal Kök Gangliyonu Hücre Kültürü Protokolü

% 70'lik etanolde tutulan cam lameller (Sigma, Almanya) kültür yapımından bir gün önce etanolden çıkarıldı ve sabit akımlı güvenlik kabini içinde steril bir kurutma kağıdı üzerinde kurutuldu. Bundan sonra 100µl poly-L-ornitin (Sigma; 25 mg/ml stok solüsyon) 10 ml'lik distile suya ilave edildi ve oluşan bu sıvı çapı 50mm olan steril bir petri kutusuna boşaltıldı. Kuruyan lameller alevden hızla geçirildi ve bu poly-L-ornitin içeren sıvıya yerleştirilerek 37 santigrad derece de % 95 oksijen, % 5 karbondioksit ihtiva eden inkübatörde (Heraus, Almanya) bir gece bekletildi. Ertesi gün lameller inkübatörden alındı ve Laminar flow içerisinde steril su ile yıkandı. Her bir lamel üzerine 100µl laminin (Sigma) ilave edilmek suretiyle kültür tablası inkübatöre kaldırıldı. Aynı gün kültür vasatı da hazırlanarak 10 ml fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (PBS) ile birlikte bir kısım kültür medyumunu da steril bir plastik tüp içinde inkübatöre yerleştirildi. Diseksiyon cerrahi seti ile birlikte diseksiyon mikroskobu dezenfekte edilerek sabit akımlı güvenlik kabinine alındı. İki günlük Wistar sıçan yavruları (Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden

temin edilerek) dekapitasyonla öldürülmek suretiyle yayvan bir petri kutusuna yerleştirildi.

Uygun bir makasla vertebral kolon ayrıldı, bunun ardından kaudal uçtan başlayarak boyuna kadar spinal kolonun içi yaylı küçük bir makasla açıldı. Petri kutularına yerleştirilmiş PBS ile bu izole spinal kolon üç defa yıkandı. Ardından bütün dorsal kök gangliyonları mikroskop altında forsepslerle hassas bir şekilde izole edilip küçük bir petri kutusu içindeki kültür vasatına yerleştirildi.

DKG gövdeleri disekse edilip petri kutusunda toplandıktan sonra, hassas yuvarlak hareketlerle petri kutusu sallandı ve böylece tüm gangliyonların bir araya toplanması sağlandıktan sonra kültür medyumu bir pastör pipeti ile çekilerek 900 µl ılık kültür vasatı ile 100 µl kollagenaz (Sigma, 0.125%) ilave edilip hafif bir şekilde çalkalandı ve 13 dakika süreyle inkübatöre kaldırıldı. Sürenin bitiminde hücre, solüsyon ve enzim karışımı inkübatörden alınarak hızla PBS ile üç defa yıkandı. Bundan sonra 100 µl tripsin (Sigma 0.25 %) ve 900µl PBS eklenerek hafif bir şekilde çalkalandı ve 6 dakika boyunca inkübe edildi, ardından steril plastik tüpe aktarılarak 15 ml. ılık kültür vasatı ilave edilerek üç defa yıkandı.

Ardından 900 µl kültür medyumu ve 100 µl DNAz enzimi (Sigma) ilave edilip ucu daraltılmış steril bir pastör pipetine hızlı bir şekilde çekilip boşaltılarak gangliyonlar mekanik olarak tek hücrelere ayrıştırıldı. Hemen ardından hücre kültür vasatı süspansiyonu kültür vasatı ilave edilip 5 ml'ye tamamlandı.

Bir gün önce lamellerin poly-L-ornitinle inkübe edildiği petri kutusuna boşaltılarak 2-3 saat inkübe edildi. Ön inkübasyondan amaç, ölü hücreler ve nonnöronal dokuların uzaklaştırılmasıdır. 2-3 saatlik ön inkübasyonun bitiminde

içinde hücrelerin bulunduğu petri kutusu inkübatörden alındı, üstlerindeki sıvının önemli bir kısmı Pastör pipetiyle uzaklaştırılır ve petri kutusunun dibine yapışmış olan hücreler 1 ml'lik taze ılık kültür vasatıyla yıkanarak solüsyona alındı. Petri kutusu mikroskop altında iyice incelenerek bütün hücrelerin uzaklaştırıldığı kontrol edildi. Nöronal olmayan hücreler daha sıkı yapışacağından petri kutusunun tabanında kaldı ve elimine edildi. Hemen ardından hücre süspansiyonuna ılık kültür vasatı eklenir ve 2.4 ml'ye tamamlandı. Son inkübasyon için daha önceden lamininle kaplanan lamellerin bulunduğu küçük petri kutuları inkübatörden alınarak laminin içeren sıvının büyük bir kısmı lamellerden uzaklaştırıldı. Hücre süspansiyonu barındıran solüsyona 240 µl sinir büyüme faktörü (NGF) ilave edildi ve her lamele 200 µl hücre içeren bu solüsyondan ekildi ve bir akşam için inkübatöre kaldırıldı, ertesi sabah her bir petri kutusuna 1.5 ml NGF ihtiva eden ılık kültür vasatı ilave edildi ve tekrar inkübatöre kaldırıldı. İzleyen 5-7 günde petri kutularındaki 1-5 ml kültür vasatı çekilerek NGF (10µl NGF/ petri kutusu) içeren yeni kültür vasatı ilave edildi. DKG hücreleri 24 saat sonra elektrofizyolojik kayıtlar için kullanılmaya başlandı.

4.1.2. Elektrofizyoloji

4.1.2.1. Elektrofizyolojik Deney Düzenegi ve Protokoller

Bu çalışmada toplam 56 hücreden elektrofizyolojik kayıt alınmıştır. Ancak hepsinde tam protokol valproik asit etkisi denenememiş bazı hücrelerden alınan kayıt örnekleri kontrol verileri belirlemekte kullanılmıştır.

Bu çalışmadaki deneyler tüm hücre diyaliz patch kenetleme tekniği ile gerçekleştirildi. Pipet ucu ile hücre membranı arasında yüksek dirençli bir mühür

oluşturularak, ardından negatif basınçla hücre zarı hasara uğratarak tüm hücre diyaliz patch kenetleme biçimi oluşturuldu. Bu şekilde hücre sitoplâzması ile pipet içeriği arasında sürekli temas temin edildi. Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirildi (20-23 °C). Akım kenetleme deneyleri Axoclamp-2B (Axon Instruments, ABD) patch kenetleme amplifikatörü ile amplifikatörün akım kenetleme (current clamp) modu kullanılarak gerçekleştirildi. Akım kenetleme modu vasıtasıyla, membran potansiyeli kaydı, input rezistansı, aksiyon potansiyeli ve aksiyon potansiyeli sonrası potansiyeller kayıt edildi. Elektrofizyolojik kayıt yapılan DKG hücreleri düşük volümlü bir ekstraselüler kayıt (banyo) solüsyonunda tutuldu. Düşük volümden dolayı pipet kapasitansı sınırlıdır. Düşük dirençli patch pipetleri Pireks borosilicat cam çubuklardan (1.4/1.6 mmdış çap, 0.8/ 1.0 mm olan iç çapı içerisinde 0.15 mm fibril içeren, Plowden and Thompson Ltd, Dial Glass Works) pipet çekici ile çekildi (Sutter Inst, ABD). Direnç değerleri 3-7 mega ohm arasında değişen pipetler KCI esaslı hücre içi patch solüsyonu ile dolduruldu. Pipetler yalnızca bir hücreden kayıt için kullanıldı. Hücre dışı ve hücre içi solüsyonlar 0.45 µm delik büyüklüğüne sahip filtrelerden süzüldü. Hamilton şırıngasıyla pipetler patch pipet solüsyonlarıyla doldurulurken en önemli noktaysa pipet içerisinde ve pipet tutucu içerisinde herhangi bir hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilmesidir. Pipet tutucu 1 M KCI ile dolduruldu ve CV-4 1/ 100 headstage (Axon Instruments, Foster, CA, ABD) içerisine yerleştirildi. Pipet tutucunun kenarında mühür oluşturma sırasında negatif basınç uygulanmasıyla ilgili kısım bir silikon hortumla 1 ml'lik bir şırıngaya bağlandı. Bu headstage, pipeti sağa sola, ileri-geri ve aşağı yukarı hassas hareket ettirmeye yarayan üç boyutlu bir mikromanipulatöre monte edildi. Mikromanipulatörler, ters mikroskop mekanik

stabiliteyi sağlamak gayesiyle titreşimsiz bir elektrofizyolojik masa (Intracel, UK) üzerine yerleştirildi. Elektrofizyolojik masa ve üzerindeki aletler, elektriksel gürültüyü azaltmak gayesiyle Faraday kafesi aracılığıyla topraklandı. Elektrotlar ile amplifikatörler arasındaki elektriksel kontak, Ag-AgCl elektrotu, pipet tutucu içerisindeki kablo ve KCl banyosu ile sağlandı. Ekstraselüler kayıt solüsyonu ile KCl banyosu arasındaki kontak ise agar -KCl köprüsü ile sağlandı (% 3 agar içeren borosilicat cam tüp 1 M KCl içerisinde hazırlandı ve kullanımda olmadığı zamanlarda sürekli olarak 1 M KCl içinde saklandı).

DKG nöronları elektrofizyolojik kayıt için inkübatörden alındıklarında kayıttan önce 5 dakika aralarla hücre dışı kayıt solüsyonuyla üç defa yıkandı. Hücre dışı kayıt solüsyonunun oda sıcaklığında olmasına dikkat edildi. Tüm hücre diyaliz modunun sağlanmasının ardından, akım kenetleme deneylerinde dinlenim zar potansiyeli ölçüldü ve akım enjeksiyonu ile zar potansiyeliyle arzu edilen zar potansiyeline tutuldu.

4.1.1.2. Akım Kenetleme Deneylerinde Kullanılan Kayıt Solüsyonları

Membran potansiyeli, giriş direnci, aksiyon potansiyelleri ve aksiyon potansiyelleri ard potansiyelleriyle alakalı deneylerde hücrenin iyonik dengesi genelde değiştirilmeyerek fizyolojik şartlar ve homeostazis azami derecede taklit edildi. Bu amaçla aşağıda içerikleri verilen hücre içi ve hücre dışı kayıt solüsyonları kullanılmıştır (6,7).

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

Tablo 4.1: 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

Patch Pipeti (Hücre İçi) Solüsyonunun, TRIS kullanılarak pH 7.4, osmolarite ise sukroz ilavesiyle 31 OmOsm/ litreye ayarlandı.

4.1.2.2.2. Akım Kenetleme Deneyleri İçin Hücre Dışı Kayıt Solüsyonu

Tablo 4.2: Akım Kenetleme Deneyleri İçin Hücre Dışı 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'eve sukroz ilave edilerek ozmolarite 310-320 mOsm/litreye ayarlandı.

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

4.1.2.3. Zıtlanma Potansiyelinin Hesaplanması

Akım kenedi deneyleri için KCl içeren hücre içi kayıt solüsyonları ve NaCl içeren hücre dışı kayıt solüsyonları kullanıldı. Hücrelerin dinlenme zar potansiyellerinin ölçülmesinden sonra hücreler asgari 5 dakika bu zar potansiyelinde tutulur ve aksiyon potansiyeli depolarize akım enjeksiyonu ile aktive edildi. Depolarize edici ard potansiyele sahip hücreler -40/ -120 mV arasında 10mV'luk aralıklarla tutularak aksiyon potansiyelleri aktive edildi. Bu şekilde elde edilecek aksiyon potansiyeli ard potansiyellerinin zıtlanma potansiyeli hesaplandı, hesaplanan bu değer Cl⁻ ve K⁺ kanallarının hücre içi ve hücre dışı solüsyonlardaki konsantrasyon değerlerine göre Nerst denkleminden hesaplanan zıtlanma potansiyelleriyle karşılaştırıldı.

Zıtlanma potansiyelleri membran iletkenliğinin iyonik temelini biyofiziksel olarak belirlenebilmesi için sık bir şekilde kullanılan bir yöntemdir. Bu maksatla Nerst denklemi kullanılmaktadır. Nerst denklemine göre aşağıdaki parametreler göz önünde bulundurularak hesaplama yapıldı.

$$E = (RT)/(ZF) \ln(Cd/Ci). R \text{ (Genel gaz sabiti)} = 8.3143 \text{ j/K mol}$$

$$F \text{ (Faraday sabiti)} = 96500 \text{ }^\circ\text{C/mol}$$

T (Mutlak sıcaklık) = (273 °C) K

Z = İyon değeri

C_d = Hücre dışı molar konsantrasyon

C_i = Hücre içi molar konsantrasyon

4.1.2.4. İlaç uygulaması

DKG hücrelerine hücre dışı ilaç uygulaması, hücre dışı mikroperfüzyon şeklinde gerçekleştirildi.

Test ajanlarını hücre dışı mikroperfüzyonu, ucu genişletilmiş bir patch pipeti vasıtasıyla düşük basınçlı mikroenjeksiyonla sağlandı. Pipetler Hamilton şırıngası (Hamilton Company, İsviçre) ile hücre dışı kayıt solüsyonunda hazırlanmış olan valproik asit, zikonotid ve valproik asitin arzu edilen konsantrasyonu ile dolduruldu. İlaç uygulama pipetinin ucu temiz bir metal yüzeye hafifçe dokundurularak kırıldı ve ilaç akımını sağlamak için yaklaşık 10 µm çap elde edildi. İlaçla dolu olan pipet tutucu mikromanipülatöre yerleştirilerek (WPI, ABD), basınç süresi ve şiddeti ayarlanabilen basınç kaynağına (Pneumatic Pump, WPI, ABD) silikon tüp aracılığıyla bağlandı. Kayıt alınan hücreden kontrol verileri elde edildikten sonra ilaç uygulamak için kullanılacak pipeti mikroskop altında mikromanipülatör vasıtasıyla hücre dışı kayıt solüsyonuna daldırılarak ilgili hücrenin 50-100 µm uzağına yerleştirildi. İlacın ayrı ayrı her bir tatbikinden sonra hücre dışı kayıt solüsyonu birkaç kez taze solüsyon ile değiştirilmek suretiyle hücreler yıkandı ve bundan sonraki aynı lamelin uzak noktalarındaki hücrelerden sağlandı. Stok solüsyonları çift distile deiyonize su içerisinde hazırlandı.

4.1.3. Aksiyon Potansiyellerinin Kayıt Edilmesi

Lamel üzerinde yer alan DKG hücrelerinden kayıt için seçilen hücre ters mikroskopun (Nikon, Japonya) görüntü alanının ortasına yerleştirildi. Daha sonra pipet solüsyonu ile doldurulmuş patch pipeti mikromanipülatör (Narishige, Japonya) aracılığı ile önce kayıt solüsyonu içerisine ve kademeli olarak da hücre üzerine yerleştirildi. Patch kenetleme amplifikatörü Axoclamp 2B (Axon Instruments, ABD) süresi ve frekansı Digitimer D4030 (İngiltere) stimulus programlayıcısı ile kontrol edilen elektrik dalgaları ile eksternal olarak tetiklendi. 10 pA hiperpolarize edici akım (1 Hz, 100 ms süreli) uygulaması ve elektrojenik potansiyelin ölçülmesi ile pipet direnci belirlendi. Bu esnada voltaj defleksiyonunu gidermek için uygulanan akım amplifikatörden okunarak pipet direnci belirlendi. Bu esnada voltaj defleksiyonu giderilinceye kadar rezistans kompensasyonu uygulandı ve voltaj defleksiyonunu gidermek için uygulanan akım amplifikatörden okunarak pipet direnci mega ohm olarak belirlendi. Bu çalışmada direnci 3-7 mega ohm arasında değişen pipetler kullanıldı. Daha sonra osiloskop ekranında voltaj gözlenene kadar 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 giga ohm'luk mühürler gelişti. Osiloskop 20-50 mV/ division'a 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 kompensasyonu uygulandı. Tüm hücre diyaliz formunun gerçekleştirilmesi için genelde hafif ilave negatif basınç uygulaması yapıldı. Akım

kenedi kayıt modunda önce istirahat membran potansiyeli ölçüldü ve voltaj injeksiyonu ile membran potansiyeli istenilen gerilim değerinde tutuldu. Amplifikatör çıkışları osiloskop üzerinde görüntüledi (Hameg PM3305, 35MHz) ve pclamp 7 (Axon Instruments, ABD) programı ile kişisel bilgisayara kayıt edilerek analiz edildi.

4.1.4. Veri Analizi

Elektrofizyolojik veriler deney sırasında bilgisayarın hafızasına kayıt edildi ve daha sonra analiz edildi. Analizlerin yapılması için pClamp 7.0 (Axon Inst, ABD) analiz programı kullanıldı. 1 kHz frekansında digitalize edildi (Digidata 1200, Axon Inst, ABD) ve bilgisayar hafızasında kayıt edildi.

Akım kenetleme şartlarında aksiyon potansiyeli eşik değeri, pik amplitüt, aksiyon potansiyelinin süresi ve ard potansiyellerin (hiperpolarize edici) amplitüt ve bu gerilimlerin istirahat membran potansiyellerine dönme zamanı ölçülerek değerlendirildi. Kayıt değerleri daha sonra yazdırıldı.

4.2. HÜCRE İÇİ KALSİYUM GÖRÜNTÜLEME VE GÖRÜNTÜ ANALİZLERİ

Hücrelerin fura-2AM ile yüklenmesi (flüoresan işaretleme): İzole edilen ve lamellere ekilen hücreler, en az 4-6 saat inkübe edildikten ve lamel üzerine iyice yapışması sağlandıktan sonra kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanıldı. Hücrelerin aksonal ve dentritik uzantılar geliştirmesi flüoresan kalsiyum görüntüleme hesaplamalarını etkileyebileceği için görüntüleme deneylerinde genelde 1 günlük hücreler kullanıldı (Şekil 1).

Hücreler fura-2-AM (1 ve 5 μ M, Molecular Probes, İngiltere) ile oda sıcaklığında bir saat inkübe edilerek floresan boya yüklemesi yapıldı. Yüklemeyi

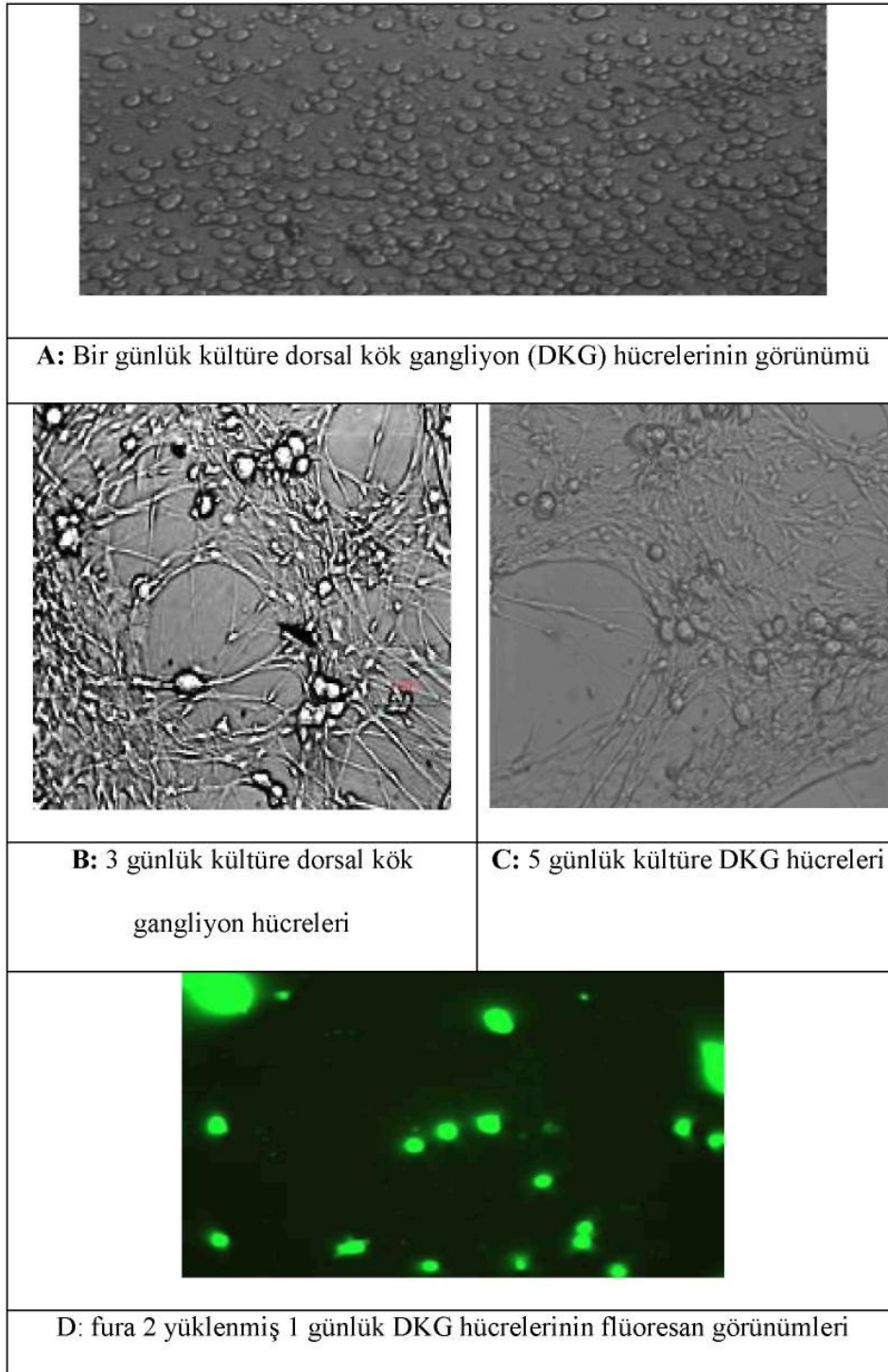
takiben hücreler 20 dakika içerisinde NaCl-esaslı hücre dışı solüsyonu [135 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 11.5 mM glikoz, 11.6 mM HEPES (ozmolarite 310 - 320 mOsm, sukroz) ile en az üç kez daha yıkanarak, hücre dışındaki flüoresan boya uzaklaştırıldı ve fura-2'nin de-esterifikasyonu sağlandı ve kalsiyum görüntüleme deneyleri bu bileşimdeki kayıt solüsyonü kullanılarak gerçekleştirildi.

4.2.1 Flüoresan [Ca⁺²]_i Görüntüleme

Kalsiyum duyarlı floresan boya ile yüklenen hücreleri içeren lameller, mikroinkübasyon kayıt çemberine (Warner Instruments, ABD) aktarılarak, mikroinkübasyon-perfüzyon sistemi aracılığıyla NaCl-esaslı hücre dışı solüsyonu ile kayıt çemberine ince silikon hortum ile bağlantılı, açma kapaması bilgisayar kontrollü, akım hızı yer çekimine göre ayarlanan ilaç uygulama/perfüzyon sistemi (Warner Instruments, ABD) aracılığı ile (1 ml/dakika) sürekli perfüze edildi ve floresan atışmanlı Nikon TE 2000S ters mikroskop altında gerektiğinde göz ile değerlendirildi (Şekil 4.1 ve 4.2). Bütün deneyler oda sıcaklığında ($\approx 22^{\circ}\text{C}$) gerçekleştirildi ve bütün deneysel işlemler hücrelerin flüoresan işaretleyici ile yüklenmesinden maksimum bir saat içerisinde gerçekleştirildi. Flüoresan boyanın ışığa maruz kalarak ağarmasını sınırlandırmak için optimum pozlama zamanı (exposure time) belirlendi ve bilgisayar kontrollü filtre sürücüsündeki perde (shutter) donanımı aracılığı ile görüntü alınmadığı zamanlarda flüoresan işaretlenmiş hücrelerin ışık maruziyeti önlendi. Xenon ışık kaynağından (LS- Sutter Instr, ABD) gönderilen UV ışınının hızlı bir otomatize filtre sürücüsüne (Lambda-2, Sutter Instr, ABD) yerleştirilen fura-2 filtre seti aracılığı ile 340 ve 380 nm filtrelerden (Chroma, ABD) gönderilerek mikroskop optikleri (Nikon TE 2000 S, S-flour 40X objektif,

NA=1.4) aracılığı dual eksitasyon ve 510 nm’de emisyon gerçekleştirildi. Flüoresan görüntüleri yüksek hızlı soğutmalı dijital bir CCD kamera (ORCA 285, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japonya) ve veri kazanım-yazılım programı (sPCI, ComPix) aracılığı ile bilgisayar hafızasına kayıt edildi. Sistemin genel bir görünümü şekil 2’de yer almaktadır.

Floresan oranı analizleri off-line olarak, cevap veren hücrelerde “ilgi alanı” seçimleri yapılarak yazılım programı (sPCI, ComPix) aracılığıyla gerçekleştirildi. $[Ca^{+2}]_i$ hesaplanmasında, 510 nm’de emisyon gerçekleştirilerek 340 nm eksitasyonda elde edilen flüoresan yoğunluğunun 380 nm eksitasyonla elde edilen flüoresan yoğunluğuna oranlanması (dual uyarı: 340 nm/380 nm, emisyon: 510 nm) esas alındı.



Şekil 4.1, A-C: CCD-kamera ataşmam aracılığı ile çekilen fotoğrafta sıçan DKG sinir hücrelerinin aydınlık alan görünümü (20X, 0.7 X kamera C-mount), D: Fura 2 AM ile yüklenmiş 1 günlük kültüre DKG hücrelerinin flüoresan görünümü (40X, x0.7 X kamera C-mount), S-flüör 1.4 NA, yağlı objektif.



Şekil 4.2. *Flüoresan kalsiyum görüntüleme sisteminin fotoğrafik görünümü. İlaç uygulama/mikroinkübasyon sistemi (sol üst kısım), CCD kamera (sol alt), ters mikroskop ve filtre sürücüsü kontrol ünitesi (sağ).*

Tüm veriler ortalama± standart hata (mean+SEM) olarak sunuldu. İstatistiksel analiz ve grafikler sırasıyla SPSS12.0 ve Sigma Plot 8.0 programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analiz için Student's t testi veya tek yönlü varyans analizi ile kullanıldı. $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tez çalışmasında valproik asit, zikonotid ve spinorfin kullanılmıştır. Bütün ajanlar hücre dışı kayıt solüsyonunda çözünerek hazırlanmıştır. Kullanılan valproik asit dozları elektrofizyoloji deneyler için 30 μM , 100 μM ve 300 μM flüoresan kalsiyum görüntüleme deneyleri için ise 100 μM , 300 μM ve 1 mM şeklindeydi. Kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanılan zikonotid dozu 1 nM, 10 nM ve 1 μM ; spinorfinin dozu ise 10 μM , 100 μM ve 300 μM şeklindeydi.

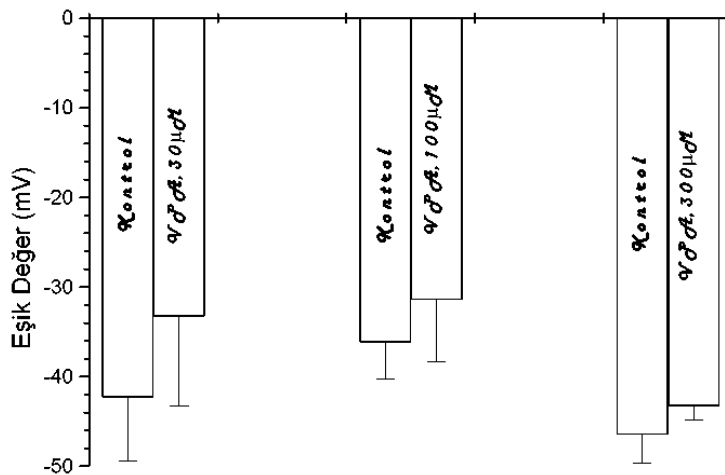
5.BULGULAR

5.1. ELEKTROFİZYOLOJİ

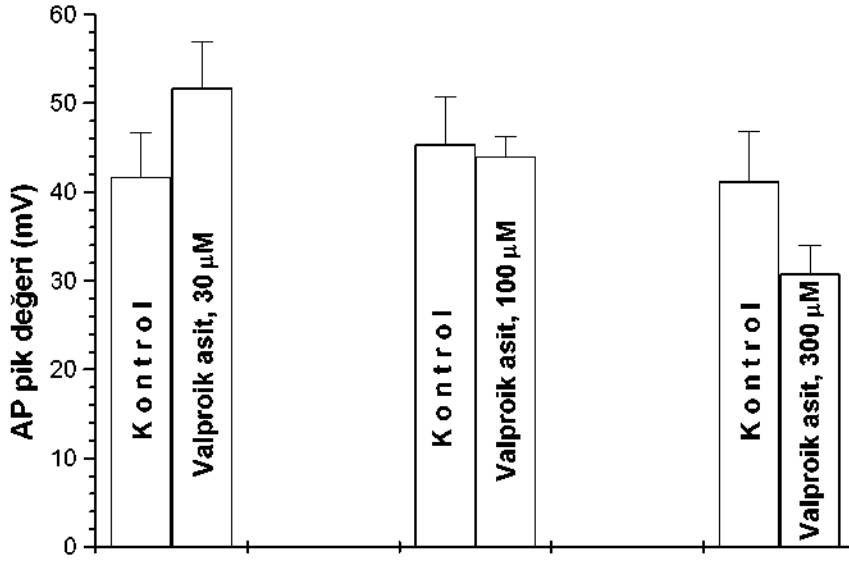
Patch kenetleme metodu “tüm hücre diyaliz akım kenetleme modu” kullanılarak gerçekleştirilen hücresel kayıtlarda, DKG istirahat membran potansiyeli, input rezistansı, reobaz, aksiyon potansiyeli (AP) eşik değeri, AP pik değeri, AP pik değere ulaşma zamanı, süresi, AP ard potansiyel amplitütü belirlendi. Ayrıca, hücreler -40 ile 120 mV arasında farklı membran potansiyellerinde tutularak aksiyon potansiyeli ard potansiyellerinden zıtlanma potansiyeli hesaplamaları gerçekleştirildi.

Kayıt gerçekleştirilen hücrelerin ortalama istirahat membrane potansiyeli - 55.9 ± 1.9 mV (n=56) olarak belirlendi.

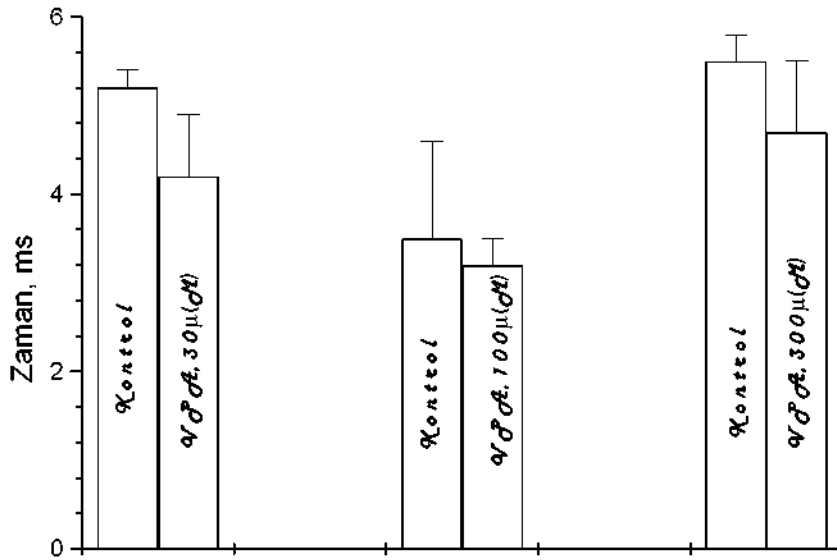
Kayıt edilen hücrelerde eşik değer -13 mV ile -52 mV arasında değiştiği belirlendi. Valproik asit uygulaması DKG hücresi aksiyon potansiyeli eşik değeri üzerine uygulanan hiç bir doz (30, 100 ve 300 uM) için istatistiksel olarak anlamlı bir etki meydana getirmedi.



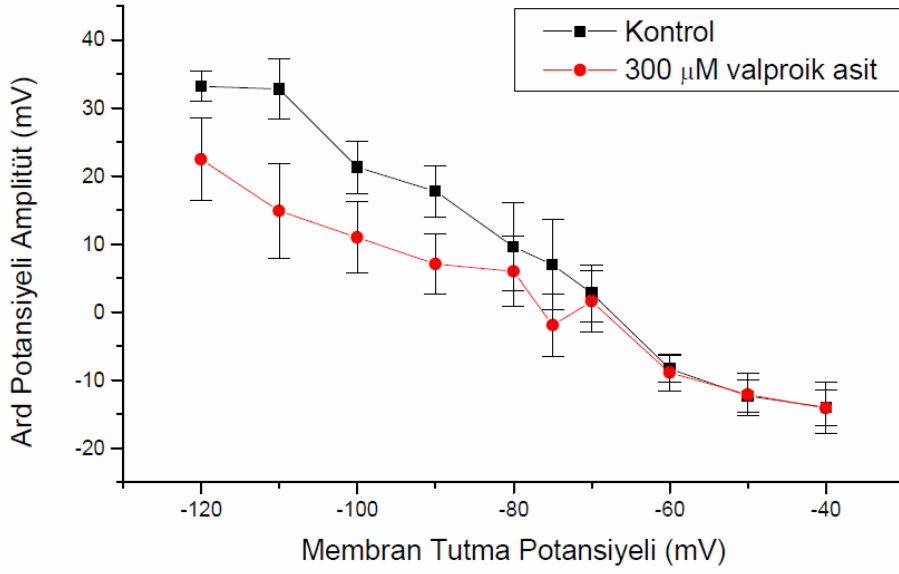
Şekil 5.1 Valproik asidin sıçan dorsal kök gangliyon sinir hücresi aksiyon potansiyeli eşik değeri üzerine doz bağımlı etkileri.



Şekil 5.2. Valproik asidin sıçan dorsal kök gangliyon sinir hücresi aksiyon potansiyeli pik değeri üzerine doz bağımlı etkileri.



Şekil 5.3. Valproik asidin sıçan dorsal kök gangliyon sinir hücresi aksiyon potansiyeli süresi üzerine doz bağımlı etkileri.



Şekil.5.4. Membran tutma potansiyelinin (-40/-120 mV) aksiyon potansiyeli hiperpolarize edici ard potansiyeli amplitütü üzerine etkileri.

Aksiyon potansiyelleri 5 ms süreli eşik üstü depolarize edici karedalga uyarılarla indüklenerek kayıtlar alındı. Şekilde aksiyon potansiyeli hiperpolarize edici ard potansiyel ($I_{K(Ca)}$ akımlarının) zıtlanma potansiyeli hesaplanmasında kullanılan protokol, kontrol ve 300 uM valproik asit uygulamasında görülmektedir. Membran potansiyeli -120 ile -40 mV arasında uyarılarak hiperpolarize edici ard potansiyeli pik amplitütü belirlenerek aktive edildiği membran potansiyeli test voltaj değerine karşı plot edilmiştir. Valproik asit (300 uM) daha negatif membran değerlerinde eğriyi kısmen sola kaydırmakla beraber anlamlı bir etki meydana getirmemiştir.

5.2. HÜCRE İÇİ FLÜORESAN KALSİYUM GÖRÜNTÜLEME BULGULARI

Bu tez çalışmasının gerçekleştirildiği deneysel koşullarda, kalsiyuma duyarlı boya olan fura-2AM ile yüklenmiş DKG nöronlarından dakikalarca (45-60 dakika) stabil flüoresan sinyalleri kayıt edilebilmektedir. Yine bu kültüre sinir hücreleri

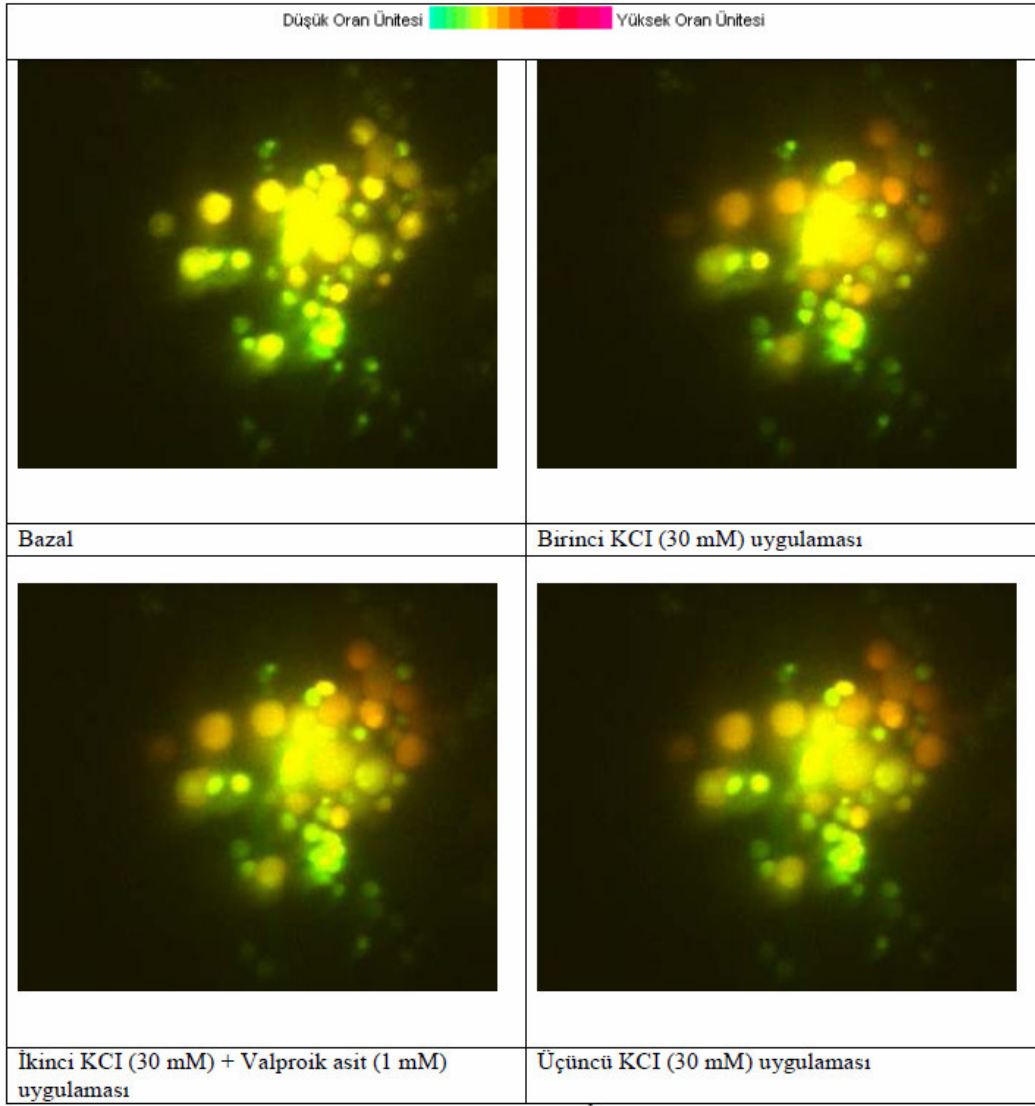
standart olarak yüksek K^+ (30 mM) ile uyarılmaya hücre içi serbest kalsiyum düzeyinde artışla cevap vermektedir.

Tez çalışmasının bu kısmında hücreler yöntem kısmında ayrıntılı olarak bahsedilen oransal flüoresan kalsiyum görüntüleme yöntemi kullanılarak hücre içi serbest kalsiyum düzeyi değişiklikleri takip edildi. DKG hücrelerinin non-spesifik depolarizasyon olarak yüksek K (30 mM) ile uyarıma cevaplılığı ve bu depolarizasyon cevaplarına valproik asit, spinorfin ve zikonotidin etkileri irdelendi. İlave olarak spinorfinin hücre çapına göre DKG alt tipleri üzerine spesifik etkileri de irdelendi.

5.2.1. Valproik Asidin Dkg Hücrelerinde Depolarizasyonla İndüklenen $[Ca^{2+}]_i$ Düzeyi Üzerine Etkileri

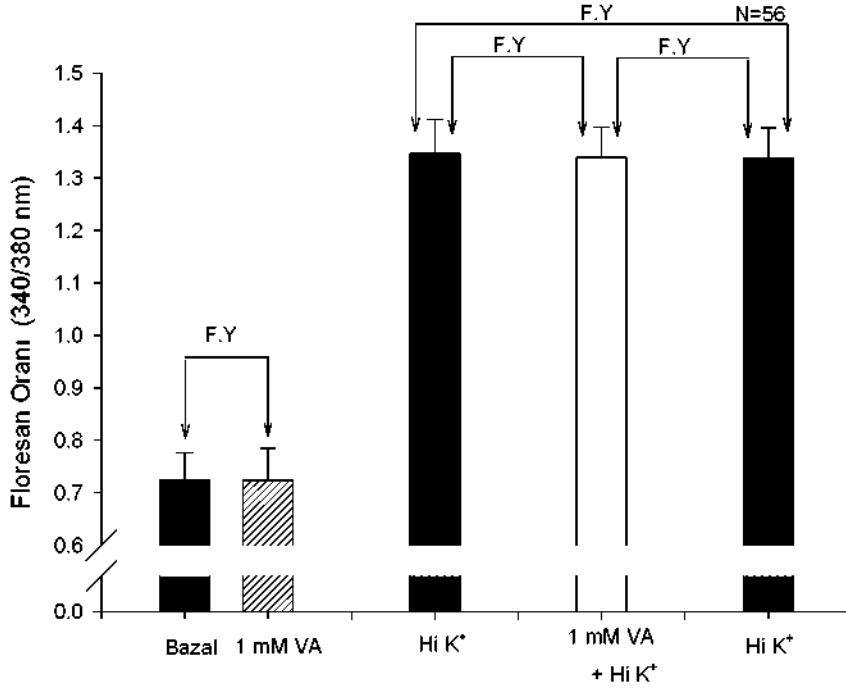
Bu kısımda valproik asidin DKG nöronlarında yüksek KCl ile uyarılmış $[Ca^{2+}]_i$ düzeyleri üzerine etkisi farklı doza bağımlı olarak (100 μ M, 300 μ M ve 1 mM) incelendi. İlk aşamada valproik asidin DKG hücrelerinde bazal kalsiyum sinyalleri üzerine etkisi olup olmadığı belirlendi. Valproik asidin test edilen hiçbir dozu (100 μ M, 300 μ M ve 1 mM) DKG hücrelerinde bazal kalsiyum sinyal seviyesini anlamlı düzeyde etkilememektedir (Tablo 5.1, Şekil 5.5).

Daha sonra kontrol koşullarında 3 defa 30 mM KCl içeren hücre dışı kayıt solüsyonu DKG hücrelerine uygulandı. Yüksek K^+ membran depolarizasyonuna cevap olarak $[Ca^{2+}]_i$ artış cevabı meydana getirdi. Bu uygulamaların ikincisi esnasında valproik asit (1mM, 300 μ M ve 100 μ M) 30 mM KCl içeren hücre dışı kayıt solüsyonu ile birlikte uygulandı. Valproik asit (1mM, 300 μ M ve 100 μ M) Yüksek K^+ uygulaması ile meydana gelen $[Ca^{2+}]_i$ artışı üzerine herhangi bir etkisi bulunmamaktadır (Tablo 5.1, Şekil 5.5-5.6).



Şekil 5.5. Valproik asitin (1 mM) sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi.

Şekilde fura-2 AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde valproik asit (1 mM) uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait orijinal kayıt örnekleri sunulmuştur. $[Ca^{2+}]_i$ düzeyleri, fura-2 AM boyası kullanılarak, Valproik asit (1 mM) uygulamasından önce (bazal) ve yüksek KCl (30 mM) uygulaması, yıkamanın ardından yüksek KCl (30 mM) +Valproik asit (1 mM) uygulaması ve yıkamanın ardından yüksek KCl (30 mM) uygulaması takiben değerlendirildi.



Şekil 5.6. Valproik asitin (1mM) sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi.

Şekilde fura-2 AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde valproik asit (1 mM) uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait ortalama verilerden geliştirilmiş grafik sunulmuştur. $[Ca^{2+}]_i$ düzeyleri, fura-2 AM boyası kullanılarak, Valproik asit (1 mM) uygulaması önce (bazal) ve valproik asit (1 mM) uygulaması takiben değerlendirildi. Bazal seviye üzerine valproik asit (1 mM) uygulaması ve 1.yüksek KCl (30 mM) uygulaması, 2. yüksek KCl (30 mM) + Valproik asit (1 mM) uygulaması ve 3. yüksek KCl (30 mM) uygulaması takiben değerlendirildi. Cevaplar flüoresan oranında (340nm/380 nm) meydana gelen değişikliklerin pik değerleri olarak belirlendi. Bütün ölçümler en az 3 farklı kültüre ait hücrelerin olduğu lamellerde tekrarlanmış ve benzer sonuçlar elde

edilmiştir. Hata çubukları SEM'i göstermektedir. F.Y.=Fark Yok, VA: valproik asit, Hi K⁺: Yüksek KCl (30 mM).

Tablo 5.1. (100 μ M, 300 μ M ve 1mM) bazal ve yüksek K⁺ ile depolarizasyona bağlı hücre içi kalsiyum artışı (fliüresan oranı) üzerine etkileri

	Doz (μ M)	Floresan Oranı (Bazal)	Bazal + Valproik asit	Yıkama Sonrası	n
	Valproik Asidin	100	0.67 \pm 0.06	0.67 \pm 0,07	0.67 \pm 0,06
300		0.65 \pm 0.07	0.66 \pm 0,06	0.64 \pm 0,06	24
1000		0.72 \pm 0.05	0.72 \pm 0,06	0.71 \pm 0,06	45
Doz (μ M)		Bazal+ 30 mM KCl	Bazal+ 30 mM KCl + Valproik asit	Bazal + 30 mM KCl	n
100	1.28 \pm 0.06	1.26 \pm 0.06	1.24 \pm 0.06	10	
300	1.31 \pm 0.07	1.30 \pm 0.05	1.29 \pm 0.06	22	
1000	1.35 \pm 0.06	1.34 \pm 0.06	1.34 \pm 0.06	56	

5.2.2. Zikonotidin Dkg Hücrelerinde Depolarizasyonla İndüklenen

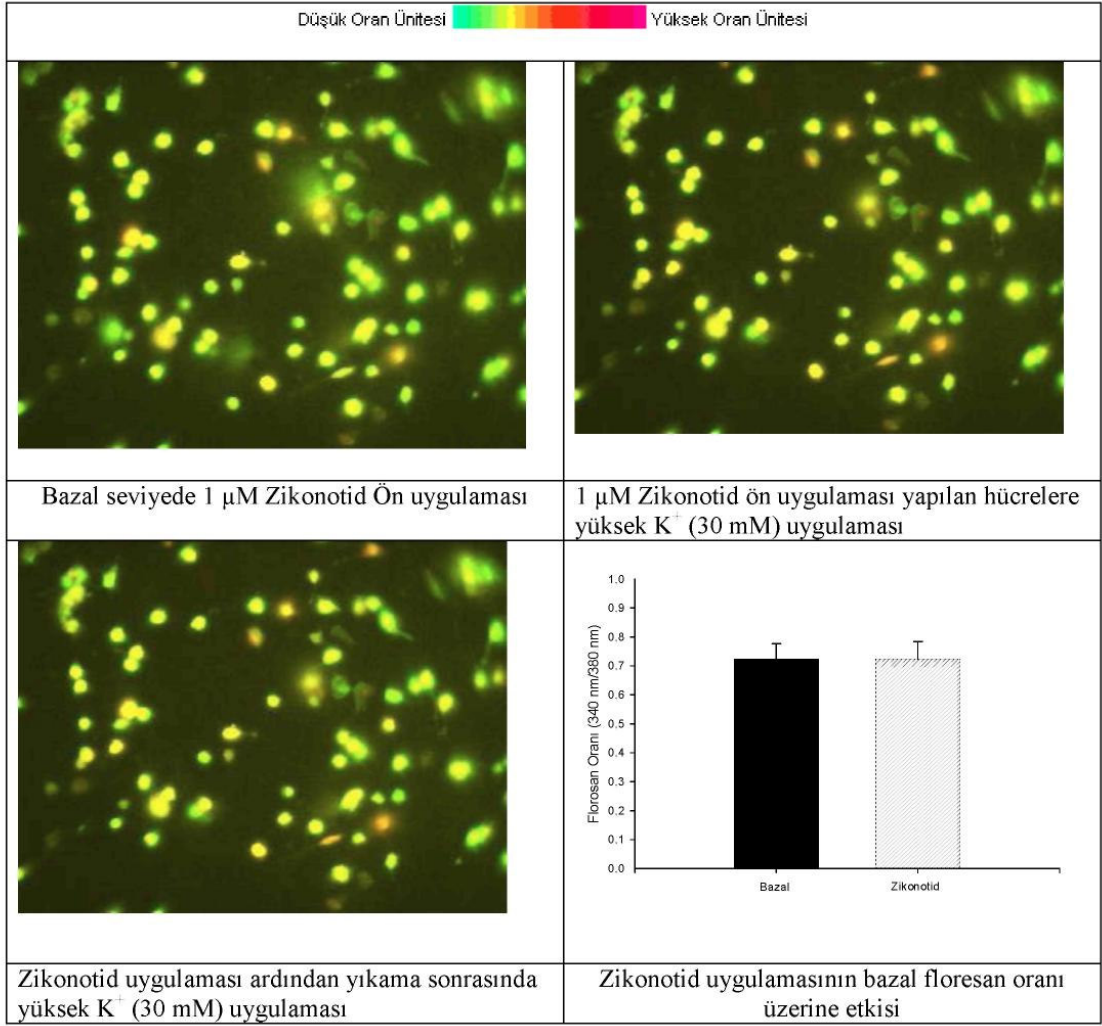
Hücre İçi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Tez çalışmasının bu protokolünde zikonotidin (1nM, 10 nM ve 1 μ M) dozlarında DKG sinir hücrelerinde KCl ile uyarılmış [Ca²⁺]i düzeyi üzerine etkisi incelendi. İlk aşamada zikonotidin DKG hücrelerinde bazal kalsiyum sinyalleri üzerine etkisi olup olmadığı belirlendi. Zikonotidin (1nM, 10 nM ve 1 μ M) DKG hücrelerinde bazal kalsiyum sinyal seviyesini değiştirmediği tespit edildi (şekil 18).

Daha sonra kontrol koşullarında yıkamaları takiben ardışık 3 yüksek KCl (30 mM) içeren hücre dışı kayıt solüsyonu ile DKG hücreleri uyarıldı. Yüksek K⁺ membran depolarizasyona cevap olarak [Ca²⁺]_i düzeyinde artış meydana getirmektedir. Bu uygulamaların ikincisi aşamasında zikonotid (1nM, 10 nM ve 1 µM) 30 mM KCl içeren hücre dışı kayıt solüsyonu ile birlikte uygulandı.

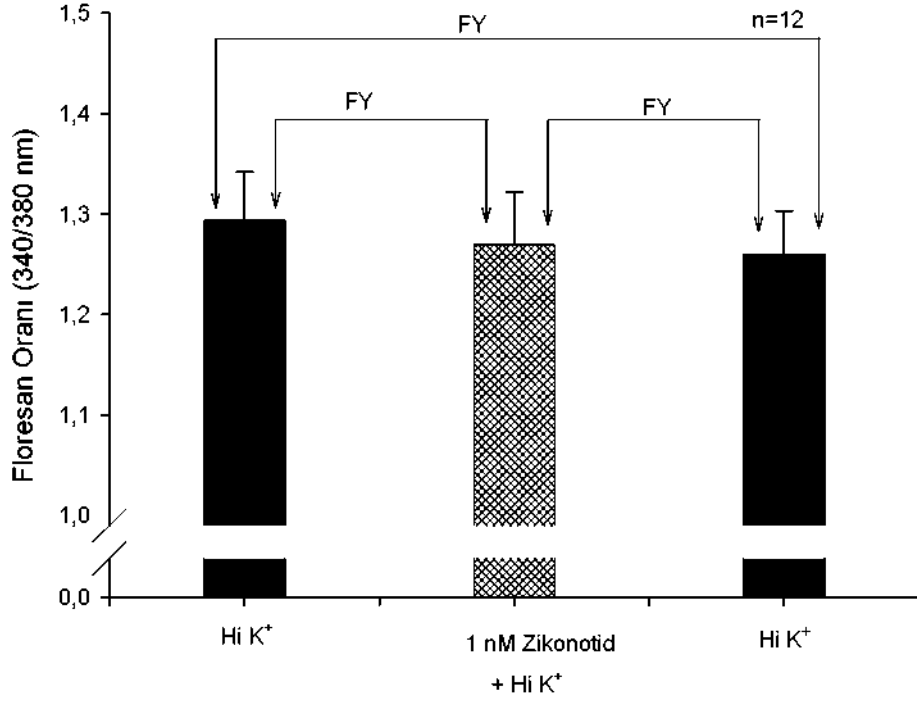
Zikonotidin uygulanan en düşük dozu, yüksek K⁺ uygulamasının meydana getirdiği [Ca²⁺]_i artış cevabını anlamlı düzeyde değiştirmedeği belirlendi (Tablo 2, Şekil 5.7). Zikonotidin (10 nM) daha yüksek dozu ise yüksek K⁺ meydana gelen [Ca²⁺]_i artış cevabını anlamlı düzeyde baskılamaktadır. Ancak bu etki geri dönüşümlü olup, yıkama sonrasında ortadan büyük ölçüde kalkmaktadır. Şöyle ki; zikonotid uygulamasını takiben gerçekleştirilen yıkama işleminden sonra gerçekleştirilen üçüncü yüksek K⁺ uygulanması ile ilk yüksek K⁺ uygulamasının meydana getirdiği [Ca²⁺]_i artış cevabı birbirine yakın olarak tespit edildi (Tablo 2, Şekil 5.9).

Kullanılan en yüksek doz zikonotid (1 µM) ile hücrelerin muamele edilmesi yüksek K⁺ ile meydana gelen [Ca²⁺]_i artış cevabını anlamlı olarak baskılamakta, yıkamayı takiben yüksek K⁺ uygulaması ilk uygulamaya kıyasla daha düşük bir artışı [Ca²⁺]_i meydana getirmektedir. Bu da etkinin bir miktar geri dönüşümsüz olduğu göstermektedir (Tablo 2, Şekil 5.10). Yine benzer şekilde zikonotid (1 µM) ile DKG hücrelerine ön muamele yapılması yüksek K⁺ un meydana getirdiği etkiyi baskılamaktadır (Şekil 5.7).



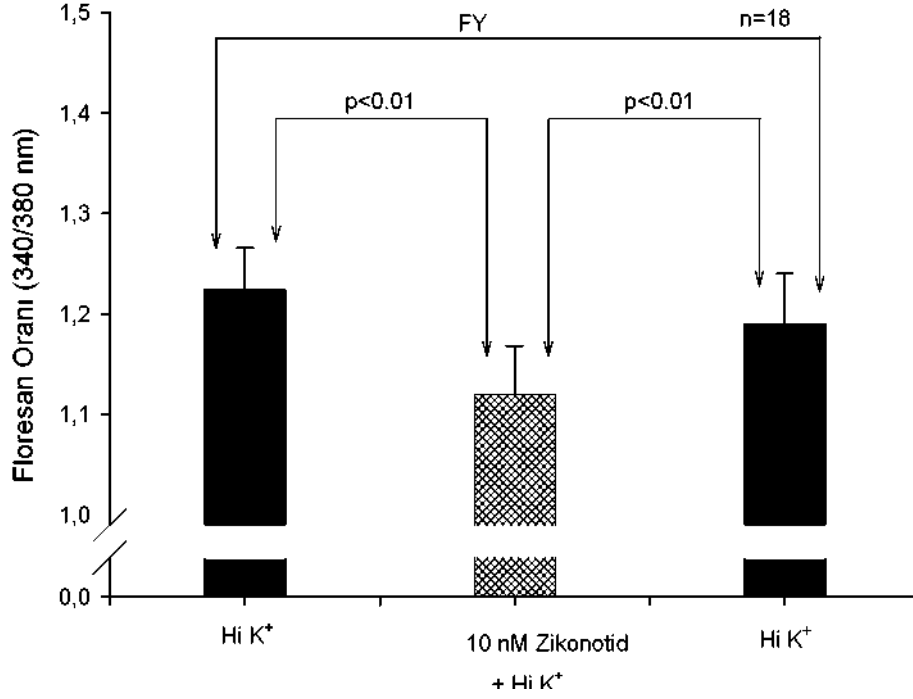
Şekil 5.7. Zikonotidin (1μM) sıçan DKG hücrelerinde Yüksek K⁺ ile indüklenen [Ca²⁺]_i düzeylerine etkisi.

Şekilde fura-2 AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde Zikonotid (1 μM) ön uygulamasının bazal [Ca²⁺]_i üzerinde meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait orijinal kayıt örnekleri sunulmuştur. [Ca²⁺]_i düzeyler Zikonotid (1 μM) uygulamasından önce (bazal), yüksek K⁺ (30 mM) + Zikonotid (1 μM) uygulaması ve Zikonotid (1 μM) uygulaması ardından yıkama sonrasında yüksek K⁺ uygulaması takiben değerlendirildi.

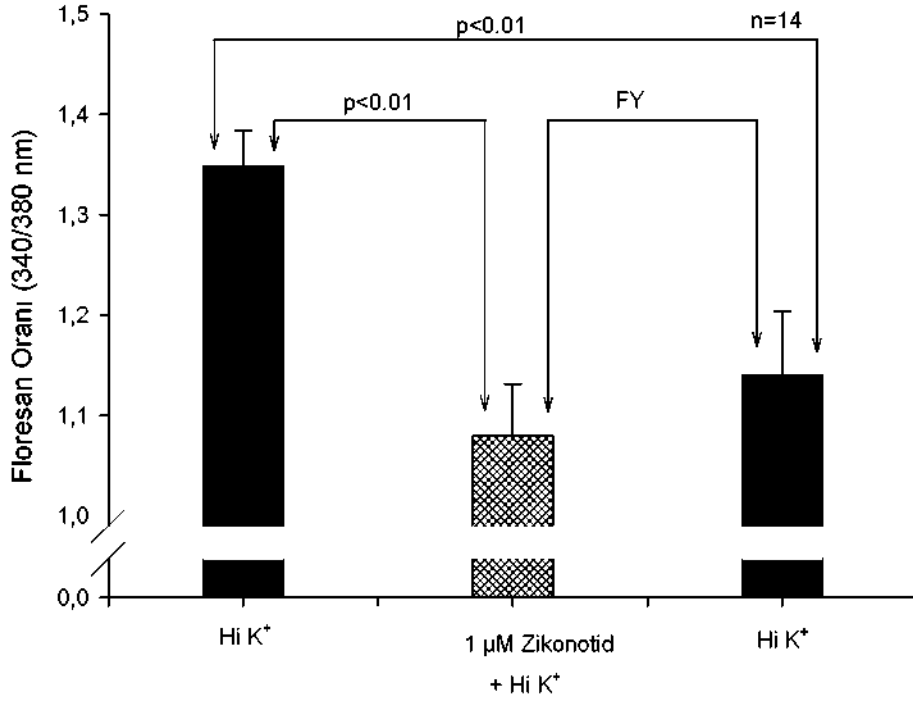


Şekil 5.8. Zikonotid (1 nM) sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi.

Şekilde fura-2 AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde zikonotid (1 nM) uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait ortalama verilerden geliştirilmiş grafik sunulmuştur. $[Ca^{2+}]_i$ düzeyleri, fura-2 AM boyası kullanılarak, 1.yüksek KCl (30 mM) uygulaması, 2. yüksek K⁺ (30 mM) + Zikonotid (1 nM) uygulaması ve 3. yüksek K⁺ (30 mM) uygulaması takiben değerlendirildi. Cevaplar flüoresan oranında (340nm/380 nm) meydana gelen değişikliklerin pik değerleri olarak belirlendi. Bütün ölçümler en az 3 farklı kültüre ait hücrelerin olduğu lamellerde tekrarlanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Hata çubukları SEM'i göstermektedir. F.Y.=Fark Yok, VA: valproik asit, Hi K⁺: Yüksek KCl (30 mM).



Şekil 5.9. Zikonotidin (10 nM) sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi. Şekilde fura-2 AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde zikonotid (1 nM) uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait ortalama verilerden geliştirilmiş grafik sunulmuştur. $[Ca^{2+}]_i$ düzeyleri, fura-2 AM boyası kullanılarak, 1.yüksek KCl (30 mM) uygulaması, 2. yüksek KCl (30 mM) + Zikonotid (10 nM) uygulaması ve 3. yüksek KCl (30 mM) uygulaması takiben değerlendirildi. Cevaplar flüoresan oranında (340nm/380 nm) meydana gelen değişikliklerin pik değerleri olarak belirlendi. Bütün ölçümler en az 3 farklı kültüre ait hücrelerin olduğu lamellerde tekrarlanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Hata çubukları SEM'i göstermektedir. F.Y.=Fark Yok, VA: valproik asit, Hi K⁺: Yüksek KCl (30 mM).



Şekil 5.10. Zikonotidin ($1 \mu\text{M}$) sıçan DKG hücrelerinde $[\text{Ca}^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi. Şekilde fura-2 AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde zikonotid ($1 \mu\text{M}$) uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait ortalama verilerden geliştirilmiş grafik sunulmuştur. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ düzeyleri, fura-2 AM boyası kullanılarak, 1.yüksek K^+ (30 mM) uygulaması, 2. yüksek K^+ (30 mM) + Zikonotid ($1 \mu\text{M}$) uygulaması ve 3. yüksek K^+ (30 mM) uygulaması takiben değerlendirildi. Cevaplar flüoresan oranında ($340\text{nm}/380 \text{ nm}$) meydana gelen değişikliklerin pik değerleri olarak belirlendi. Bütün ölçümler en az 3 farklı kültüre ait hücrelerin olduğu lamellerde tekrarlanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Hata çubukları SEM'i göstermektedir. F.Y.=Fark Yok, VA: valproik asit, Hi K⁺: Yüksek KCl (30 mM).

Tablo 5.2. Zikonotidin farklı dozlarının (1nM, 10 nM ve 1 µM) bazal ve yüksek K⁺ ile depolarizasyonla indüklenen hücre içi kalsiyum artışı (flüoresan oranı) üzerine etkileri

Doz (nM)	Bazal+ 30 mM KCl	Bazal+ 30 mM KCl + Zikonotid	(Bazal) + 30 mM KCl	n
1	1.29±0.05	1.27 ±0.05	1.26 ±0.04	12
10	1.22 ±0.05	1.12 ±0.05	1.19 ±0.05	18
1000	1.35 ±0.04	1.08 ±0.05	1.14 ±0.06	14

5.2.3. Spinorfinin Dkg Hücrelerinde Depolarizasyonla İndüklenen Hücre İçi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

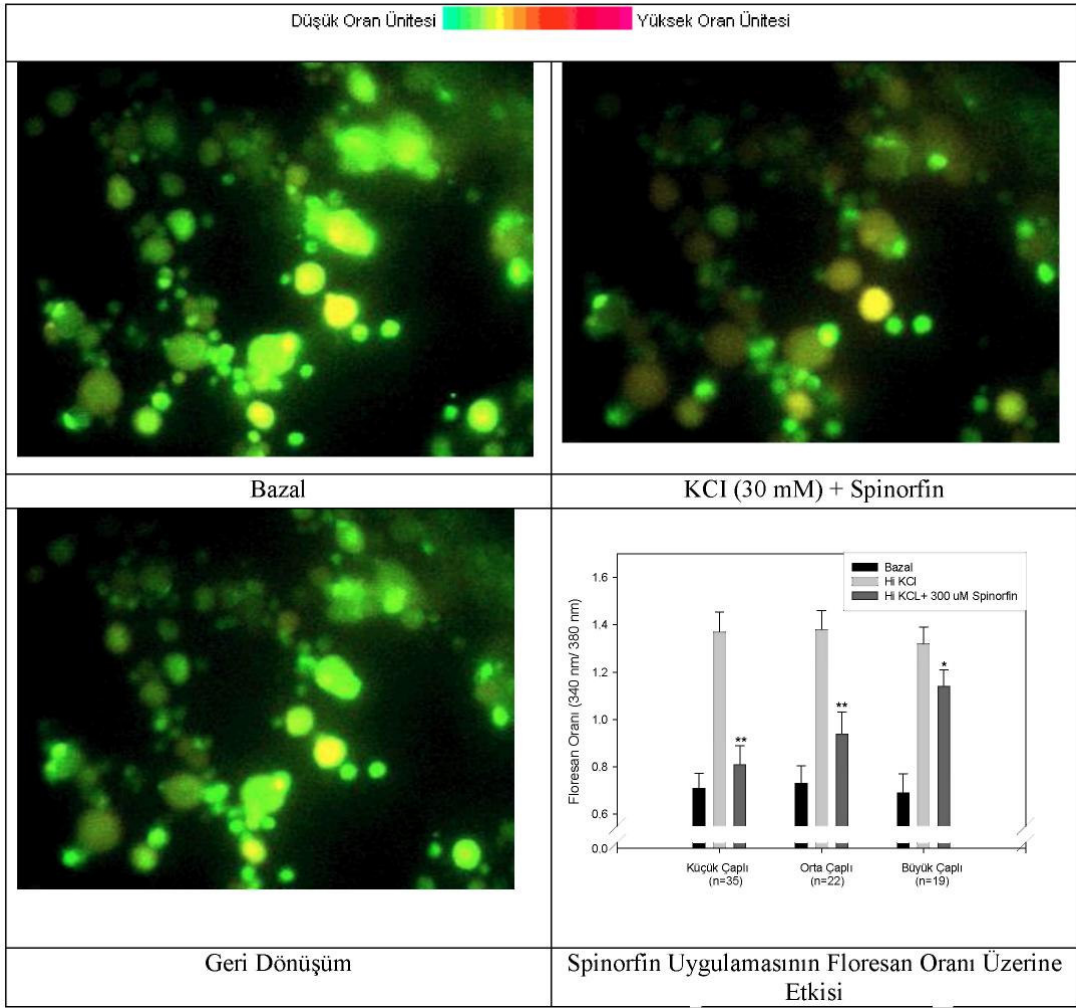
Tez çalışmasının bu protokolleriyle spinorfinin farklı dozlarının (10 µM, 100 µM ve 300 µM) külrüre DKG sinir hücrelerinde yüksek K⁺ ile indüklenmiş [Ca²⁺]_i düzeyleri üzerine etkisi incelendi.

İlk aşamada spinorfinin DKG hücrelerinde bazal kalsiyum sinyalleri üzerine etkisi olup olmadığı belirlendi. Spinorfinin test edilen dozları (10 µM, 100 µM ve 300 µM) DKG hücrelerinde bazal kalsiyum sinyalleri üzerinde anlamlı bir etki meydana getirmemektedir (Şekil 5.11).

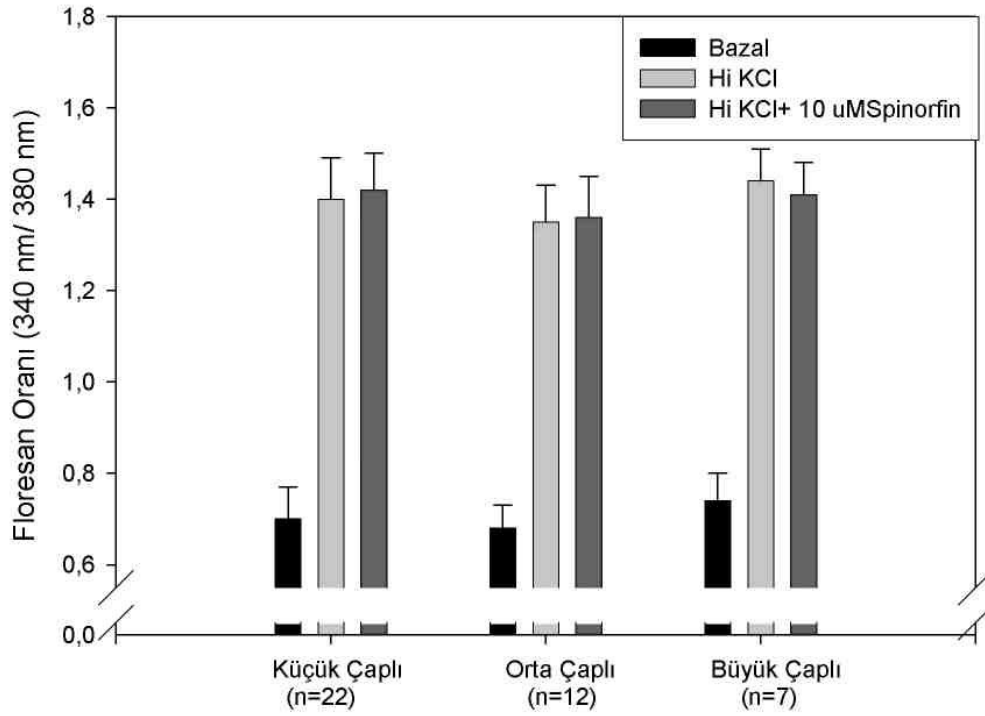
Daha sonra kontrol koşullarında ardışık 3 yüksek K⁺ (30 mM KCl) içeren hücre dışı kayıt solüsyonu uygulaması yapıldı. Yüksek K⁺ membran depolarizasyona cevap olarak benzer özellikte [Ca²⁺]_i artış cevabı meydana getirdi. Bu uygulamaların ikincisi esnasında spinorfinin farklı dozları (10 µM, 100 µM ve 300 µM) yüksek K⁺ içeren hücre dışı kayıt solüsyonu ile birlikte uygulandı. Spinorfinin kullanılan en

düşük dozu olan 10 µM yüksek K⁺ uygulamasının meydana getirdiği [Ca²⁺]i artış cevabını anlamlı olarak değiştirmemektedir (Tablo 3, Şekil 5.12). Spinorfin 100 µM dozu ise yüksek K⁺ meydana gelen [Ca²⁺]i artış cevabını anlamlı düzeyde baskılamaktadır. Bu etki küçük çapa sahip DKG hücrelerinde oldukça belirgin bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Bu da kullanılan bu ajanın propiyepsiyondan sorumlu olan büyük ve orta çapa sahip olan DKG hücrelerinden ziyade nosiseptif küçük çaplı DKG hücrelerini etkilediğini ortaya koymaktadır (Tablo 4, Şekil 5.13).

Kullanılan en yüksek doz olan 300 µM spinorfin ise yüksek K⁺ meydana gelen [Ca²⁺]i artış cevabını anlamlı düzeyde baskılamaktadır. Benzer şekilde bu etki küçük çapa sahip DKG hücrelerinde spesifik ve oldukça belirgin bir şekilde ortaya çıkmaktadır (Tablo 5, Şekil 5.14).



Şekil 5.11. *Spinorfinin Sıçan DKG Hücrelerinde Yüksek K^+ ile İndüklenen $[Ca^{2+}]_i$ Düzeylerine Etkisi. Şekilde fura-2 AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde spinorfin uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait orijinal kayıt örnekleri sunulmuştur.*

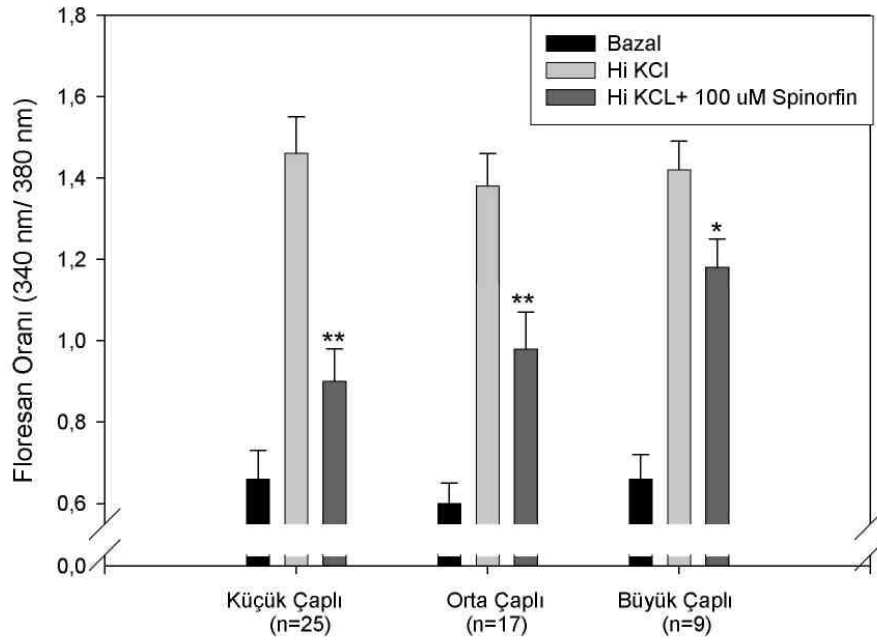


Şekil 5.12. Spinorfinin (10 μ M) sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi.

Şekilde fura-2 AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde spinorfin (10 μ M) uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait ortalama veriler DKG hücre çapı dikkate alınarak grafik sunulmuştur.

Tablo 5.3. Spinorfinin (10 μ M) yüksek K^+ ile depolarizasyona bağlı $[Ca^{2+}]_i$ artışı (flüoresan oranı) üzerine etkileri

Çap	Bazal	Bazal+ 30 mM KCl	(Bazal) + 30 mM KCl+Spinorfin	n
Küçük	0.72±0.07	1.4 ±0.09	1.4 ±0.08	22
Orta	0.69 ±0.05	1.35 ±0.08	1.36 ±0.09	12
Büyük	0.71 ±0.06	1.44 ±0.07	1.41 ±0.07	7



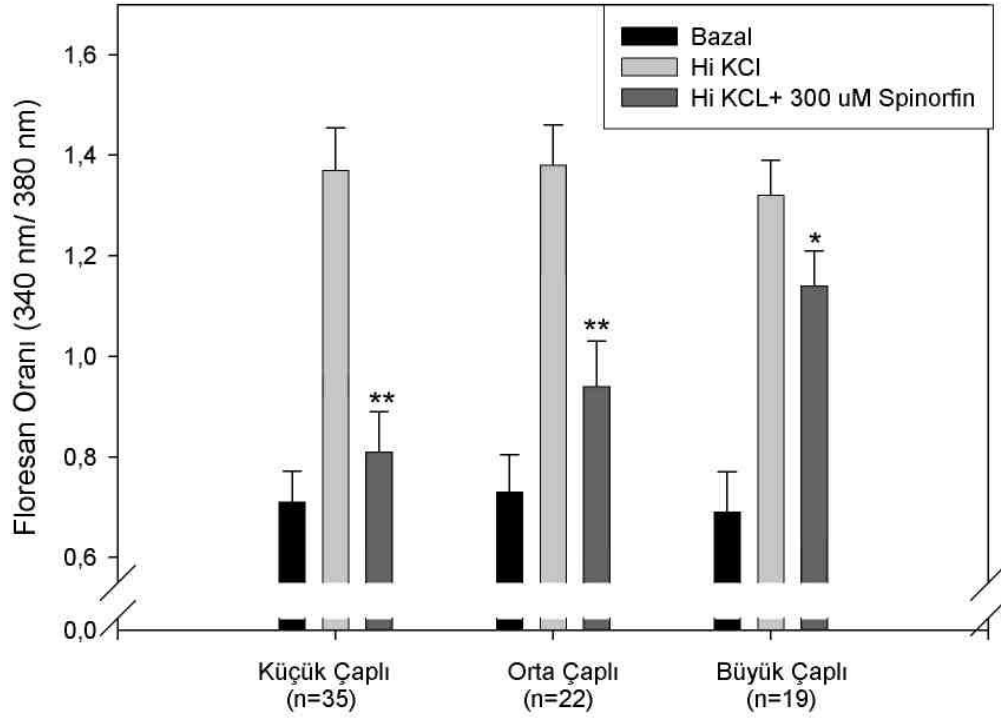
Şekil 5.13. 100 μM Spinorfinin sıçan DKG hücrelerinde $[\text{Ca}^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi.

Şekilde fura-2 AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde spinorfin (100 μM) uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait ortalama veriler DKG hücre çapı dikkate alınarak grafik sunulmuştur.

Tablo 5.4. Spinorfinin (100 μM) yüksek K^+ ile depolarizasyona bağlı $[\text{Ca}^{2+}]_i$ artışı (flüoresan oranı) üzerine etkileri

Çap	Bazal	Bazal+ 30 mM KCl	Bazal + 30 mM KCl + Spinorfin	n
Küçük	0.62±0.07	1.45 ±0.09	0.91 ±0.08**	25
Orta	0.64 ±0.05	1.39 ±0.08	0.98 ±0.09**	17
Büyük	0.69 ±0.06	1.42 ±0.08	1.18 ±0.08*	9

**p<0.001, *p<0.01



Şekil 5.14. Spinorfinin (300 μM) sıçan DKG hücrelerinde $[\text{Ca}^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi.

Şekilde fura-2 AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde spinorfin (300 μM) uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait ortalama veriler DKG hücre çapı dikkate alınarak grafik sunulmuştur.

Tablo 5.5. Spinorfinin (300 μM) yüksek K^+ ile depolarizasyona bağlı hücre içi kalsiyum artışı (flüoresan oranı) üzerine etkileri

Çap	Bazal	Bazal+ 30 mM KCl	Bazal+ 30 mM KCl+Spinorfin	n
Küçük	0.70±0.06	1.39 ±0.09	0.84 ±0.08**	35
Orta	0.72 ±0.07	1.40 ±0.08	0.96 ±0.09**	22
Büyük	0.68 ±0.06	1.35 ±0.08	1.14 ±0.08*	19

**p<0.001, *p<0.01

6. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, hücresel ağrı modeli olan DKG hücrelerinin primer kültürü kullanılarak bu hücrelerde hücresel uyarılabilme ve kalsiyum sinyallerine valproik asit, zikonotit ve spinorfinin etkileri irdelenmiştir.

Valproik asit irdelenen dozlarda hücre içi kalsiyum düzeyi üzerine anlamlı bir etki göstermedi. Spinorfin ve zikonotid ise ilk defa bu tez çalışması ile ortaya konan etkileri ile hücre içi kalsiyum sinyalleri üzerine oldukça güçlü ve doza bağlı bir inhibitör etki meydana getirdi. Spinorfinin etkisinin ağrı iletiminde primer rol oynayan DKG nöron alt tiplerine spesifik etkisi, hücre gövdeleri DKG içerisinde bulunan diğer duyuları (propriyosepsiyon gibi) etkilemeksizin ağrıyı etkileme potansiyelini ortaya koyan önemli bir deneysel bulgudur.

Ağrı, “gerçekleşen veya potansiyel doku hasarı veya tehdidi ile birlikte bulunan” çok önemli bir biyolojik sinyaldir. Günlük yaşamda yaygın olarak hissedilen hoş olmayan bu duyu ilave doku hasarının gerçekleşmesine karşı koruyucu rol oynayarak “fonksiyonel ve canlı kalma” bağlamında homeostazise katkıda bulunur. Ancak, artık homeostazise katkısı olmayan kronik ağrılar, normalde ağrı duyusu meydana getirmeyen uyarıların ağrılı olarak algılanması veya ağrılı uyarılara abartılı ağrı duyusu ile cevap verme durumları, yaşam kalitesini düşüren, önemli iş gücü ve ekonomik kayıplara yol açan, hekime en sık başvuru sebebi bir halk sağlığı problemidir. Halen ideal çözümü bulunmamış ağrının mekanizmasının anlaşılması ve ilaç geliştirilmesinde hücresel biyofizik ve farmakolojik çalışmaların önemli bir yeri vardır.

Daha önceki çalışmalar genelde vezikül transportu, nörotransmitter salıverilmesi, uyarılma yoluyla sinyal iletimi gibi nosisepsiyonda rol alan mekanizmalardan hangisinde spesifik olarak rol oynadığı net olarak aydınlatılamamışsa da, hücre içi kalsiyum artışının spinal dorsal boynuz ve diğer periferel bölgelerde nosiseptif cevabın başlamasında anahtar rol oynadığı kabul edilmektedir. Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları aracılığı ile hücre dışından kalsiyum girişinin akut nosiseptif bilginin spinal düzeyde iletiminde rol aldığı gösterilmiştir (55). Yine, akut, tonik ve kronik ağrı için hücrenel ve davranışsal nosiseptif modellerde gerçekleştirilen çalışmalar N-tipi, L-tipi ve diğer kalsiyum kanal antagonistlerinin antinosiseptif etki gösterdiği tespit edilmiştir (16, 26, 59, 85). Nosiseptif hücre modeli DKG sinir hücre kültürlerinde hücre gövdesinde voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının da nosisepsiyonda rol oynayan iyon kanalları arasında (voltaj bağımlı Na⁺, K⁺ kanalları, TRP kanalları, 5-HT reseptörler, asit duyarlı iyon kanalları...) yer aldığı bilinmektedir (52, 53). Bu literatür bilgilerinin ışığı altında mevcut çalışmada [Ca²⁺]_i değişiklikleri nosiseptif sinyal belirteci olarak kabul edilerek flüoresan kalsiyum görüntüleme tekniği ile hücre içi kalsiyum düzeyleri değerlendirilmiştir.

KCl, sinir hücrelerinde sinyal transdüksiyonu için yaygın olarak kullanılan ve depolarizasyonu ile hücreye kalsiyum girişini uyarın bir stimulustur. Çalışmada küçük, orta ve büyük çaplı DKG nöronlarının kapsaisin duyarlılığını (klasik kimyasal nosiseptif uyarın) test etmek için, nonspesifik membran depolarizasyonu için KCl kullanıldı. KCl membranı depolarize ederek voltaj bağımlı kalsiyum kanallarından kalisyum girişi yoluyla [Ca²⁺]_i belirgin bir artışa yol açtı. KCl ile indüklen [Ca²⁺]_i cevapları, kapsaisinin aksine DKG alt tipleri arasında belirgin bir

farklılık gözetmeksizin, bütün alt tiplerde benzer profilde gerçekleşti. Daha önce DKG hücrelerinde de gerçekleştirilen çalışmalarla uyumlu olarak kısa süreliğine KCl (30 mM) uygulanması voltaj bağımlı kalsiyum kanalları aracılığıyla $[Ca^{2+}]_i$ düzeyinde geri dönüşümlü bir artışa yol açtı (80).

Nöronlarda özellikle tekrarlayan aksiyon potansiyeli esnasında hücre içine önemli miktarlarda kalsiyum girişinin gerçekleştiği daha önceki çalışmalarda ortaya konmuştur. En yaygın hücreSEL ikincil habercilerden biri olan kalsiyumun hücre içine girişi ve hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunun artışı nöronlarda hücreSEL uyarılabilmenin kontrolü, gen ekspresyonu, nörotransmitter salıverilmesi, enzim aktivasyonu ve kalsiyum bağımlı iyon kanallarının aktivasyonunun da yer aldığı pek çok hücreSEL olayda oynar (8-10). Dinlenme halinde kalsiyum hücre içi ve hücre dışı kısımlarda bulunur ve hücreler için dinlenme halindeki seviyeleri bu hücreSEL sinyalleşmelerde rol oynamaz. Ekstraselüler kalsiyum bağlı ve serbest kalsiyum şeklinde bulunur (8). Sitoplazmik kalsiyum sinyalleri hücre içi serbest kalsiyum düzeyindeki artışa bağlı olarak ortaya çıkar (10). Hücre içi serbest kalsiyum düzeyi ise ya hücre dışından voltaj ya da ligand kapılı membran kalsiyum kanalları aracılığı ile oluşan kalsiyum girişi ya da hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum salıverilmesi ile gerçekleşir. Daha sonra artan bu kalsiyum ya aktif mekanizmalarla hücre dışına atılır ya da hücre içi kalsiyum depolarına geri alınarak hücreSEL kalsiyum homeostazisi sağlanır. Böylece hücre içi kalsiyum depoları hem kalsiyum düzeylerinde artışta kalsiyum kaynağı olarak hem de kalsiyum sinyallerinin sonlanmasında kalsiyum homeostazis organeli olarak görev yaparlar (8-10).

Çalışmada, sıçan dorsal kök gangliyon sinir hücrelerinde valproik asitin aksiyon potansiyeline nasıl etki ettiği, hangi kanallara etki etmiş olabileceği ve bu

kanallar için biyofiziksel bir yaklaşım olan zıtlanma potansiyelleri çalışmaları yapılması hedeflenmiştir.

Bu ajanlar çeşitli voltaj bağımlı iyon kanallarına etki ediyor olabilirler. Bunlardan bir tanesi yüksek iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları omurgalılarının sinir sisteminde ve düz kaslar ve epitel doku gibi diğer dokularda da bulunmaktadır. Bu potasyum kanal tipinin aksiyon potansiyeli esnasında aktive olduğu aralarında hipokampus nöronlarının da yer aldığı pek çok nöron tipinde aksiyon potansiyeli repolarize edici fazını kontrol ederek aksiyon potansiyeli ateşleme sıklığını belirledikleri bilinmektedir.

Çalışmada valproik asit elektrofizyolojik deneylerde aksiyon potansiyeli uyarılabilirliği üzerine tez çalışmasında test edilen konsantrasyonları için anlamlı düzeyde etki etmediği saptanmıştır. Elektrofizyolojik deneylerde sadece akım kenetleme yapılması spesifik olarak sodyum ve kalsiyum kanal iletkenlikleri üzerine valproik asitin etkisinin irdelenmemiş olması bu tez çalışmasının bir kısıtlamasıdır. Yakın geçmişte gerçekleştirilen bir çalışmada patch kenetleme yöntemi ile valproik asitin nosisepsiyonda rol alan periaquaduktal gri cevher ve korteks nöronlarında yüksek voltajla aktive olan kalsiyum kanalları üzerine anlamlı bir etki etmediği tespit edilmiş ve bu çalışmada valproik asidin etkisinin başka mekanizmalar üzerinden olabileceği ileri sürülmüştür (57). Yine astrosit ve schwan hücreleri ile birlikte kültüre edilen primer motor nöronlarda hücre içi kalsiyum sinyalleri üzerine valproik asitin anlamlı bir etki etmediği bildirilmiştir (67). Mevcut çalışmada direk kalsiyum görüntüleme deneylerinde 1 mM gibi çok yüksek doz valproik asit bile hücre içi serbest kalsiyum düzeylerine anlamlı bir etki göstermediği tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasının bulguları yukarıdaki çalışmaların bulguları kalsiyum kanalları üzerine

etkiler yönündne ile uyumludur. Bununla birlikte valproik asitin antikanser ilaç olan sisplatinle indüklenen nörotoksisiteye karşı DKG nöronlarını da koruduğu ve bu ilaç kullanımına bağlı gelişecek nöropatik ağrı sendromuna karşı koruyucu potansiyelinin de olabileceği bildirilmiştir (70). Ancak etki mekanizmasına yönelik literatürde yeterli veri mevcut değildir.

Başlıca üç alt gruba ayrılan kalsiyum bağımlı potasyum kanalları aksiyon potansiyellerinin şekillenmesinde rol oynayarak ve ateşleme paternlerini kontrol ederek nöronal fonksiyonlarda önemli roller oynar (35). Yüksek iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazı esnasında aktive olarak hızlı hiperpolarize edici ard potansiyelleri, düşük iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları ise tek ya da bir grup aksiyon potansiyelinden sonra aktive olur ve orta süreli hiperpolarize edici ard potansiyellere katkıda bulunur, üçüncü tip düşük iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları ise yavaş hiperpolarize edici ard potansiyelin oluşumunda rol oynar.

Düşük iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanallarının aksine düşük ve orta iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları karibdotoksin ve ayberiyotoksin gibi selektif kalsiyum bağımlı potasyum kanal blokörleri ile farmakolojik olarak bloklanarak tanımlanabilirler.

Hiperpolarize edici ard potansiyellerin ortaya çıkmasında rol oynayan kanalların TEA dirençli fakat apamin ile bloklandığı daha önceki çalışmalarda ortaya konmuştur. Bu çalışmada özellikle valproik asidin ki valproik asit bir antikonvulsant ve psikolojik durum düzenleyici ilaç olarak başlıca epilepsi ve bipolar bozukluk tedavisinde klinik kullanımı olan bir kimyasal bileşiktir. Valproik asit ayrıca migren, baş ağrısı ve şizofren tedavisinde de kullanılmaktadır.

Ağrı, dünyada çok sayıda insanı çeşitli düzeylerde etkileyen, önemli düzeyde yaşam kalitesi ve işgücü kaybına yol açan ve insanların sağlık yardımına başurma nedenlerinden yaklaşık %80'inin altında yatan ciddi bir sağlık problemi olup genelde yapay ve vücuda dışardan verilen ajanlara dayalı tedavi seçenekleri hala ideal düzeyde etkinlik ve yan tesirlerden arı bir durumdan uzaktır. Bu bağlamda vücutta normalde var olan ağrı dindirici özelliğe sahip ajanların keşif ve kullanılması gittikçe artan bir önemle umut teşkil etmektedir.

Son yıllarda ağrıyla ilgili araştırmalar geleneksel yöntemlerden ziyade modern elektrofizyolojik (patch kenetleme dahil) nörobiyolojik, moleküler biyoloji ve genom çalışmalarını kullanarak fizyolojik ve patofizyolojik ağrıyı hücre ve moleküler düzeylerde aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Ağrı konusundaki moleküler araştırma alanları hızla genişlemektedir ve elde edilen bilgilerle ağrı tedavisinde daha yüksek etkinlik ve secicilik sağlayabilecek hedefler tespit edilmektedir. Ayrıca, potansiyel ağrı giderici yeni ajanların etkileri hücresel düzeyde araştırılmaktadır. Son yıllarda bu moleküler tekniklerle biyofiziksel ve farmakolojik yöntemler kombine edilerek daha geçerli araştırma yaklaşımları uygulanmaktadır.

Dorsal kök gangliyon (DKG) sinir hücreleri ağrı mekanizması araştırmaları için hücresel bir model teşkil etmektedir ve patch kenetleme tekniği oldukça güçlü moleküler bir elektrofizyolojik tekniktir. Flüoresan kalsiyum görüntüleme tekniği ise önemli bir ikinci haberci olan kalsiyumun hücre içi düzeyini belirlemede oldukça geçerli moleküler bir yöntemdir.

Yeni keşfedilen bir endojen nöropeptit olan spinorfinin farklı deneysel modellerde morfinle karşılaştırılabilir derecelerde ağrı giderici etkisi olduğu gösterilmiştir. Doğrudan ya da dolaylı olarak ağrı olayına karışabilen spinorfin ağrı

iletiminde rol alan dorsal kök gangliyon sinir hücrelerinde membran uyarılabilirliği ile hücre içi kalsiyum homeostazisi üzerine etkileri incelenerek, bu ajanların ağrı iletimi üzerine olası etkilerinin moleküler mekanizması aydınlatılarak; tedavisinde olası olumlu etkilerine yönelik hücresel düzeyde bilgi elde edilmesi bu tez çalışmasının odağını oluşturmaktadır.

Yeni keşfedilen nöropeptid spinorfin enkefalin yıkılmayıcı enzimlerin endojen bir regülatörü olup; morfine yaklaşık düzeylerde analjezi sağladığı bildirilmektedir. İzole sıçan hipokampus kesitlerinde, sinaptik transmisyon üzerinde spinorfinin etkilerinin incelendiği bir çalışmada düşük stimülasyon frekansında, spinorfinin enkaphalin'in yıkılmasını önleyerek fasilatör etkiyi kuvvetlendirdiği, ancak yüksek bir stimülasyon frekansı söz konusu olduğunda ajanın kullanımının enkaphalinden bağımsız olarak sinaptik transmisyonu inhibe ettiği tesbit edilmiştir (98). Spinorfinin analjezik etki gösterdiği de bilinmektedir (87).

Enkephalinlerin spinal kordda ağrıyı modüle eden mekanizmalara da karıştığı bilinmektedir. Spinorfinin maymun beyinde enkephalini yıkabilme yeteneğine sahip enzimlerin oluşumuna doğru olan aktiviteyi inhibe ettiği bulundu. Yine bu ajanın bradykinin-uyarımlı nosiseptiv fleksor cevaplarıda inhibe ettiği bilinir. Spinorfinin endojen bir antiinflammator regülatör olduğu da bilinir (97).

P2 reseptörleri de moleküler yapıları ile sinyal transdüksiyon mekanizmalarındaki farklar sebebiyle P2X (ki bunlar ligand kapılı iyon kanallarıdır, iyonotropik reseptör) ve P2Y (ki bunlar da G protein-kenetli, metabotropik reseptörlerdir) olmak üzere iki esas alt gruba ayrılırlar (1,33, 67). P2X ve P2Y reseptörlerinin hücre içi Ca^{2+} düzeylerini artırdığı bilinmektedir. P2X reseptörleri hücre içi kalsiyum düzeyini hücre membranından Ca^{2+} , Na^+ ve K^+ gibi seçici

olmayan (non-selektif) katyonların hızla geçişine yol açarak artış sağlarken (19, 62), P2Y reseptörlerinin sağladığı hücre içi Ca^{2+} artışı hücre içi depolardan kalsiyum saliverilmesi yoluyla gerçekleşir (79). Memelilerde bu güne kadar 7 farklı P2X reseptörü (P2X₁-P2X₇) ve sekiz farklı P2Y reseptörü alt tipi (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ ve P2Y₁₄) klonlanarak P2 reseptör ailesinin üyesi olduğu kabul edilmiştir.

Bu reseptörler (reseptör-iyon kanalları) ATP ve farklı ATP analoglarına olan duyarlılıklarına ve inaktivasyon kinetik özelliklerine göre de birbirinden ayrılırlar. Hücre dışı ATP bağlanması kalsiyuma geçirgen olan bu seçici olmayan katyon (katyonlar arasında selektivitesi olmayan) kanallarının açılmasına yol açar. P2X₁ reseptörleri düz kaslarda yaygın olarak bulunmaktadır. P2X₁ gen knock-out erkek farelerin vas deferens kası kasılma defektine bağlı olarak infertilite gelişir (11). Bu durum ATP'nin sempatik sinirlerden noradrenalin ile birlikte salındığında nöromediyatör olarak rolüne de bir örnek teşkil eder. İnsanlarda P2X₁ reseptör mutasyonu ADP-aracılı trombosit agregasyonunda bozulma sonucunda şiddetli kanamalara yol açar.

Farklı P2X reseptörleri merkezi ve periferal sinir sistemi hücrelerinde farklı dağılım gösterirler. P2X₃ reseptörleri sadece belli bir duyuşal nöron alt tipinde görülür. Doku hasarı sonucu ATP salıverildiğinden, ATP P2X₃ reseptör izoformunun hasarı algılamada (nosisepsiyon) rol aldığı kabul edilmektedir. Gerçekten de P2X₃ reseptörü olmayan farelerde ağrılı sinyallere ve hatta dokuyu yakmayacak düzeylere kadar varan ısı uyarısına (<45 santigrat derece) az duyarlılık gösterir (28, 75). Spinorfinin DKG hücrelerinde hücre içi kalsiyum düzeylerini baskılayıcı etkisi etkisinin P2X₃ reseptörü üzerinden gerçekleşme olasılığı yüksektir.

Özellikle nosiseptif alt tip DKG hücrelerinde belirgin etkinin gözlenmesi bu ajanın diğer duyuları etkilemeksizin ağrıyı spesifik olarak baskılama ve dolayısı ile yan etki bakımından avantajlı bir profile sahip analjezik ilaç olma potansiyelinin ilave irdelenmeye değer bir potansiyel arz ettiğini ortaya koymaktadır.

Zikonotid, şiddetli ağrı tedavisi için kullanılan nöronlardaki N-tipi kalsiyum kanalının bir blokörüdür. Zikonotid, plaseboya kıyasla ağrıda önemli bir zayıflama gösterir. Kafa travmaları ve darbeleriyle ilişkili iskemi tedavisinde kullanılmaktadır (39). Zikonotid; Conus magus adı verilen marin snail venomunun bir bileşeni olan omega-konotoksin MVIIA'nın sentetik analogudur. Opioid özellikte olmayan bu ajan sistemik analjezik, morfin veya adjuvan tedavisine cevap vermeyen hastalar için 2004 yılında FDA onayı almış ve 2005 yılında da Avrupa Topluluğu tarafından intratekal analjezi gerektiren hastalar için güçlü analjezik ilaç olarak onay almıştır. Zikonotid terapötik profilinin altında yatan etki mekanizmasının nöronal N-tipi voltaj-duyarlı kalsiyum kanallarını (N-VSCCs) tesirli ve seçici blokunun oluşturduğu bir başka çalışma da göstermiştir (58). Yine bir başka çalışmada spinal olarak uygulanan zikonotidin, primer nosiseptif afferentlerden nörotransmitter salınımını bloklayarak analjezi oluşturduğu ve beyinde ağrı sinyallerinin propagasyonunu engellediği gösterilmiştir (46). Bu tez çalışmasında kullanılan hücre kültüründe hem ağrı he de diğer duyularla ilgili nöron alt tipleri bir arada bulunmaktadır ve bu yönden test edilen bir ajanın spesifik olarak ağrı hücrelerinde etkinliğini ortaya koymaya müsaade eder niteliktedir. Zikonotidin hücre içi kalsiyum düzeyi üzerine etkisi hücre alt tipleri arasında önemli bir fark göstermemiştir. Bu da literatürde zikonotit için bildirilen sersemlik ve konfüzyon gibi klinik yan etkileri (46) doğrular niteliktedir.

Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları aracılığı ile ağrı algılama ve iletmede rol oynayan sinir hücrelerine kalsiyum girişi ve bu duyuşal hücrelerde kalsiyum sinyalleşmesinin ağrı iletiminde rol oynaması, voltaj bağımlı kalsiyum kanal (N, T ve P tipi) blokerlerinin antinosiseptif etkilerinin olabileceğı konusunda umutlu araştırmalara ilham kaynağı olmaktadır. Zikonotidin primer duyuşal sinirler olan DKG hücrelerinde kalsiyum sinyallerine etkileri ilk defa bu çalışmada irdelenerek doza bağımlı olarak depolarizasyonun indüklediğı kalsiyum artışını önledikleri ortaya konmuştur. Bu tez çalışmasının bu yeni bulgusu yukarıda da bahsedildiğı gibi ağrı tedavisinde güçlü bir etkinliğe sahip zikonotidin hücreşel etki mekanizmasının ortaya konması yönünden önem taşımaktadır.

Antiepileptik ve duyudurum düzenleyici olarak yaygın kullanımı olan valproik asidin son yıllarda nöroprotektif etkileri ve hatta diğer antiepileptikler gibi özellikle nöropatik ağrıda olası ağrı dindirici etkileri ilgi çekerek hem klinik hem de deneysel araştırmalarla irdelenmektedir (23, 67).

Literatürde, ağrı dindirici potansiyelleri yanında nörotoksisiteye karşı koruyucu rolü olduğı speküle edilen valproik asidin, bu tez çalışmasında yüksek dozlarda bile depolarizasyonla indüklenen hücre içi kalsiyum artışını etkilememsi bulgusu en azından bu nöronlarda belirgin bir nöroprotektif potansiyelinin olmadığını düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasının bulguları tez içerisinde haklarında geniş bilgi verilen test ajanlarının ağrı giderici etkilerine yönelik hücreşel etki mekanizmaları hakkında bilgi sunmaktadır. Bu çalışmada özellikle hücreşel uyarılabilme konusunda moleküler biyofiziksel teknik olan patch kenetleme yöntemi ve direk kalsiyum görüntüleme yöntemleri kullanılarak bu ajanların hücreşel ağrı modeli DKG hücrelerinde olası

etkileri ve mekanizmaları incelenerek spinorfin için ilave irdelenmeye değer önemli bulgular ortaya konmuştur.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında flüoresan kalsiyum görüntüleme yöntemi kullanılarak zikonotit ve spinorfinin ağrı için hücresel model olan sıçan DKG hücrelerinde hücresel kalsiyum sinyalleşmesini doza bağlı olarak inhibe ettiği ilk defa ortaya konmuştur. Zikonotit çok düşük dozlarda bu etkiyi ortaya koyarak güçlü bir analjezik etki potansiyeli arz ettiği belirlenmiş ve zaten FDA onayı ile klinik kullanımda yer almaya başlamış bu yeni ağrı kesici ajanın etkisinde hücre içi kalsiyum sinyallerini baskılayıcı etkinin mekanizmada rol aldığı ortaya konmuştur. Bu bağlamda spinorfin etkisi hem özgün hem de daha dikkat çekicidir. Çünkü spinorfin sıçan DKG hücrelerinde ağrı ileten C liflerine karşılık gelen küçük çaplı hücrelerde spesifik olarak kalsiyum sinyallerini bloklarken propriyosepsiyon gibi diğer duylardan sorumlu büyük çaplı DKG hücrelerinde minimal etki meydana getirmiştir. Hücresel deney düzeyinde elde edilen bu kanıt, klinik denemelerle ilaç olma potansiyeli ortaya konması durumunda spinorfinin diğer duyları nispeden etkilemeksizin, yan etkilerden arı bir şekilde ağrı kesici olma potansiyelini ortaya koymaktadır. Spinorfinin bu etkileri, in vivo davranışsal ağrı deneyleri ve klinik uygulamalarla test edilerek ortaya konması gerekmektedir. Bu bağlamda mevcut tez çalışmasının bulguları spinorfinin etkilerinin ileri çalışmalarla test edilmesine dayanak teşkil edecek niteliktedir.

7. KAYNAKLAR

1. Abbracchio MP and Burnstock G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther*, 64: 445-475.
2. Aley KO., Messing RO., Mochly-Rosen D., Levine JD. (2000). Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C, *J Neurosci.*, 20, 4680-5.
3. Altier C., Zamponi GW. (2004). Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-type versus N-type, *Trends Pharmacol Sci.*, 25, 465-70.
4. Arendt-Nielsen L, Curatolo M, Drewes A. (2007). Human experimental pain models in drug development: translational pain research. *Curr Opin Investig Drugs*. 2007; 8: 41-53.
5. Atanassoff PG, Hartmannsgruber MW, Thrasher J, Wermeling D, Longton W, Gaeta R, Singh T, Mayo M, McGuire D, Luther RR (2000). Ziconotide, a new N-type calcium channel blocker, administered intrathecally for acute postoperative pain. *Reg Anesth Pain Med*. 25: 274-8.
6. Ayar A., Scott RH., (1999). The actions of ryanodine on Ca²⁺-activated conductances in rat cultured DRG neurones; evidence for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 359, 81-91,
7. Ayar, A. (1997). An Investigation of Calcium-Induced Calcium Release (CICR) In Cultured Rat Sensory Neurones, (Doktora Tezi), Aberdeen Üniversitesi, School of Medical Sciences.
8. Berridge MJ., Bootman MD., Roderick HL. (2000). Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 4, 517-29.

9. Berridge MJ., Lipp P., Bootman MD. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 1, 11-21.
10. Berridge, M. J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signaling. *J. Physiol.* 499,291-306.).
11. Burnstock G. Introduction: P2 receptors. *Curr Topics Med. Chem* 4:793-803.
12. Caterina MÍ, Leffler A., Malmberg AB., Martin WJ., Trafton 1, Petersen-Zeitz KR., Koltzenburg M., Basbaum AL, Julius D., (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor, *Science*, 288, 306-313,
13. Caterina MÍ, Schumacher MA., Tominaga M., Rosen TA., Levine JD., Julius D(1997)... The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature*, 389, 816-24,
14. Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E. (2003). International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels, *Pharmacol Rev.*, 55, 579-81,
15. Catterall WA, (1998). Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release, *Celi Calcium*, 24, 307-323,
16. Chaplan SR, Pogrel JW, Yaksh TL. (1994)Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J Pharmacol Exp Ther.*; 269: 1117-23
17. Chen CC, Zimmer A., Sun WH, Hail 1, Brownstein MÍ, Zimmer A., (2002). A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli, *Proc Natl Acad Sci.*, 99, 8992-7,

18. Cheng JK, Ji RR. (2008). Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res.*, 33, 1970-8,
19. Choi SY and Kim KT. (1996). Characterization of Na⁺ influx mediated by ATP⁴⁻-activated P2 purinoceptors in PC12 cells. *Br J Pharmacol*, 118: 935-940
20. Clapham DE., (2003). TRP channels as cellular sensors, *Nature*, 426, 517-524.
21. Corey DP., (2003). New TRP channels in hearing and mechanosensation, *Neuron*, 39, 585-588,
22. Cortright DN., Szallasi A., (2004). Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update, *Eur J Biochem.*, 271, 1814-9,
23. Coyle JT, Duman RS (2003) Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron* 38: 157-160
24. Damann N., Voets T., Nilius B., (2008). TTRPs in our senses, *Curr Biol.*, 18, 880-9,
25. Desaphy JF, Dipalma A., De Bellis M., Costanza T., Gaudio C., Delmas P., George AL Jr., Camerino DC., (2009). Involvement of voltage-gated sodium channels blockade in the analgesic effects of orphenadrine, *Pain*, 142, 225-35,
26. Diaz A, Dickenson AH. Blockade of spinal N- and P-type, but not L-type, calcium channels inhibits the excitability of rat dorsal horn neurons produced by subcutaneous formalin inflammation. *Pain* 69: 1997; 93-100.
27. Dickenson AH., Matthews EA., Suzuki R., (2002). Neurobiology of neuropathic pain: Mode of action of anticonvulsants. *Eur J Pain*, 6, 51-60,
28. Di Virgilio F. (1995). The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity,

- inflammation and cell death. *Immunol Today*, 16(11):524-8.
29. Dogrul A., Gardell LR., Ossipov MH., Tulunay FC., Lai J., Porreca F., (2003). Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers, *Pain*, 105, 159-68,
30. Edwards CM., Abusnana S., Sunter D., Murphy KG., Ghatei MA., Bloom SR., (1999). The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin, *J Endocrinol.*, 160, 7-12.
31. Edwards FA. , Gibb AJ., Colquhoun D., (1992). ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system, *Nature*, 359, 144-7,
32. Fadel J, Deutch, A.Y. (2002). Anatomical substrates of orexindopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area, *Neuroscience*, 111, 379–387,
33. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden KT, Jacobson KA, Leff P, and Williams M. (1994). Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev*, 46: 143-156.
34. Furue H, Katafuchi T, Yoshimura M. (2004). Sensory processing and functional reorganization of sensory transmission under pathological conditions in the spinal dorsal horn, *Neurosci. Res.*, 48, 361–368,
35. Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, O'Rourke ST. (2006) Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther.* 2006 Apr;110(1):103-16.

36. Guler AD, Lee HS., Iida T., Shimizu I., Tominaga M., Caterina M., (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4, J. Neurosci., 22, 6408–14,
37. Gunthorpe MJ., Benham CD., Randall A., Davis JB., (2002). The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels, Trends Pharmacol. Sci., 23, 183– 191,
38. Harper AA., Lawson SN., (1985). Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones, J Physiol., 359, 31-46,
39. Heading CE. Ziconotide (Elan Pharmaceuticals). IDrugs. 2001 Mar;4(3):339-50
40. Henry TR. (2003). The history of valproate in clinical neuroscience. Psychopharmacol Bull 37: 5-16.
41. Hucho T., Levine JD., (2007). Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology, Neuron, 55, 365–376,
42. Igwe O., Chronwall B., (2001). Hyperalgesia induced by peripheral inflammation is mediated by protein kinase C beta II isozyme in the rat spinal cord, Neuroscience, 104:875–890.
43. International Association for the Study of Pain, IASP International Association for the study of pain: <http://www.iasp-pain.org> (Erişim Ocak, (2009).
44. Jung KY, Moon HD, Lee GE, Lim HH, Park CS, Kim YC. (2007) Structure-activity relationship studies of spinorphin as a potent and selective human P2X(3) receptor antagonist. J Med Chem. 2007 Sep 6;50(18):4543-7.
45. Kandy T., Velázquez, HM., Sweitzer SM. (2007). Protein kinase C in pain:

- Involvement of multiple isoforms, *Pharmacol Res.*, 55, 578–589.
46. Klotz U (2006). Ziconotide--a novel neuron-specific calcium channel blocker for the intrathecal treatment of severe chronic pain--a short review. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2006 Oct;44(10):478-83.
47. Koulen P., Cai Y., Geng L., Maeda Y., Nishimura S., Witzgall R., Ehrlich BE., Somlo S., (2002). Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel, *Nat. Cell Biol.*, 4, 191-197,
48. Kwan Ky., Allchorne AJ., Vollrath MA., Christensen AP., Zhang DS., Woolf CJ., Corey DP., (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction, *Neuron*, 50, 277-89,
49. Lai J, Porreca F., Hunter JC., Gold MS., (2004). Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 44, 371-97
50. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. (2001) Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 2001;53: 597-652.
51. Lee SY., (2003). O'Grady SM., Modulation of ion channel function by P2Y receptors, *Cell Biochem Biophys.*, 39, 75-88,
52. Lee Y, Lee CH, Oh U. (2005) Painful Channels in Sensory Neurons. *Mol Cells*; 20: 315-24.
53. Lewin GR, Stucky CL. Sensory neuron mechanotransduction:regulation and underlying molecular mechanisms. In: *Molecular basis of pain transduction.* Wood JN, ed, New York: Wiley 2000;129-148.
54. LI P, Zhuo M., (1998). Silent glutamatergic synapses and nociception in

- mammalian spinal cord. *Nature*, 393, 695–698,
55. Malmberg AB, Yaksh TL. (1994) Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. *J Neurosci*;14: 4882-90.
 56. Mamet J, Lazdunski M., Voilley N., (2003). How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons, *J Biol Chem.*, 278, 48907-13,
 57. Martella G, Costa C, Pisani A, Cupini LM, Bernardi G, Calabresi P. (2008) Antiepileptic drugs on calcium currents recorded from cortical and PAG neurons: therapeutic implications for migraine. *Cephalalgia*; 28: 1315-26.
 58. Mc Kemy DD., Neuhausser WM., Julius D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation, *Nature*, 416, 52–58.
 59. Miljanich GP.(2004) Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr Med Chem. Dec*;11(23):3029-40
 60. Miranda HF, Bustamante D, Kramer V, Pelissier T, Saavedra H, Paeile C, Fernandez E, Pinaridi G. (1992) Antinociceptive effects of Ca²⁺ channel blockers. *Eur J Pharmacol*; 217: 137-41
 61. Montell C, Birnbaumer L., Flockerzi V., (2002).The TRP channels, a remarkably functional family, *Cell*, 108, 595-598.
 62. Naves La., McCleskey EW., (2005). An acid-sensing ion channel that detects ischemic pain, *Braz J Med Biol Res.* 38, 1561-9.

63. Park TJ., Song SK., Kim KT., (1997). A_{2A} adenosine receptors inhibit ATP-induced Ca²⁺ influx in PC12 cells by involving protein kinase, A. *J Neurochem*, 68, 2177-2185.
64. Passmore GM. (2005). Dorsal root ganglion neurones in culture: A model system for identifying novel analgesic targets? *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51, 201-8.
65. Peier AM., Reeve AJ., Andersson DA., Moqrich A., Earley TJ., Hergarden AC., Story GM., Colley S., Hogenesch JB., McIntyre P., Bevan S., Patapoutian A., (2002). A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes, *Science*, 296, 2046-49,
66. Peterson GM, Naunton M. Valproate: (2005) A simple chemical with so much to offer. *J Clin Pharm Ther.* Oct;30(5):417-21.
67. Ragancokova D, Jahn K, Kotsiari A, Schlesinger F, Haastert K, Stangel M, Petri S, Krampfl K. Analysis of neuroprotective effects of valproic acid on primary motor neurons in monoculture or co-cultures with astrocytes or schwann cells. *Cell Mol Neurobiol*, ahead of print.
68. Ralevic V, Burnstock G (1998). Receptors for purines and pyrimidines, *Pharmacol Rev*, 50, 413-492.
69. Raychowdhury Mk., Gonzalez-Perrett S., Montalbetti N., Timpanaro Ga., Chasan B., Goldmann Wh., Stahl S., Cooney E., Goldin E., Cantiello Hf., (2004). Molecular Pathophysiology Of Mucopolidosis Type Iv: Ph Dysregulation Of The Mucolipin-1 Cation Channel, *Hum. Mol. Genet.*, 13, 617–627,
70. Rodriguez-Menendez V, Gilardini A, Bossi M, Canta A, Oggioni N, Carozzi V, Tremolizzo L, Cavaletti G (2008). Valproate protective effects on cisplatin-

- induced peripheral neuropathy: an in vitro and in vivo study. *Anticancer Res*; 28: 335-42.
71. Sandkuhler J (2009) Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* 89:707–758
72. Sanchez JF., Krause JE., Cortright DN., (2001). The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat, *Neuroscience*, 107, 373–381,
73. Sasamura T., Sasaki M., Tohda C., Kuraishi Y., (1998). Existence of capsaicinsensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus, *NeuroReport*, 9, 2045–2048,
74. Schaible Hg., (2007). Peripheral and central mechanisms of pain generation, *Handb Exp Pharmacol.*, 177, 3-28,
75. Silos-Santiago I., (2008). The role of tetrodotoxin-resistant sodium channels in pain states: are they the next target for analgesic drugs? *Curr Opin Investig Drugs*, 9, 83-9,
76. Smith Gd., Gunthorpe MJ., Kelsell RE., Hayes PD., Reilly P., Facer P., Wright JE., Jerman JC., Walhin JP., Ooi L., Egerton J., Charles KJ., Smart D., Randall AD., Anand P., Davis JB., (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein, *Nature*, 418, 186-90,
77. Souslova V., Cfsare P., Ding Y., Akopian AN., Stanfa L., Suzuki R., Carpenter K., Dickenson A., Boyce S., Hill R., Nebenuis-Oosthuizen D., Smith AJ., Kidd EJ., Wood JN., (2000). Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors, *Nature*, 407, 1015-7,

78. Steinberg SF (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function, *Physiol Rev.*, 8, 1341-78.
79. Stone TW., (1981). Physiological roles for adenosine and adenosine 5'-triphosphate in the nervous system, *Neuroscience*, 6, 523-55,
80. Sugiura T. (2002). Tominaga M., Katsuya H., Mizumura K., Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1, *J. Neurophysiol.*, 88, 544-8,
81. Suh BC, Lee CO and Kim KT. (1995). Signal flows from two phospholipase C-linked receptors are independent in PC12 cells. *J Neurochem*, 64: 1071-1079.
82. Sutton KG, Martin DJ, Pinnock RD, Lee K, Scott RH. (2002) Gabapentin inhibits high-threshold calcium channel currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Br J Pharmacol*; 135: 257-265
83. Tanaka H., Shigenobu K., (2005). Pathophysiological significance of T-type Ca²⁺ channels: T-type Ca²⁺ channels and drug development, *J Pharmacol Sci.*, 99, 214-20.
84. Thayer SA., Usachev YM., Pottorf WJ., (2002). Modulating Ca²⁺ clearance from neurons, *Front Biosci.*, 7, 1255–1279,
85. Todorovic, SM, Pathirathna S, Meyenburg A, Jevtovic-Todorovic V. (2004) Mechanical and thermal anti-nociception in rats after systemic administration of verapamil. *Neurosci Lett* 360: 57-60.
86. Tominaga M., Caterina MJ., (2004). Thermosensation and pain, *J. Neurobiol.*, 61, 3-12.

87. Tominaga M., Wada M., Masu M., (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia, *Proc Natl Acad Sci.*, 98, 6951-6,
88. Tulunay F.C., Gulmez, E., Malhan S (2007). "Survey of Chronic Pain in Turkey" ISPOR Twelfth Annual International Meeting, *Value in Health*, 10(3), A171, Arlington, USA.
89. Turner H., Fleig A., Stokes A., Kinet JP., R. Penner R., (2003). Discrimination of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 (transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1) release channel activity, *Biochem. J.*, 371, 341–350.
90. Ueda H, Matsunaga S, Inoue M, Yamamoto Y, Hazato T. (2000) Complete inhibition of purinoceptor agonist-induced nociception by spinorphin, but not by morphine. *Peptides*. Aug;21(8):1215-21.
91. Vyklický L., Knotkova´-Urbancova´ H., (1996). Can sensory neurones in culture serve as a model of nociception? *Physiological Research*, 45, 1-9.
92. Wang ST, Chen S., Guo M., Liu XM., (2008). Inhibitory effect of cochinchinenin B on capsaicin-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons, *Brain Res.*, 1201, 34-40,
93. White TD (1988). Role of adenine compounds in autonomic neurotransmission. *Pharmacol Ther*, 38, 129-68.
94. Williams JA, Day M, Heavner JE (2008). Ziconotide: an update and review. *Expert Opin Pharmacother.*;9: 1575-83.
95. Wood JN., Abrahamsen B., Baker MD., Boorman JD., Donier E., Drew LJ.,

- Nassar MA., Okuse K., Seereeram A., Stirling CL., Zhao J., (2004). Ion channel activities implicated in pathological pain, *Novartis Found Symp.*, 261, 32-54.
96. Wood JN. (2007). Ion channels in analgesia research, *Handb Exp Pharmacol.*, 177, 329-58.
97. Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. (1992) Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*;355:75-78.
98. Xie W (2007). Ion channels in pain transmission, *Int Anesthesiol Clin*,45,107-20.
99. Xue M, Rosenmund C (2009). The headache of a hyperactive calcium channel, *Neuron*, 61, 653-4.
100. Yamamoto Y, Ono H, Ueda A, Shimamura M, Nishimura K, Hazato T. (2002). Spinorphin as an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes: roles in pain and inflammation. *Curr Protein Pept Sci*; 3: 587-99.
101. Yamazaki T, Honda M, Yamamoto Y, Hazato T, Ono H (2001). Effects of spinorphin and tynorphin on synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol*, 16; 413: 173-8.
1002. Zhang L., Barritt GJ (2004). Evidence that TRPM8 Is an androgen-dependent Ca^{2+} channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 64, 8365-8373.

8. ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Elazığ'da doğdum. İlk ve orta öğrenimi çeşitli illerde tamamladım. 1994 sonbahar döneminde Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Elektrik Mühendisliği bölümüne başladım. 1998 yılında mezun olduktan sonra 1999 yılında Üniversitemiz tıp fakültesi Biyofizik ana bilim yüksek lisansa başladım. Halen doktora öğrencisi olarak eğitimimi sürdürmekteyim.