

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI AĞRI MODELLERİNDE KONİİN'İN OLASI
ANTİNOİSEPTİF ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzman Biyolog Okan ARIHAN

**Farmakoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2008**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI AĞRI MODELLERİNDE KONİİN'İN OLASI
ANTİNOİSEPTİF ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzman Biyolog Okan ARIHAN

**Farmakoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Alper B. İSKİT**

**ANKARA
2008**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmakoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Rüştü Onur
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Danışman: Prof. Dr. Alper B. İskit
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye: Prof. Dr. Mustafa İlhan
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye: Prof. Dr. Serdar Uma
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye: Doç. Dr. Süreyya Barun
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında gösterdikleri yardım ve destek için Prof. Dr. Alper B. İskit'e, Prof. Dr. Mustafa İlhan'a, Prof. Dr. Rüştü Onur'a ve Dr. Mustafa Boz'a teşekkür ederim. Tezimle ilgili yorumları nedeniyle Dr. Mert Ertunç'a, yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini gördüğüm Prof. Dr. Hakan S. Orer'e ve Prof. Dr. M. Oğuz Güç'e teşekkür ederim. Farmakoloji Anabilim Dalındaki tüm değerli öğretim üyelerine, oluşturdukları olumlu iş ortamı nedeniyle tüm araştırma görevlisi ve teknisyen arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan eşime ve aileme içtenlikle teşekkür ederim.



Sokrates'in Ölümü. Jacques-Louis David, 1787; New York Metropolitan Sanat Müzesi

ÖZET

Arıhan O., Farklı Ağrı Modellerinde Koniinin Olası Antinosiseptif Özelliğinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2008. Baldıran otundan elde edilen bir alkaloid olan koniinin antinosiseptif etkileri araştırıldı. Literatürde, baldıran otu toksisitesinden sorumlu ana alkaloid koniinin antinosiseptif etkileri ile ilgili veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada koniinin olası antinosiseptif özellikleri farklı ağrı modelleri kullanılarak incelendi. Kullanılan termal ağrı modeli hotplate testinde ve kimyasal ağrı modeli kıvrınma testinde (writhing test) koniinin 20 mg/kg dozunda antinosiseptif etki gösterdiği bulundu. Koniin, hotplate testinde ayak çekme süresinin uzamasına neden oldu. Kıvrınma testinde ise koniinin kıvrınma sayılarını azalttığı gözlemlendi. Her iki veri koniinin ağrı algısını azalttığını göstermektedir. Analjezik etki olarak gözüken durumun herhangi bir biçimde lokomotor aktivitenin azalması ile ilişkili olmadığını ortaya koyabilmek için gerçekleştirilen rotarod testinde, kullanılan ajanların hiçbirisi lokomotor aktivitede bozulmaya neden olmadı. Bu durum, koniinin testlerde analjezi olarak değerlendirilen etkisinin beklendiği üzere analjeziden kaynaklandığını düşündürdü. Ayrıca koniinin morfinin analjezik etkisini potansiyalize ettiği gösterildi. Bu etkilerin mekamilamin (1 mg/kg) ile geri dönmesi antinosiseptif etkinin nikotinik reseptörler üzerinden gerçekleştiğini düşündürmektedir. Eldeki bulgular doğrultusunda Sokrates'in ölümü ile ilgili farmakolojik bir değerlendirme de ortaya konuldu.

Anahtar kelimeler: Koniin, baldıran otu, antinosiseptif, kıvrınma testi, hotplate.

ABSTRACT

Arihan O., Possible Antinociceptive Effects of Coniine in Different Nociception Models, Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Master of Science Thesis, Ankara 2008.

Antinociceptive effect of coniine is investigated. There has been no record about the antinociceptive effect of coniine which is the major alkaloid compound responsible from the toxicity of hemlock. Possible antinociceptive effects of coniine has been studied in different nociception models. Antinociceptive effect has been found at 20 mg/kg dose in hotplate test which is the thermal pain model and in writhing test which is the chemical pain model. Coniine caused a prolongation in hind leg retraction time in hotplate test. It was observed that coniine decreased the number of writhes in writhing test. Both data indicated an antinociceptive effect of coniine. A rotarod test was also conducted in order to clarify, whether this activity is related with a loss of locomotion. None of the chemical agents used in experiments caused a loss of locomotor activity. This result implies that activities observed in nociceptive tests are actually linked with analgesia. It was also shown that antinociceptive effect of morphine was potentialized by coniine. Those effects were inhibited by mecamilamine (1 mg/kg) and thus result implies that antinociceptive effects are via the nicotinic receptors. A pharmacological assessment about the death of Socrates has been presented by using our pharmacological data.

Keywords: Coniine, hemlock, antinociceptive, writhing test, hotplate test.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Baldıran Otu ve Koniin	2
2.2 Farmakolojik Açıdan Koniin ve Baldıran Otu	6
2.3. Sokrates'in Ölümü	9
2.4. Ağrı Algısı ve Kolinerjik Sistem	13
2.5. Nikotinik Asetilkolin Reseptörlerinin Ağrı Algısındaki Roller	14
2.6. Hipotez	16
2.7. Amaç	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1 Hayvanlar	18
3.2 Etik Kurul İzni	18
3.3. Kullanılan Deneysel Modeller	18
3.3.1 Kimyasal Ağrı Modeli – Kıvrınma Testi (Writhing Test)	18
3.3.2 Termal Ağrı Modeli – Hotplate (sıcak levha) Testi	19
3.4 İlaç Uygulama ve Değerlendirme	19
3.5 Mekamilamin Uygulaması	20
3.6 Toksosite	20
3.7 Verilerin Analizi	20

3.8	Kullanılan İlaçlar	21
4.	BULGULAR	22
4.1	Kıvrınma Testinde Antinosiseptif Etkinin Değerlendirilmesi	22
4.1.1	Koniinin Kıvrınma Testindeki Antinosiseptif Etkileri	22
4.1.2	Morfinin Kıvrınma Testindeki Antinosiseptif Etkileri	23
4.1.3	Morfin Varlığında Koniinin Kıvrınma Testindeki Antinosiseptif Etkileri	23
4.1.4	Mekamilamin Varlığında Koniinin Kıvrınma Testindeki Antinosiseptif Etkileri	25
4.2	Hotplate Testindeki Antinosiseptif Değerlendirme:	26
4.2.1	Koniinin Hotplate Testindeki Antinosiseptif Etkileri	26
4.2.2	Morfinin Hotplate Testindeki Antinosiseptif Etkileri	28
4.2.3	Morfin Varlığında Koniinin Hotplate Testindeki Antinosiseptif Etkileri	30
4.2.4	Mekamilamin Varlığında Koniinin Hotplate Testindeki Antinosiseptif Etkileri	31
4.3	Rotarod Testinde Lokomotor Aktivitenin Değerlendirilmesi	32
4.4	Kullanılan Kimyasal Ajanların Toksisitesi	33
5.	TARTIŞMA	34
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	38
	KAYNAKLAR	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

nAChR	Nöronal nikotinik asetilkolin reseptörleri
mAChR	Muskarinik asetilkolin reseptörleri
ACh	Asetilkolin
DMPP	Dimetilfenil piperazinyum
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
g	Gram
°	Derece
C	Celsius
s	Saniye
dak	Dakika

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1 Baldıran otu. <i>Conium maculatum</i> L.	3
2.2 <i>C. maculatum</i> çiçek durumu	3
2.3 <i>C. maculatum</i> gövde benekleri (macula)	3
2.4 <i>C. maculatum</i> 'da saptanan alkaloidler	5
2.5 “Sokrates’in ölümü” adıyla bilinen Totenmahl rölyefi	10
2.6 nAChRlerinin α altbirimleri, ligand bağlanma bölgeleri ve ekstraselüler-transmembranal kısımları	15
2.7 Sinir sisteminin santral ve periferik kısımlarına ait nAChR tipleri.	15
4.1 Koniinin kıvranma testindeki antinosiseptif etkisi	22
4.2 Morfinin kıvranma testindeki antinosiseptif etkisi	23
4.3 Koniinin morfin varlığında kıvranma testindeki antinosiseptif etkisi	24
4.4 Mekamilamin varlığında koniinin kıvranma testindeki antinosiseptif etkisi	25
4.5 Koniinin hotplate testindeki antinosiseptif etkisi	26
4.6 Koniinin hotplate testindeki zamana göre antinosiseptif etkisi	27
4.7 Morfinin hotplate testindeki antinosiseptif etkisi	28
4.8 Morfinin hotplate testindeki zamana göre antinosiseptif etkisi	29
4.9 Morfin varlığında Koniinin hotplate testindeki antinosiseptif etkisi	30
4.10 Mekamilamin varlığında koniinin hotplate testindeki antinosiseptif etkisi	31
4.12 Rotarod testinde farklı ajanların lokomotor aktiviteye etkilerinin değerlendirilmesi	32

TABLÖLAR**Sayfa**

2.1. Taze <i>Conium maculatum</i> 'un bazı hayvan türlerindeki oral akut letal dozları	7
2.2. Koniin'in farklı hayvanlardaki tek oral dozunun akut etkileri	7
2.3. Farklı hayvan türlerinin fetüslerinin <i>Conium maculatum</i> 'un teratojenik etkilerine hassas oldukları hamilelik dönemleri	9

GİRİŞ

İzolasyonu ve sentezi yapılan alkaloidler arasında ilk sıralarda gelen koniinin ile ilgili farmakolojik çalışmalar yaklaşık yüzyıl öncesinde başlamış ve bu çalışmalar sonucunda koniinin depolarizan bir gangliyon blokörü olduğu ortaya konulmuştur.

Koniinin nikotinik reseptörler üzerinden yaptığı anlaşılan etkileri santral ve periferik olmak üzere iki yönlüdür. Periferik sinir sisteminde çizgili kasları felç edici özelliğinin bulunması ve solunum kaslarının felci ile ölüme neden olduğunun anlaşılmasıyla tıbbi olarak kullanımından vazgeçilmiştir. Bunun sonucunda koniinin üzerindeki araştırmalar daha çok toksikolojik alanlara yönelmiş ve analjezi gibi diğer inceleme başlıklarındaki etkileri üzerinde de bugüne kadar herhangi bir veri elde edilememiştir.

Kolinerjik sistemin ağrı algısı üzerinde etkili olduğu, pek çok araştırma ile ortaya konulmuştur. Eldeki veriler opiyatlarla kolinomimetikler arasında bir sinerjizmin bulunduğuna işaret etmektedir. Koniinin gerek ağrı algısı gerekse diğer fizyolojik mekanizmalar ile etkileşimleri hakkında daha detaylı bilgilerin edinilmesi gelecekte nikotinik reseptörlerin alttiplerine yönelik spesifik antinosiseptif maddelerin geliştirilmesinde yol gösterici olabilir. Bu alanda gerçekleştirilecek yeni bulgular kolinomimetiklerin analjezide kullanımı konusunda yeni açılımlara imkan tanıyabilir.

Fizyolojik ve farmakolojik açıdan öneminin yanı sıra koniinin morfin ile birlikte antinosiseptif etki yönünden değerlendirilmesi antik dönemde yaşanmış ve toksikolojik yönü olan Sokrates'in Baldıran otu (*Conium maculatum* L.) ile idamı hakkında bilgi vermesi açısından da aydınlatıcı olabilir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Baldıran otu ve Koniin

Baldıran otu (*Conium maculatum* L.) maydanoz benzeri parçalı yapraklara sahip, beyaz çiçekli ve 120-180 cm civarlarında boya ulaşabilen, Maydanozgiller (Umbelliferae) ailesinden bir bitkidir. Bilinen en toksik bitkiler arasındadır (53). Avrupa ve Asya'da doğal olarak yayılış gösterir. Diğer kıtalara süs bitkisi olarak götürülmüştür (23). Ülkemizde doğal olarak yetişen baldıran otuna her bölgede rastlamak mümkündür (19). "Baldıran otu", bazı yörelerde "Ağu otu" ve "Yılan otu" adlarıyla da bilinmektedir (7). Baldıran otunun diğer bazı zehirli bitkilerle karıştırılma ihtimali bulunmakla birlikte fare idrarına benzeyen kuvvetli kokusu ve diğer botanik özellikleri ile onlardan ayrılmaktadır. Büyükbaş hayvanlar genel olarak kuvvetli kokusu ve acı tadı nedeniyle baldıran otunu yememekte ancak hayvancılıkta silaj hazırlamada yanlışlıkla yem bitkilerinin arasına baldıran otunun karıştığı gözlenmektedir (12). Nitrojen içeriği yüksek topraklarda daha çok gözlenen baldıran otu, bu özelliği nedeniyle nitrofilik bir bitki olarak sınıflandırılmaktadır. Çayırılık alanlarda hayvancılık için bir tehdit oluşturabilecek hızla yayılabildiğinden tarımda yabancı ot olarak adlandırılır (53).

Bitkinin adı gerek sahip olduğu botanik özelliklere gerekse insanlarda meydana getirdiği toksik etkilere işaret etmektedir. Bitkinin cins adı olan Conium, Antik Yunan'ca "Konas" kelimesinden gelmektedir ve bitkinin tüketilmesinden sonra ortaya çıkan kendi etrafında dönmek, ataksi, tremor ve konvülsiyon durumlarını ifade etmektedir. Bu bitkinin zehirli olduğu ve bu bitkinin ekstresinin ölüm cezalarında kullanıldığı antik Yunanca metinlerde de geçmektedir (4). Bitkinin tür adını belirten "maculatum" ifadesi ise bitkinin üzerindeki beneklere işaret eder ve baldıran otunun, maydanozgiller ailesindeki diğer benzer bitkilerden ayrılmasında ayırt edici bir özelliktir (6) (bkz. Şekil 2.3).



Şekil 2.1 Baldıran otu *Conium maculatum* L.



Şekil 2.2 *C. maculatum* çiçek durumu

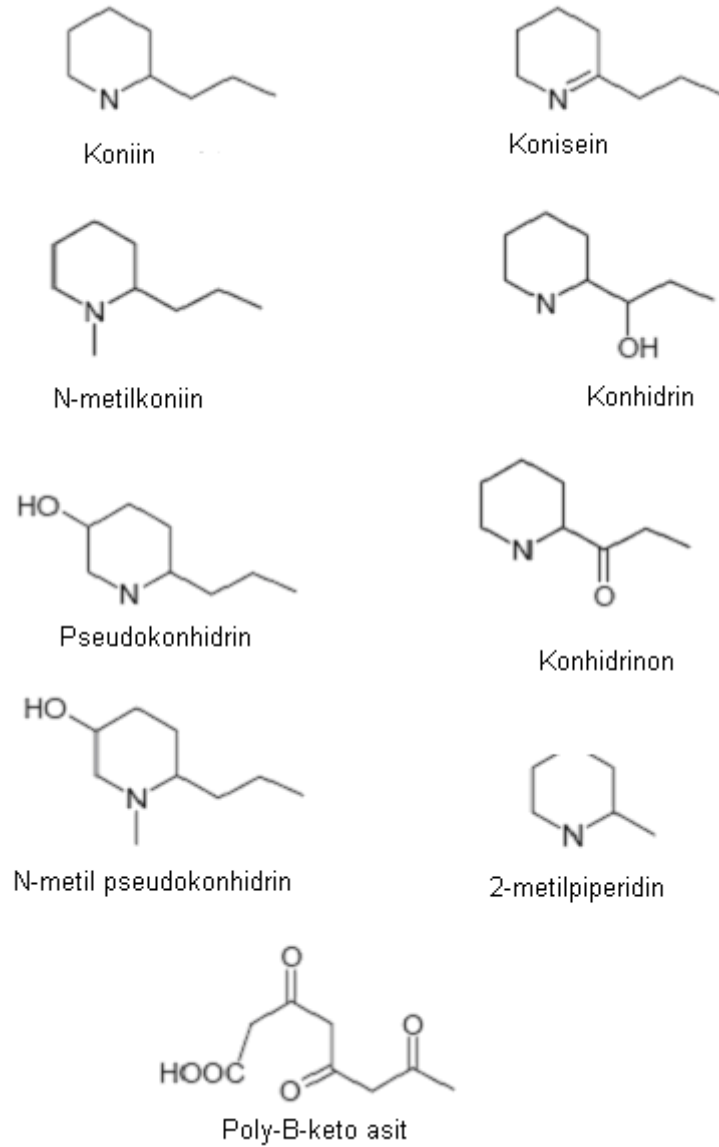


Şekil 2.3 *C. maculatum* gövde benekleri (macula)

Baldıran otunun toksik etkisinden sorumlu en önemli alkaloid olan koniin, bitkinin tümünde bulunmakla birlikte miktarı, bitkinin organlarına ve mevsimlere göre değişiklikler göstermektedir. Genel olarak mevsimin ilerleyen dönemlerinde bitkinin farklı dokularındaki koniin miktarı artmaktadır (44). Bitkinin farklı organlarında da koniin içeriği değişim göstermekte ve koniin açısından sıralama, açılmamış tohum > dal > yaprak >> kök şeklinde gözlenmektedir (53).

Baldıran otunun (*Conium maculatum* L.) toksisitesinden sorumlu olan koniin, izolasyonu yapılan, özellikleri araştırılan ilk alkaloidlerden biridir (25). Koniin hakkında yapılan araştırmalar 100 yıl öncesine kadar uzanmaktadır ve konu ile ilgili ilk yayın 1898 yılında yayınlanmıştır. (41).

Koniin ve γ -konisein, baldıran otundaki diğer sekiz alkaloid arasında en yüksek oranda bulunanlardır. Koniin bu alkaloidler arasında en toksik olanıdır. Tümü piperidin alkaloidlerinden oluşan bu bileşikler farklı bitki ailelerinde de bulunmakta ancak baldıran otunun içinde bulunduğu bitki ailesinde (Umbelliferae-Maydanozgiller) nadir olarak rastlanmaktadır. Baldıran otunda bulunan piperidin alkaloidleri dört asetat biriminden köken alan sekiz karbonlu zincirin halka oluşturması sonucunda ortaya çıkmakta, halkaya sürecin bir aşamasında nitrojen eklenmektedir. Bu bileşiklerin biyokimyasal sentez yolları henüz tam olarak aydınlatılamadığından bu konudaki araştırmalar halen devam etmektedir (47). Baldıran otunda bulunan alkaloidler şekil 2.4’de gösterilmiştir (37).



Şekil 2.4 *Conium maculatum*'da saptanan alkaloidler

19. yüzyıl başlarında organik kimya biliminin izolasyon ve sentez konusunda gösterdiği gelişime paralel olarak alkaloidler de çalışılmış ve bunun sonucunda koniin, morfin ile birlikte izolasyonu ve sentezi yapılan ilk alkaloidler arasında yer almıştır. Koniin'in erken izolasyonu, farmakolojik araştırmalar başta olmak üzere bu alkaloid hakkındaki çok çeşitli çalışmaların artmasına neden olmuştur.

2.2 Farmakolojik ve Toksikolojik Açıdan Koniin

Farmakolojik açıdan koniinin özellikle gangliyoner aşırım üzerinde etkili olduğu, nikotine benzer biçimde öncelikle gangliyoner aşırımı artırdığı ancak daha yüksek dozlarda bloke edici bir özellik gösterdiği ortaya konulmuştur (10). Nöromüsküler kavşakta kürar benzeri etki yapması nedeniyle kürara alternatif olarak da düşünülmüş ancak toksisitesi nedeniyle modern tedavide kullanım alanı bulamamıştır (28). İngiliz Farmakopesinde 1934 yılına kadar baldıran otu tohumları antispazmodik, sedatif ve antinosiseptif etkiye sahip droglar arasında listelenmiştir (47). Günümüzde artık sadece homeopatik listelerde yer almakla birlikte modern tıpta kabul edilmiş bir kullanımı bulunmamaktadır (56). Koniinin etki mekanizması ile ilgili çalışmalar daha sonraki yıllarda da devam etmiş ve depolarizasyon sonrasında gangliyoner aşırımı inhibe etmesinin yanı sıra bu aşırımı doğrudan bloke ettiği de gösterilmiştir. Bu çalışmalarda koniinin süperior servikal gangliyon ve nöromüsküler kavşakta iletimi bloke ettiği, ancak bloke edici etkisi ortaya çıkmadan önce stimülasyon yaptığı gözlenmiştir (48). Farmakoloji kitaplarında koniin, nikotin gibi gangliyon stimüle edici maddeler arasında yer almaktadır. Koniinle ilgili yakın zamanda yapılmış olan *in vitro* çalışmalarda farklı dokulardaki nikotinik reseptörler üzerindeki etkileri araştırılmış olmakla (22) birlikte diğer sistemlerle etkileşimi konusunda (adrenerjik, nitrerjik, vd.) fazla bilgi bulunmamaktadır. Koniinin toksikolojik açıdan incelendiği çalışmalar mevcuttur (bkz. Tablo 2.1, 2.2, 2.3).

Koniinin günümüzde yaygın olarak tıbbi amaçlı kullanımına engel olan toksik etkileri sadece insanlar üzerinde değil diğer canlılar üzerinde de gösterilmiştir. Baldıran bitkisinin koniini temelde omurgalı ve omurgasız otçullara karşı bir savunma aracı olarak sentezlediği düşünülmektedir. Omurgasız otçullara (herbivorlara) karşı tarımda kullanılan pek çok kimyasal da koniine benzer biçimde kolinerjik sistem üzerinden etkilerini gösterdiklerinden böceklerin nikotinik reseptörlerine spesifik neonikotinoidlerin bulunmasına yönelik pek çok araştırma devam etmektedir (52). Koniin, omurgasız otçulların (herbivorların) yanı sıra memeliler ve kuş

türleri üzerinde de toksik etkiler göstermektedir. Farklı canlı türlerinde koniinin letal dozları Tablo 2.1’de gösterilmiştir (33)

Tablo 2.1. Taze *Conium maculatum*’un bazı hayvan türlerindeki oral akut letal dozları.

Hayvan türü	Letal Dozu (g/kg)	Alkaloid içeriği (%)
Domuz	8.0	0.023
Sığır	5.3	0.40
Koyun	10.0	0.40

Kuşların memelilere göre koniinden daha az etkilenmelerinin nedeninin memelilere göre farklı nikotinik reseptör alttiplerine sahip olmalarından kaynaklanabileceği iddia edilmiştir (46). Dokularında koniine rastlanan ancak zehirlenme belirtileri göstermeyen kuşların insanlar tarafından yenilmeleri durumunda bu canlıları tüketen insanlarda zehirlenme tablolarının ortaya çıktığı kaydedilmiştir (46). Farklı memeli ve kuş türlerinin farklı koniinin dozlarında gösterdikleri semptomların dereceleri Tablo 2.2’de yer almaktadır.

Tablo 2.2. Koniinin farklı hayvanlardaki tek oral dozunun akut etkileri

Hayvan türü	Doz (mg/kg)	Semptomların derecesi
Sığır ^a	3.3	aşırı (32)
At ^a	15.3	aşırı (32)
Koyun ^a	44.0	orta (32)
Bıldırcın ^b	25.0	aşırı (23)
Piliç ^b	50.0	aşırı (23)
Hindi piliç ^b	100.0	aşırı (23)

^a Erişkin hayvanlar (maksimum letal olmayan dozlar) (33)

^b Üç-altı haftalık hayvanlar (bazı bireyler için letal) (23)

Ülkemizde bitkilerin neden olduğu zehirlenmeler içinde %6 ile en sık görülen üçüncü zehirlenme olan baldıran otu zehirlenmesi bu konunun sadece tarihsel bir olayla sınırlı kalmadığını ve güncelliğini devam ettirdiğini göstermektedir (43). Baldıran otunun yenilen bitkilerle yanlışlıkla karıştırılmasıyla (8) ya da özellikle çocuklar tarafından kabukları soyularak gövdesinin yenilmesi sonucunda, çoğunlukla kırsal kesimlerde olmak üzere zehirlenmeler görülebilmektedir (5). Gerek tıbbi gerekse deneysel amaçlarla kullanım olanaklarındaki kısıtlılık, bunun yanı sıra hayvancılıkta neden olduğu sorunlar sebebiyle literatürde koninin ile ilgili yakın zamanda yapılmış çalışmaların daha çok büyükbaş hayvanlarda ve kümes hayvanlarında ortaya çıkan teratojenik etkiler ve mekanizmalar üzerine odaklandığı görülmektedir (38).

Hayvanlar tarafından tüketilen baldıran otunun, düşük ile sonuçlanmadığı durumlarda teratojenik etkileri ortaya çıkmaktadır. Teratojenik etkiler arasında kalıcı eklem fleksürü ve ya kontraktürü ile seyreden artrogripozis gözlenmektedir. Gözlenen bu teratojenik etkinin konininin nikotinik reseptörler üzerinden gerçekleştirdiği bir mekanizma ile ortaya çıktığı düşünülmüş ancak gerek periferik nikotinik reseptör antagonisti d-tübokürarin gerekse santral nikotinik reseptör antagonisti trimetafan kamsilatın konininin teratojenik etkilerini önleyememesi nedeniyle bu iddia doğrulanamamıştır (37). Koninin teratojenik etkilerinin mekanizması tam olarak aydınlatılamadığından bu konu ile ilgili daha fazla araştırılmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Koninin teratojenik etkileri ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalara Tablo 2.3.'te değinilmiştir.

Tablo 2.3. Farklı hayvan türlerinin fetüslerinin *Conium maculatum*'un teratojenik etkilerine hassas oldukları hamilelik dönemleri

Hayvan türü	Hamilelikte koniine Maruz kalınan dönem	Lezyonlar
Sığır (283) ^a	55-75	artrogripozis (32)
	42-70	palatoşizis (24)
Domuz (115) ^a	30-45	palatoşizis (44)
	43-53	artrogripozis (44)
Keçi (150) ^a	30-60	artrogripozis (44)
Koyun (147) ^a	30-60	artrogripozis (24)

^a Toplam hamilelik süresi

2.3. Sokrates'in Ölümü

Koniinin bir zehir olarak bu kadar bilinmesinde Sokrates'in baldıran otu içirilerek idam edilmesinin büyük rolü bulunmaktadır. Hz. İsa'nınkinden sonra en iyi bilinen ve her aşaması kayıtlara geçmiş olan bu idam nedeniyle baldıran otu o günden günümüze her dönemde hatırlanmış ve bu durum baldıran otunun ana etken maddesi olan koniinin 19. yüzyıl başlarında izole edildikten sonra da farmakolojik olarak ilk araştırılan alkaloidler arasında yer almasına yol açmıştır.



Şekil 2.5. Sokrates'in ölümü adıyla bilinen Totenmahl rölyefi (51).

Felsefenin kurucularının başında sayılan Sokrates, Atina'lı yöneticiler tarafından Atina tanrılarını tanımamak ve gençleri sisteme karşı ayartmak suçlarından dolayı ölümle cezalandırılmıştır. Sokrates'in son anları öğrencisi Platon ve Xenophon tarafından kaydedilmiştir. Sokrates kendisine sunulan ve içinde baldıran otu ekstresinin bulunduğu bir karışımı içmiştir. Bu karışım içinde baldıran otunun yanı sıra haşhaş ekstresinin de bulunduğu bazı antik yazarlar tarafından iddia edilmiştir (9).

Platon tarafından Sokrates'in zehiri içmesinden öldüğü ana kadar geçenler şu şekilde aktarılmaktadır:

“Sokrates’e zehir getiren görevliye soran Sokrates şöyle dedi: “Sen, dostum, bu konularda tecrübelisin, ne yapmam gerektiğini söyle bana.”

Adam şöyle cevap verdi: “Yapman gereken tek şey zehiri içmek, ayaklarına bir ağırlık çökene kadar yürümek, sonra da yere uzanmak, zehir bundan sonra etkisini gösterecektir.” Görevli bunları söyledikten sonra Sokrates şöyle dedi: “Tanrıların şerefine bu kaptan bir miktar şarabın yere dökülmesine ne dersin? Bunu yapabilir miyim, yapamaz mıyım?”

Adam şöyle cevap verdi: “Biz onu sadece yeterli olacak miktarda hazırlıyoruz Sokrates.” Sokrates bunun üzerine : “Anlıyorum,” dedi ve zehiri bir dikişte içip bitirdi.

Sokrates odanın içinde yürümeye başladı ve bacaklarının ağırlaşmaya başladığını söyleyince, ona zehiri veren adamın tavsiyelerine uygun olarak yatağa sırtüstü uzandı. Sonra adam onun ayaklarına ve bacaklarına baktı, bir süre sonra ayağına sıkıca bastırdı ve ona hissedip hissetmediğini sordu. Sokrates’ten hayır yanıtını aldıktan sonra, önce bacağına, sonra daha yukarılara aynı şeyi yaptı ve bize onun soğuyup katılaşmakta olduğunu gösterdi. Sonra bunları kendisi de hissetti ve zehir kalbe ulaştığında, bunun onun sonu olacağını söyledi.

Sokrates daha önceden örttüğü yüzünü açtığı zaman soğukluk kasık bölgesine kadar ilerlemişti. “Krito” dedi, Asklepios’a bir horoz borcum var, öder misin?” bu onun son sözleri olmuştu. “borç ödenecektir, başka bir şey var mı?” bu soruya cevap gelmedi, fakat birkaç dakika içinde bir hareket duyuldu. Görevli, onun yüzünü açtı, gözleri sabitleşmişti. Krito gözlerini ve ağzını kapadı (31).

Platon tarafından aktarılan bu tarihsel kaydın farmakoloji, botanik ve dilbilim açısından modern bir değerlendirmesi antik metnin gerçek bir gözleme oldukça yakın olduğunu düşündürmektedir. Metinde aktarılan, zehirlenme ile ilgili gözlenen belirtiler temelde sinir sistemi ile ilgili bir zehirlenmeyi yansıtmaktadır. Yazılanlarla paralel biçimde insanlarda baldıran otu zehirlenmesi alt ekstremitelerde başlayan bir motor fonksiyon kaybı, daha sonrasında üst ekstremitelerde devam eden güçsüzlük, ataksi ve tremor ile devam eder. Sokrates’in ölümünde gözleendiği gibi, tüm bu süreçler boyunca bilinç açıktır. Ölüm nedeni solunum kaslarının felç olması ve bunun sonucunda gelişen asfiksidir. Platon’a ait Antik Yunanca metnin günümüz araştırmacıları tarafından yapılan dilbilimsel incelemeleri sonucunda yazılan

“soğuyup katılaşma” ifadesinin bir “soğuma” olmadığı ve o dönemdeki ifadenin daha çok bir “kuvvet kaybı”nı işaret ettiği iddia edilmektedir (9). Bu bilgiler ışığında sıkıca bastırarak ağrı hissinin kaybını tespit eden görevli daha sonrasına kasların felç olmaya başladıklarını da (nöromüsküler blok) tespit etmiştir. Sokrates’in ölümünden hemen önce yaptığı son hareket ise solunum kaslarının felcine bağlı son bir ölüm kasılması olarak değerlendirilmektedir. Asfiksiye bağlı bir tepkinin beklenenden daha az olmasının, zehirin solunum kaslarını etkileyene kadar diğer kasların kasılma gücünü büyük ölçüde kaybetmiş olmasıyla ilişkili olabileceği kabul edilmektedir (9).

Yukarıda anlatıldığı gibi Sokrates, son anına kadar hissettiklerini yanındakilere not ettirmiştir. Bahsedilen zehirlenme ve ölüm tablosu, koniinin gerçekleştirmesi beklenen biçimine benzemekle birlikte bu zehirlenmenin bir ağrı hissi yaşanmadan gerçekleştirilmesi iki düşüncüyü akla getirmektedir: Koniinin analjezik etkinliği ve karışıma eklenen bir başka maddenin güçlü bir analjezik etki taşıması. Her ne kadar idama mahkum edilmiş olsa da Atina’nın bu etkili kişinin idamında, karışıma öldürücü baldıran otunun yanı sıra dönemin bilinen en güçlü analjezik maddesi olan haşhaş ekstresinin (*Papaver somniferum*) eklenmiş olması akla gelmektedir. Antik dönemin bazı yazarları tarafından da bu iddianın öne sürüldüğü bilinmektedir. Ancak bu değerlendirme yapılırken unutulmaması gereken önemli bir nokta da koniinin analjezik etkisinin olup olmadığının bu çalışmaya kadar bilinmemesidir.

2.4 Ağrı Algısı ve Kolinerjik Sistem

Analjezide kolinerjik sistemin etkinliği ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Kolinerjik reseptör agonistleri ve asetilkolin esterase inhibitörlerinden oluşan kolinomimetiklerin insanlarda ve diğer hayvan türlerinde ağrı sinyallerinin iletimini önlemede etkili oldukları bulunmuştur. Kolinomimetiklerin bu etkileri farklı prelinik ve klinik ağrı modellerinde denenmiş ve geniş bir terapötik potansiyelin varlığı ortaya konmuştur (17).

Asetilkolinesterazların analjezideki rollerinin araştırılmasını hedefleyen çalışmalarda intraplantar kapsaisin, soğuk, cerrahi sonrası ısı, streptozotoksin ile indüklenen diyabetik ağrı modellerinde neostigminin antinösetif etkileri incelenmiştir (11, 14, 21, 29, 35).

Muskarinik asetilkolin reseptörlerinin analjezideki etkileri kuyruk-çekme (tail-flick) ve cerrahi sonrası ağrı modellerinde betanekol (45), kuyruk çekme, hotplate, asetik asitle kıvrınma modellerinde oksotremorin'le (26, 49) ve orofasiyel ağrı modelinde arekaidin'le incelenmiştir (20)

Analjezide nikotinik asetilkolin reseptörlerinin etkileri formalinle oluşturulan kıvrınma, hot-plate, cold-plate testlerinde ABT-594 (1, 16), kuyruk çekme, hot-plate, intrakapsüler karagenan uygulamasında Epibatidin/analogları (13, 36, 42) ve kuyruk çekme, cerrahi sonrası ağrı modellerinde DMPP kullanılarak araştırılmıştır (45).

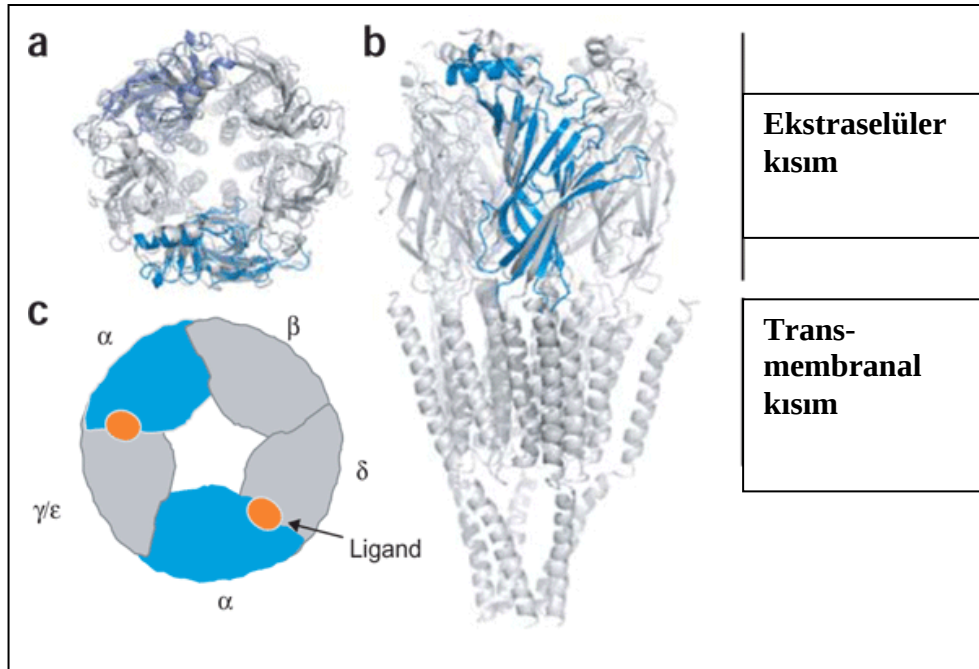
Kolinomimetiklerin analjezi oluşturma mekanizmaları ile ilgili temel etki yerinin omurilik olduğu genel kabul görmektedir. Bu bölgede kolinomimetiklerin oluşturduğu analjezinin test edilmesi amacıyla gerçekleştirilen deneylerde intratekal kolinerjik ajanların enjeksiyonu yapılmış ve spinal kolinerjik sinirlerin asetilkolin salıvermesi durumu taklit edilerek analjezi olduğu gösterilmiştir. Canlıda ağrı algısı oluşturan uyarının

omurilikte ACh miktarını artırdığı bulunmuştur. Bu tür bir uyarandan kaynaklanan asetilkolin saliverilmesindeki artışın sadece omurilik ile sınırlı kalmadığı, anestezi altında ağırlı uyarın verilen koyunun serebrospinal sıvısında da ACh miktarının arttığı kaydedilmiştir (21).

Ağırlı bir uyarın sonucunda inhibitör desendant noradrenerjik ve serotonerjik ağrı modölatör yolakları, dorsal boynuzdaki kolinerjik internöronları uyarır. Bu uyarı sonucunda bu internöronlardan ACh saliverilir. ACh'ın analjezik etkiyi ortaya çıkarmada spinal muskarinik ve nikotinik reseptörleri aktive ettiğı gösterilmiştir. Analjezik etkilerin daha çok nikotinik yolak üzerinde olduğuna dair görüşler olmakla birlikte, omurilikteki muskarinik reseptörlerin aktivasyonunun da inhibitör nörotransmitterlerde artışa ve eksitatör nörotransmitterlerde azalışa neden olarak antinosiseptif etkilerin bir kısmını ortaya çıkardığına dair pek çok veri bulunmaktadır (54). Nikotinin analjezik etkilerinin opioidderjik nöronların aktivasyonu ile ilişkili olduğü gösterilmiştir. Eldeki veriler nikotinin omurilikteki opioidderjik nöronları aktive ettiğine ve bu nöronlardan saliverilen Met-Enkefalin ile analjezik etkilerin ortaya çıktığına işaret etmektedir (34).

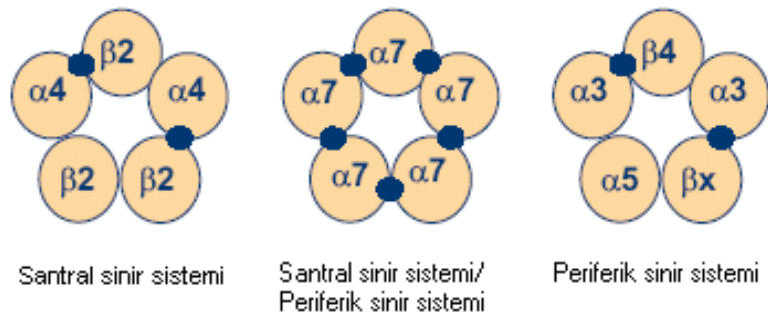
2.5. Nikotinik Asetilkolin Reseptörlerinin Ağrı Algısındaki Rollerı

Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR) bir ya da birden fazla altbirimden oluşın (α , β , δ , ϵ , γ) pentamerik ligand-bağılı iyon kanalları ailesini temsil eder. Bu reseptörler merkezi sinir sisteminde (MSS) ve periferik sinir sisteminde yaygın olarak dağılım gösterirler. MSS'de baskın olan nAChR'leri, homomerik $\alpha 7$ reseptörleri ve heteromerik $\alpha 4/\beta 2$ reseptörlerinden oluşur. α -bungarotoksine duyarlı olup olmamalarına göre farmakolojik ayrımları yapılabilmektedir (30).



Şekil 2.6. nAChRlerinin α altbirimleri, ligand bağlama bölgeleri ve ekstraselüler-transmembranal kısımları

Nöronal nikotinik asetilkolin reseptörleri olarak adlandırılan bu reseptörler, asetilkolinin sinaptik aşırımıyla içe yönelik Na^+ ve Ca^{2+} akımlarına neden olmaktadır. Bunun sonucunda çok geniş bir çeşitlilik gösteren sinapslarda glutamerjik, GABAerjik ve monoaminerjik yollarda etkili olurlar (30).



Şekil 2.7 Sinir sisteminin santral ve periferik kısımlarına ait nAChR tipleri. Koyu noktalar agonist bağlama noktalarını temsil etmektedir.

Yakın zamanda sayıları artan moleküler çalışmalar sayesinde nikotinik reseptörler üzerinde daha detaylı bilgiler edinilmektedir. Nikotinik reseptörleri oluşturan proteinlerin ekspresyonundan sorumlu genleri silinen farelerin sıcak levha (hot-plate) ve kuyruk-çekme (tail-flick) testlerinde nikotinin oluşturduğu antinosiseptif etkide beklenenden daha düşük bir analjezi yanıtı gösterdikleri kaydedilmiştir (40). Moleküler çalışmaların yanı sıra eldeki mevcut farmakolojik veriler de nöronal nikotinik reseptörlerin antinosiseptif etkinin ortaya çıkmasındaki rollerini destekleyici niteliktedir (15). Nikotinin antinosiseptif etkilerinin uzun bir süredir bilinmesine karşın Ekvator zehirli kurbağası *Epipedobates tricolor*'un derisinden elde edilen doğal bir alkaloid olan epibatidin'in potent bir analjezik olduğunun bulunması, bu etkisinin nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin tarafından bloke edilmesi ve böylece mekanizmasının aydınlatılmasıyla ağrı tedavisinde yeni bir potansiyel ortaya çıkmıştır (30). Epibatidin analoglarının geliştirilmesi için gerçekleştirilen araştırmalar sonucunda nöronal nikotinik reseptör agonistleri arasında günümüze kadar en iyi karakterize edilmiş madde olan ABT-594'ün sentezlenmesi sağlanmıştır (18). Nikotinik reseptörlere etki eden maddelere yönelik araştırmaların, analjezi konusunda spesifik etki gösteren yeni bileşiklerin bulunmasına yol açması olasılığı bu konunun yakın gelecekte de ilgi çeken bir araştırma sahası olacağına işaret etmektedir.

2.6.Hipotez:

“Koniin nikotinik reseptörler aracılığıyla antinosiseptif etki gösterir. Ayrıca koniin, morfinin antinosiseptif etkilerini nikotinik reseptörler aracılığıyla potansiyalize eder.”

2.7. Amaç:

Bu çalışmanın temel amacı ağrı algısı üzerine etkisi hakkında bilgi bulunmayan koniinin olası antinosiseptif etkilerinin araştırılmasıdır. Böyle bir etkinin varlığı durumunda koniinin bu etkiyi nikotinik reseptörler üzerinden gerçekleştirip gerçekleştirmeyeceği incelenecek ve antinosiseptif mekanizması ile ilgili bilgi edinilmeye çalışılacaktır. Ayrıca koniinin opioid analjezikler ile olası sinerjistik etkisinin olup olmadığı bir diğer araştırma konusudur.

Bu hipotez ve amacın tarihsel bir olaya açıklık getirmesi beklenmektedir. Sokrates'in baldıran otu içeren bir karışım içerek ölüme mahkum edildiği bilinmektedir. Bu ölüm sırasında gözlenmesi beklenen, ekstremitelerde kas zayıflığı ile başlayan, daha sonra üst ekstremitelerde motor kayıp, duyu kaybı ve solunum kaslarının felci sonucunda solunumun durmasıyla gerçekleşen ölüm tablosu tarihsel kayıtlarda aktarılmaktadır. Ancak bu zehirlenme tablosunun oldukça ağrısız geçmiş olması Sokrates'e iştirilen karışımın içinde dönemin bilinen en güçlü analjezik maddesi olan haşhaş ekstresinin eklenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu değerlendirme yapılırken unutulmaması gereken önemli bir nokta da koniinin analjezik etkisinin olup olmadığının halen günümüzde dahi bilinmemesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvanlar

Bu çalışmada 25-35 gr ağırlığında Swiss-Albino erkek fareler kullanıldı. Deneylerde kullanılan fareler Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları biriminden temin edildi. İlaç uygulanan farelere deneylerden sonra ikinci kez ilaç tatbik edilmedi ve fareler H.Ü.T.F. Farmakoloji Anabilim Dalı Hayvan Barınağında yaşatılmaya devam edildi.

3.2. Etik Kurul İzni:

Bu çalışma için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 14. 02. 2008 tarihli izinle onay alındı (Karar No: 2008/12-5).

3.3. Kullanılan deneysel modeller

3.3.1. Kimyasal Ağrı Modeli-Kıvrınma Testi (*Writhing test*)

Kimyasal ağrı modelinde antinoseptif etkiyi değerlendirmek için “Kıvrınma Testi (Writhing Test)” seçildi (50). Nositif etkiyi oluşturmak için serum fizyolojik içinde %0,6'lık asetik asit çözeltisi kullanıldı. İ.p. enjeksiyonu takip eden 5. dakikadan sonra 15 dakika boyunca kıvrınma refleksi (writhing) sayıldı. Her grupta 6 hayvan kullanılarak istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmaların yapılabilmesi hedeflendi.

3.3.2 Termal Ağrı Modeli-Hotplate (sıcak levha) Testi

Termal ağrı modelinde hotplate testi seçildi (39) ve yüzey sıcaklığı 52°C olarak belirlenmiş bir “hotplate sistemi” kullanıldı. Sıcaklığı sabit tutan kontakt termometre ile donanımlı bu sistem sayesinde standart sıcaklıkta bir termal ağrı modeli oluşturuldu. Farelerin arka ayaklarını çekme, yalama veya sıçrama davranışı ağrının algılanması olarak değerlendirilerek saniye cinsinden kaydedildi. Tepki süresinin uzaması ağrı algısında azalma ve antinoseptif etkinin varlığına işaret eden bir durum olarak değerlendirildi. Hotplate sistemindeki ölçümler 10’ar dakika arayla 1 saat boyunca sürdürüldü. Uzun dönemde etkinin varlığının gözlenmesi için 140. dakikada son hotplate kaydı alındı. Farelerde ısının kalıcı bir doku hasarı oluşturmasını engellemek amacıyla cut-off süresi 30 saniye olarak belirlendi. Her grupta 6 hayvan kullanılarak istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmaların yapılabilmesi hedeflendi.

3.4. İlaç Uygulamaları ve Değerlendirme

Kıvrınma ve hotplate testlerinde öncelikle morfin ve koniinin ayrı ayrı etkileri değerlendirildi. Daha sonra morfin ve koniinin, aralarındaki olası etkileşimi değerlendirebilmek amacıyla eş zamanlı olarak verildi. Morfin ve koniinin intraperitoneal enjeksiyonlarından 10 dakika sonra kıvrınma testinde nosisseptif etkinin oluşmasını sağlayacak asetik asit çözeltisi verildi. Asetik asit enjeksiyonunu takip eden 5. dakikadan itibaren 15 dakika boyunca kıvrınma refleksi (writhing) sayıldı. Termal ağrı modelinde ise morfin ve koniinin enjeksiyonlarından 10 dakika sonra nosisseptif etkinin oluşmasını sağlayacak hotplate uygulamalarına başlandı. Tüm ilaç uygulamalarında enjeksiyonlar 0.1ml/10 g vücut ağırlığına göre yapıldı.

3.5 Mekamilamin Uygulaması:

Kıvrınma ve hotplate testlerinde koniinin oluşturması beklenen antinosiseptif etkinin mekanizmasının incelenebilmesi amacıyla nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin, 1 mg/kg dozunda verildi. Mekamilaminin analjezik etkisinin yaklaşık 10 dakika içinde ortaya çıktığı bilindiğinden (2), mekamilamin koniinin ile birlikte aynı anda verildi. Mekamilamin varlığında kıvrınma ve hotplate testlerinin sonuçları yukarıda aktarıldığı şekilde kaydedildi.

3.6 Toksisite

Deneyler süresince ve deneylerden sonraki 1 hafta boyunca hayvanlarda gözlenebilecek ölüm veya diğerkomplikasyonlar izlendi.

Antinosiseptif etki olarak değerkendirilen gözlemlerin nörotoksik bir etkiden ya da lokomotor aktivitenin azaldığı bir durumdan kaynaklanma olasılığını ortadan kaldırmak amacıyla “rotarod testi” uygulandı. Dakikada 12 tur dönen bir rotarod çubuğuuzerinde farelerin kalma süreleri ve bu sürelerin deneyler sırasında verilen kimyasal ajanlara bağılı olarak değışimi, lokomotor aktivitenin değerkendirilmesi amacıyla kaydedildi. Farelerin rotarod üzerinde kalma süresinin ksalması lokomotor aktivitenin azalması olarak değerkendirildi.

3.7. Verilerin Analizi:

Sonuçlar 6 sayıda deneyin ortalaması $\pm$ ortalamasının standart hatası olarak ifade edildi. Verilerin istatistiksel analizi için Student’ın *t*-testi, Mann-Whitney *U* testi ve tek yönlü tekrarlayan varyans analizini (ANOVA) takiben

post-hoc Bonferroni testleri kullanıldı. Grafikler ve istatistik Graph Pad Software Prism 3.0 paket programı ve Microsoft Excel programında hazırlandı.

3.8. Kullanılan İlaçlar:

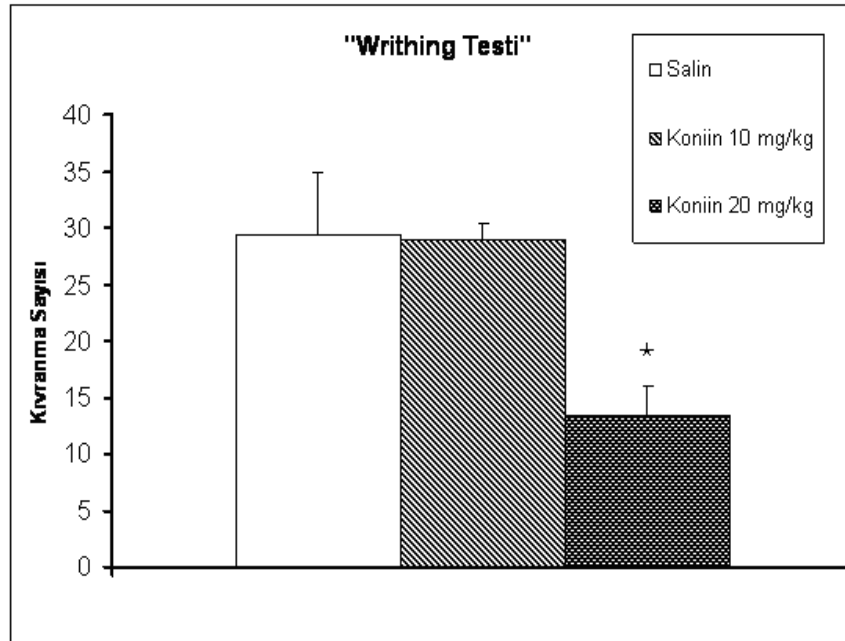
Bu çalışmada koniin (Sigma), mekamilamin HCl (Merck Sharp & Dohme) ve morfin (Sigma) kullanıldı. Kullanılan ilaçların stok çözeltileri, serum fizyolojik içinde çözülerek hazırlandı. Stok çözeltilerden dilüsyonlar günlük olarak hazırlandı.

BULGULAR

4.1. Kıvrınma Testinde Antinosiseptif Etkinin Değerlendirilmesi

4.1.1. Koniinin Kıvrınma Testindeki Antinosiseptif Etkileri

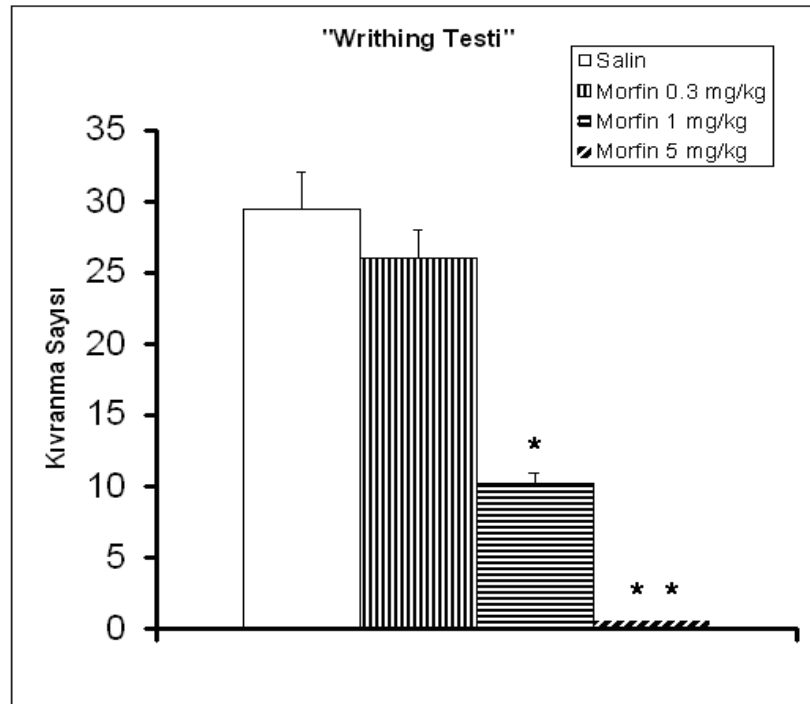
Koniinin 10 mg/kg dozunda uygulanması, nosiseptif etkinin bir göstergesi olan kıvrınma sayılarında, kontrol grubuna göre fark oluşturmadi (kontrol: $29,5 \pm 2,57$; koniin: $29 \pm 1,21$). Koniinin 20 mg/kg dozunda ise kıvrınma sayılarında belirgin bir düşüş gözlemlendi (koniin: $13,5 \pm 1,12$; $P < 0.05$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Koniinin kıvrınma testindeki antinosiseptif etkisi

4.1.2. Morfinin Kıvrınma Testindeki Antinosiseptif Etkileri

Morfinin 0,3 mg/kg dozunda uygulanması kıvrınma sayılarında kontrol grubuna göre anlamlı azalma oluşturmazken (kontrol: $29,5 \pm 2,57$; morfin: $26 \pm 1,98$), 1 mg/kg dozunda kıvrınma sayısında belirgin bir azalma meydana getirdi (morfin: $10,17 \pm 0,79$; $P<0.05$). Morfin 5 mg/kg dozunda ise kıvrınma refleksini tümüyle önledi ($P<0.01$).



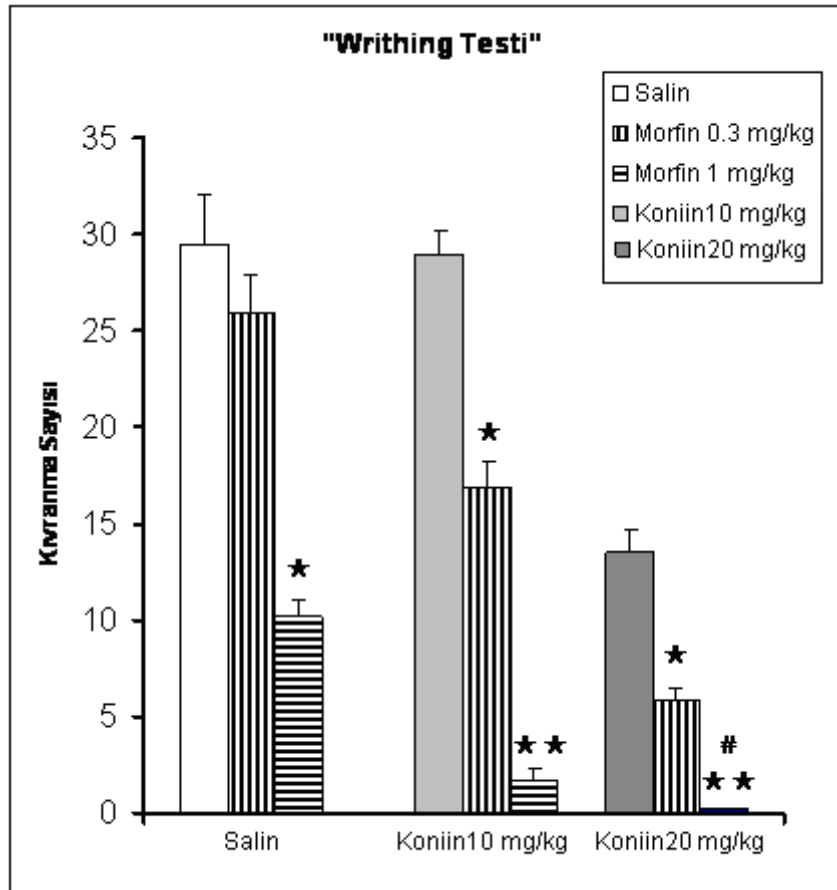
Şekil 4.2 Morfinin kıvrınma testindeki antinosiseptif etkisi

4.1.3. Morfin Varlığında Koniinin Kıvrınma Testindeki Antinosiseptif Etkileri

Tek başına 10 mg/kg dozunda koniinin uygulaması, kıvrınma sayılarında kontrole karşı belirgin azalma oluşturmamasına karşın 0.3 mg/kg morfin eklenmesiyle birlikte kıvrınma sayısında belirgin bir azalma meydana getirdi (koniin: $29 \pm 1,21$, koniin+morfin: $16,83 \pm 1,30$; $P<0.05$). Aynı koniin dozunda

Morfin'in 1 mg/kg uygulanması kıvranmayı sıfıra yakın bir değere kadar azalttı ($P<0.01$). Morfinin 5 mg/kg dozda uygulanması tek başına tüm kıvranmaları ortadan kaldırması nedeniyle koniininle birlikte kullanılması tercih edilmedi.

Tek başına uygulandığında kıvranma sayısını kontrole göre anlamlı derecede azaltan 20 mg/kg koniinin dozuna 0.3 mg/kg morfin eklenmesiyle birlikte kıvranma sayısında belirgin azalma gözlemlendi (koniin: $13,50 \pm 1,12$, koniin+morfin: $5,83 \pm 0,60$; $P<0.05$). 20 mg/kg koniinin varlığında morfin dozunun 1 mg/kg çıkarılması sonucunda kıvranma refleksi tümüyle kayboldu.



Şekil 4. 3 Koniinin morfin varlığında kıvranma testindeki antinosiseptif etkisi

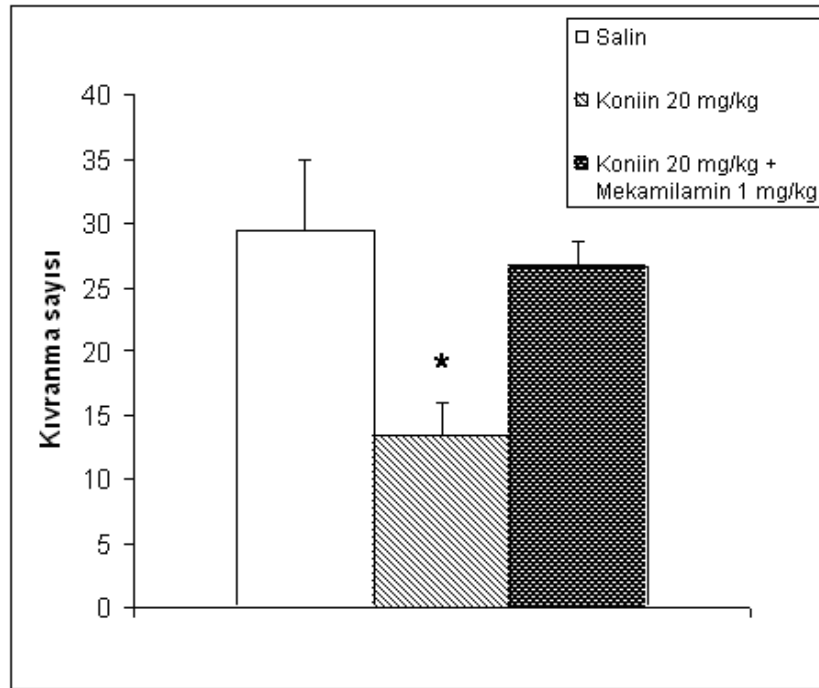
* $P<0.05$ aynı deney grubundaki kontrole göre

** $P<0.01$ aynı deney grubundaki kontrole göre

$P<0.05$ düşük dozdaki koniinin değerlerine göre

4.1.4. Mekamilamin Varlığında Koniinin Kıvranma Testindeki Antinosiseptif Etkileri

Tek başına uygulandığında 20 mg/kg koniinin kıvranma sayısını belirgin biçimde düşürmekteyken (kontrol: $29,5 \pm 2,57$, koniinin: $13,5 \pm 1,12$; $P < 0.05$) 1 mg/kg mekamilamin eklenmesi ile birlikte kıvranma sayısının kontrole yaklaştığı gözlemlendi (koniin+mekamilamin: $26,67 \pm 1,93$; $P > 0.05$). Mekamilaminin 0.1 mg/kg dozunun ise kıvranma sayılarında koniinin 20 mg/kg dozunda gözlenen azalma üzerinde bir etkiye bulunmadığı tespit edildi ($13,67 \pm 1,28$). Sadece 1 mg/kg mekamilamin verilmesi, kıvranma sayısında kontrole göre belirgin bir değişime neden olmadı ($30,17 \pm 2,12$).

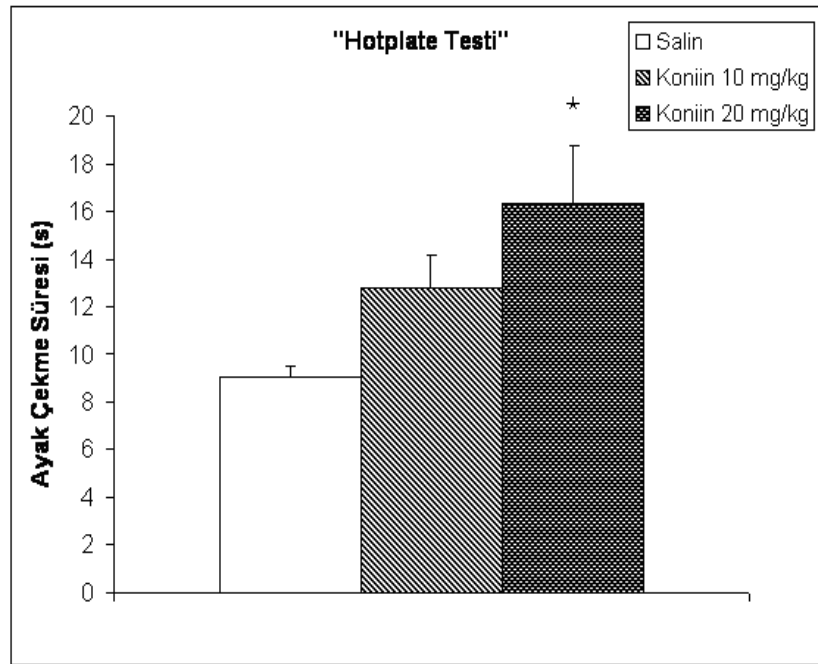


Şekil 4. 4 Mekamilamin varlığında koniinin kıvranma testindeki antinosiseptif etkisi

4.2. Hotplate Testinde Antinosiseptif Etkinin Değerlendirilmesi

4.2.1. Koniinin Hotplate Testindeki Antinosiseptif Etkileri

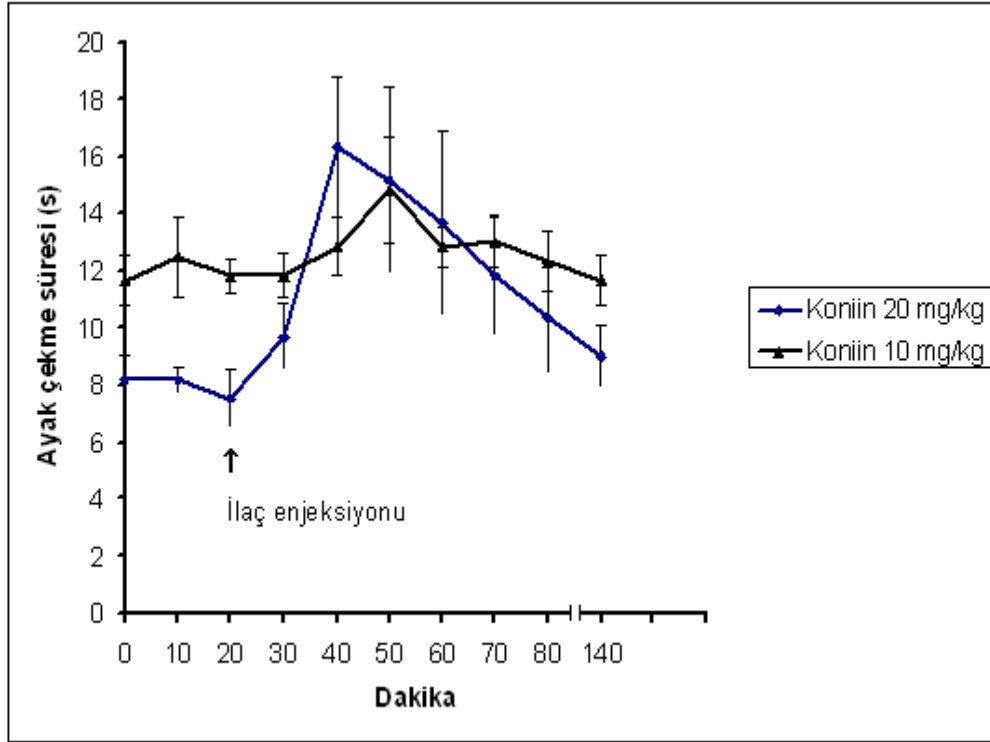
Hotplate testinde 10 mg/kg koniinin enjeksiyonunu takiben 20. dakikada kontrole göre ayak çekme süresinde bir artış meydana gelmekle beraber bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (kontrol: $9 \pm 0,45$ s, koniinin: $12,83 \pm 1,38$ s; $P > 0,05$). Antinosiseptif etkinin bir göstergesi olan ayak çekme süresindeki uzama 20 mg/kg koniinin uygulanması ile belirginleşti (koniinin: $16,33 \pm 2,40$ s) ($P < 0,05$).



Şekil 4. 5 Koniinin hotplate testindeki antinosiseptif etkisi

20 mg/kg dozda hotplate testinde gözlenen antinosiseptif etki zamana göre incelendiğinde enjeksiyonu takiben etkide hızlı bir yükselme ve bu yükselmeye oranla daha yavaş bir düşüş gözlemlendi. Bu dozda en güçlü antinosiseptif etki enjeksiyondan 20 dakika sonra kaydedildi. 10 mg/kg dozda koniinin antinosiseptif etkisi 30. dakikada belirgin hale geldi. Bu düşük doz, 20

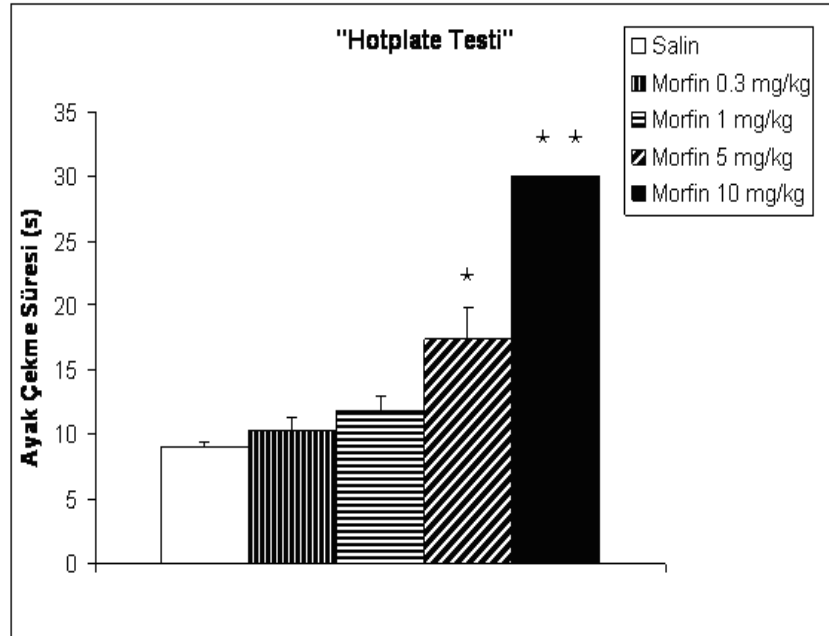
mg/kg'a göre daha düşük bir antinosiseptif etkiye neden olmanın yanı sıra etkinin ortaya çıkışında da daha uzun bir süre (30 dak) geçmesi gerektiğini gösterdi.



Şekil 4. 6 Koniinin hotplate testindeki zamana göre antinosiseptif etkisi

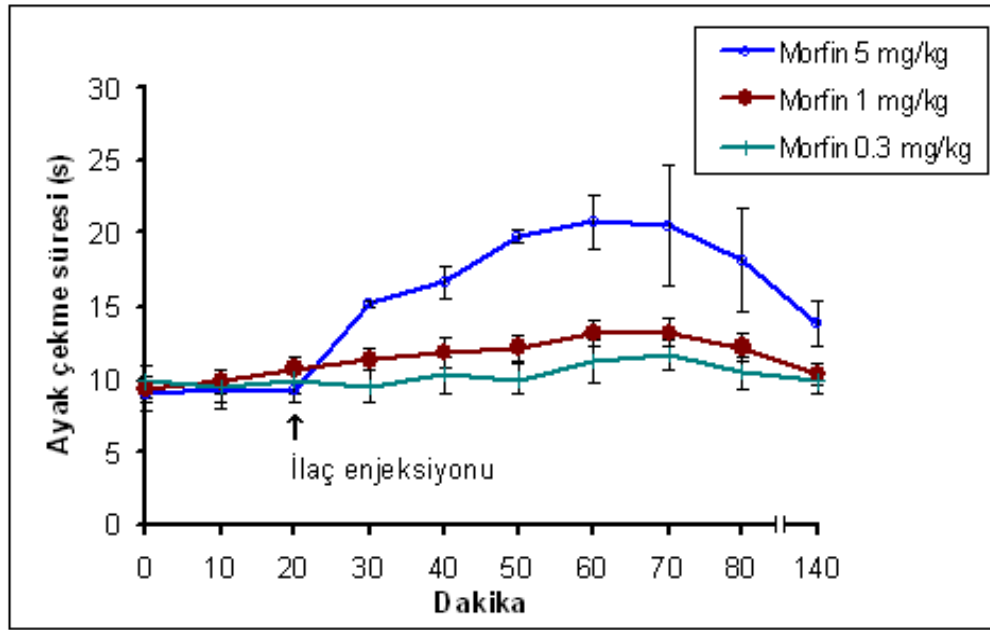
4.2.2. Morfinin Hotplate Testindeki Antinosiseptif Etkileri

Hotplate testinde morfin enjeksiyonundan 20 dakika sonra, artan morfin dozlarına paralel olarak ayak çekme sürelerinde de artış gözlemlendi. Bu artış 0.3 mg/kg ve 1 mg/kg dozlarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P > 0.05$). 5 mg/kg'da ise fark anlamlı bulundu (morfin-5: $16,67 \pm 2,25$ s; $P < 0.05$). Morfin 10 mg/kg uygulandığında farelerde cut-off zamanına kadar ayak çekme tepkisi gözlenmedi.



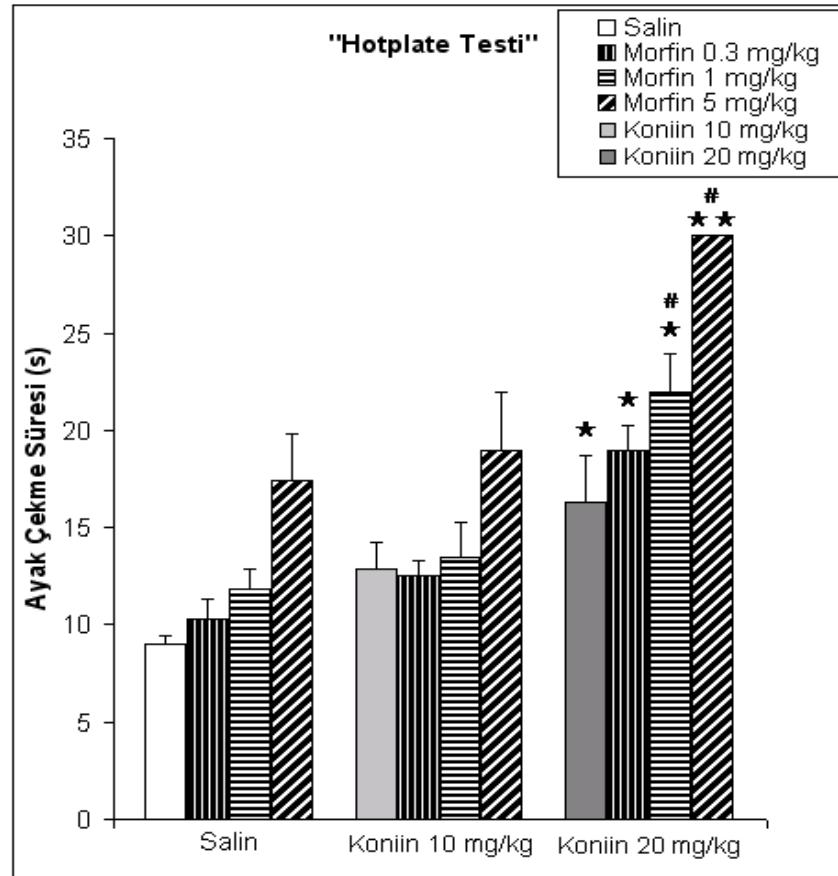
Şekil 4.7 Morfinin hotplate testindeki antinosiseptif etkisi

Morfinin hotplate testinde antinosiseptif etki gösterme süresi incelendiğinde en güçlü ve en hızlı ortaya çıkan antinosiseptif etkinin 5 mg/kg dozunda olduğu gözlemlendi. Koniin bulgularının aksine morfinin 0.3 mg/kg ve 1 mg/kg gibi düşük dozlarında zaman içinde antinosiseptif etkide istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmedi.



Şekil 4. 8 Morfinin hotplate testindeki zamana göre antinosiseptif etkisi

4.2.3. Morfin Varlığında Koniinin Hotplate Testindeki Antinosiseptif Etkileri



Şekil 4. 9 Morfin varlığında koniinin hotplate testindeki antinosiseptif etkisi

* $P < 0.05$ salin verilen gruptaki kontrole göre

** $P < 0.01$ salin verilen gruptaki kontrole göre

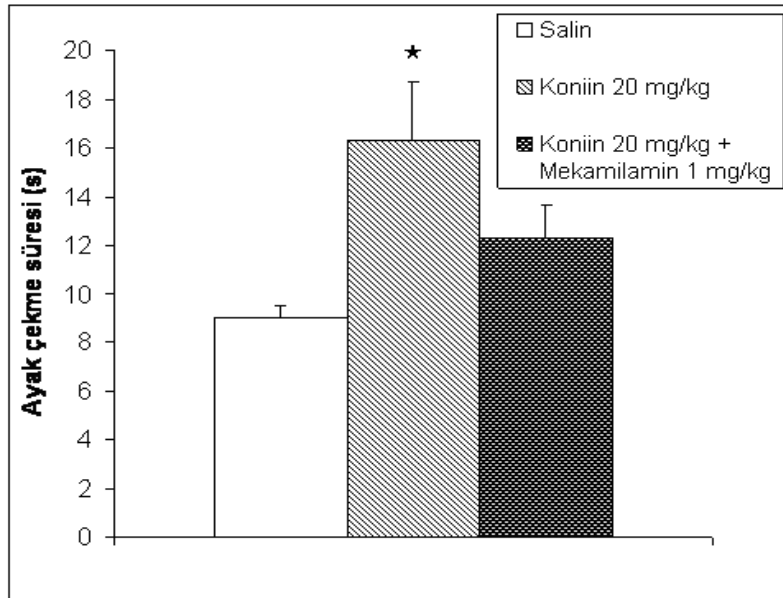
$P < 0.05$ düşük dozdaki koniinin değerlerine göre

Morfinin farklı dozlarının verilmesi ile oluşan ayak çekme süresindeki artışı koniinin 10 mg/kg dozda anlamlı biçimde değiştirmedir. Koniinin 20 mg/kg dozunda morfinin farklı dozlarının verilmesiyle oluşan yanıtları her dozda artırdı. Morfinin 0.3 ve 1 mg/kg dozlarında ayak çekme sürelerinin uzamaları ölçülebilirken ($P < 0.05$), 5 mg/kg dozunda fareler cut-off süresine kadar tepki

vermedikleri için tam değerleri elde edilemiyerek değerlendirmeler cut-off süresine göre yapıldı ($P<0.01$).

4.2.4. Mekamilamin Varlığında Koniinin Hotplate Testindeki Antinosiseptif Etkileri

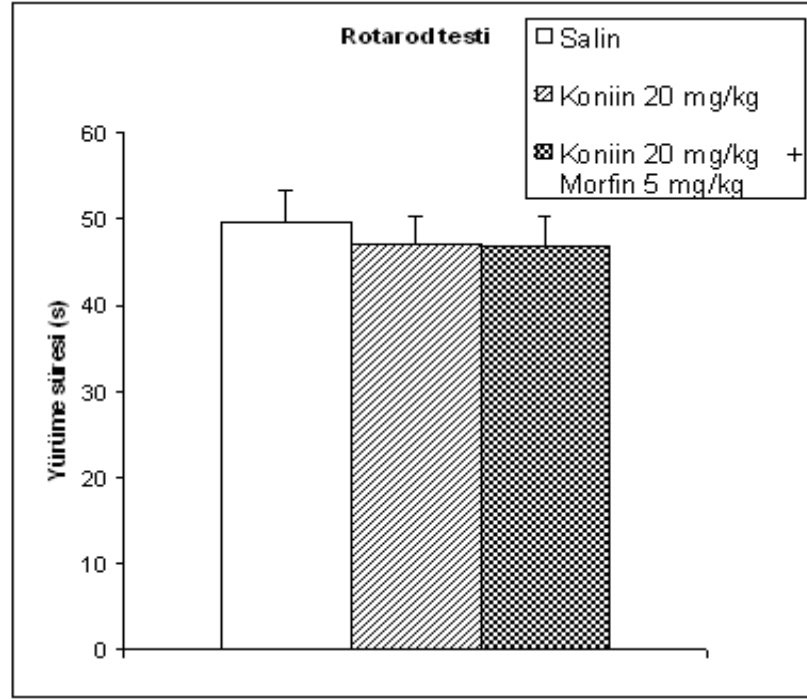
Mekamilamin uygulaması koniinin hotplate testinde fareler üzerinde gözlenen ayak çekme süresindeki artışı geri döndürdü. 20 mg/kg dozda koniinin verilen farelerde enjeksiyondan sonra 20. dakikada ayak çekme sürelerinde gözlenmesi beklenen uzama kaydedilmedi ve bu süre kontrole yakın bir değerde gözlemlendi (kontrol: $9 \pm 0,45$ s, koniinin+mekamilamin: $12,33 \pm 1,31$ s; $P>0.05$). 140. dakikaya kadar yapılan izlemede bu durumun uzun dönemde de devam ettiği tespit edildi. Mekamilaminin 0.1 mg/kg dozunun, ayak çekme süresinde koniinin 20 mg/kg dozunda gözlenen artış üzerinde azaltıcı bir etkide bulunmadığı gözlemlendi ($16 \pm 2,44$). Sadece 1 mg/kg mekamilamin verilmesi, ayak çekme süresinde kontrole göre belirgin bir değişime neden olmadı ($9,17 \pm 0,70$).



Şekil 4. 10 Mekamilamin varlığında koniinin hotplate testindeki antinosiseptif etkisi

4.3. Rotarod Testinde Lokomotor Aktivitenin Değerlendirilmesi

Rotarod testinde farelerin dakikada 12 tur dönen rotarod çubuğu üzerinde durma süreleri gözlemlendi. Yalnızca serum fizyolojik verilen kontrol grubu $49,67 \pm 3,69$ s yürürken, bu değer 20 mg/kg koniinin verilen farelerde $47,17 \pm 3,1$ s olarak ölçüldü. 20 mg/kg koniinin beraberinde 5 mg/kg morfin verilen farelerde ise ortalama süre $46,83 \pm 3,41$ s olarak kaydedildi. Elde edilen süreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi.



Şekil 4.11 Rotarod testinde farklı ajanların lokomotor aktiviteye etkilerinin değerlendirilmesi.

4.4 Kullanılan Kimyasal Ajanların Toksisitesi

Koniinin 10 mg/kg dozda uygulanması hayvanlarda tespit edilebilen düzeyde patolojik ya da fonksiyonel bir bozukluğa veya ölüme neden olmadı. Koniinin 20 mg/kg'ın üzerine çıkan dozlarında ise fasikülasyon, diskinezi ve konvülsiyonlar gözlemlendi. Artan dozlarla birlikte hayvanların enjeksiyonu takip eden 5-10 dakika içinde öldükleri gözlemlendi. Koniinin 10 ve 20 mg/kg (ölüm gözlenmeyen) dozlarında takip süresi olan 1 hafta içinde başka bir komplikasyon veya ölüm tespit edilmedi.

Morfin (0.3, 1, 5, 10 mg/kg) ve mekamilamin (1, 3 mg/kg), kullanılan dozlarda ölüm veya herhangi bir komplikasyona neden olmadı.

Mekamilamin 3 mg/kg dozda uygulandığında, tüm farelerde letal etki göstermesi beklenen 50 mg/kg koniinin dozunda, bir haftalık takip süresi boyunca ölümlere engel oldu.

TARTIŞMA

Bu çalışma, bitkisel kökenli alkaloid koniinin antinosiseptif etkilerinin araştırılması açısından ilk araştırma niteliğindedir. Koniinin öncelikle antinosiseptif etkileri termal ve kimyasal ağrı modellerinde incelendi ve koniinin fareler üzerinde antinosiseptif etkisinin bulunduğu gösterildi. Koniinin bu etkisi her iki ağrı modelinde de dar bir doz aralığında tespit edildi (10-20 mg/kg). 10 mg/kg'in altında bir antinosiseptif etki gözlenmezken, 20 mg/kg'in üzerindeki dozlarda ise gözlenen letal etki nedeniyle antinosiseptif etki test edilemedi.

Morfin, bilindiği üzere her iki modelde de antinosiseptif etki gösteren santral etkili bir opioiddir. Morfinin koniinin ile antinosiseptif etki bakımından etkileşimi veya karşılaştırılması daha önceden gösterilmemiştir. Bu çalışmada morfin, koniine göre daha düşük dozlarda daha güçlü antinosiseptif etki gösterdi. Morfin, kıvranma testinde 5 mg/kg dozunda kıvranma refleksini tümüyle ortadan kaldırırken, koniinin letal etki gözlenmeden uygulanabilen en yüksek dozu olan 20 mg/kg'da bu refleksi azaltmakla birlikte tümüyle ortadan kaldıramadı. Benzer biçimde hotplate testinde morfin 10 mg/kg dozda tüm farelerin cut-off süresine kadar (30 s) tepki göstermeden kalmalarına neden olurken 20 mg/kg koniinde fareler cut-off'a ulaşamadılar.

Tezin temel hipotezlerinden birisi olan koniinin morfinin antinosiseptif etkisini potansiyalize edici etkisi olup olmadığı konusu da eldeki bulgular ışığında değerlendirildi. Her iki testte de koniinin morfinin antinosiseptif etkisini potansiyalize ettiği bulundu. Bu potansiyalizasyonun kıvranma testinde daha belirgin olduğu gözlemlendi. Antinosiseptif etkinin değerlendirme kriteri olan kıvranma sayıları açısından 10 mg/kg koniinin 0,5 azalma oluşturdu. 0.3 mg/kg morfin ise 3,5 birimlik azalma oluşturdu. Bu iki ajan birlikte uygulandıklarında 12.67 birimlik bir azalma gözlemlendi ($P<0.05$). Benzer durum koniinin 10 mg/kg, morfinin ise 1 ve 5 mg/kg olduğu durumlarda da geçerliydi.

Bu sonuçlar, morfinin antinosiseptif etkisinin koniinin varlığında potansiyalize olduğunu göstermektedir.

Potansiyalizasyon durumunun değerlendirildiği ikinci test olan Hotplate testinde ise beklenen potansiyalizasyon görülmekle birlikte kıvranma testindeki kadar yüksek düzeyde gözlenmedi. Koniinin 10 mg/kg dozunda herhangi bir potansiyalizasyon gözlenmezken 20 mg/kg dozunun, morfinin çeşitli dozları ile birlikte kullanıldığında koniinin artan düzeyde bir potansiyalizasyona neden olduğu tespit edildi. Antinosiseptif etkinin hotplate testindeki ölçme kriteri olan ayak çekme süresindeki uzama sayılarında 20 mg/kg koniinin 7.33 saniyelik bir uzama oluşturdu. 0.3 mg/kg morfin ise 1.33 saniyelik uzama meydana getirdi. Her iki ajanın birlikte kullanıldığı durumda ise 10 saniyelik bir uzama gözlemlendi ($P<0.05$). Benzer ancak daha güçlü biçimde, morfinin 1 mg/kg dozunda da, ajanların ayrı ayrı kullanıldıkları durumlarda oluşan farkın toplamına göre (10.16 s) daha fazla bir uzama (13 s) tespit edildi. Hotplate testinde gözlenen en yüksek potansiyalizasyon, koniinin 20 mg/kg ve morfinin 5 mg/kg dozunda birlikte kullanıldıklarında tespit edildi. Ajanların ayrı ayrı kullanıldıkları durumlarda oluşan farkın toplamına göre (15 s) birlikte kullanıldıkları durumda cut-off süresine (30 s) kadar süren bir uzama gözlemlendi. Kıvranma testinde olduğu gibi hotplate testindeki bu durum da morfinin antinosiseptif etkisinin koniinin varlığında potansiyalize olduğunu işaret etmektedir.

Hotplate ve kıvranma testlerinde koniinin ve morfinin birbirlerini potansiyalize etmelerinin nedeni antinosiseptif etki mekanizmalarının farklılıkları ışığında değerlendirilebilir. Hotplate daha çok santral analjezik etkili bileşiklerin değerlendirildiği bir testtir. Kıvranma testi ise periferik antinosiseptif etkinliğin incelenmesinde daha çok tercih edilen bir ağrı modelidir (55). Morfinin ve koniinin bu farklı ağrı algılama mekanizmalarında birbirini destekleyici bir etki oluşturabilecekleri ve bu durumun da potansiyalizasyona neden olabileceği düşünülebilir.

Koniin, morfin ve her ikisinin birlikte uygulandığı durumlarda gözlenen değişimlerin antinosiseptif bir etkiden mi yoksa lokomotor aktivitenin azalmasından mı kaynaklandığı da araştırıldı. Bu amaçla kullanılan rotarod testinde koniin, morfin ve her ikisinin birlikte uygulandığı farklı dozların rotarod testi sonuçlarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştirmedığı gözlemlendi. Bu bulgular, deneyler sırasında elde edilen sonuçların lokomotor aktivitenin azalmasından değil antinosiseptif bir etkiden kaynaklandığını işaret etmektedir.

Morfinin antinosiseptif etkisini santral opiyoid reseptörler üzerinden yapmakta olduğu bilinmektedir (27) Koniin ise nikotinik reseptörleri uyaran bir alkaloiddir (10). Ancak koniinin antinosiseptif etkisi ile ilgili herhangi bir veri bulunmadığından deneylerde gözlediğimiz etkilerin hangi fizyolojik mekanizma ile gerçekleştiği, başlangıçta net olarak bilinmemekteydi. Bu amaçla yapılan deneyde kullanılan nikotinik reseptör antagonisti mekamilamin, 1 mg/kg dozunda koniinin bu antinosiseptif etkisini belirgin derecede azaltıcı etki gösterdi. Bu sonuçlar, koniin ile elde edilen antinosiseptif etkinin nikotinik yolak üzerinden meydana geldiğini düşündürmektedir. Daha düşük dozlarda kullanılan mekamilamin, koniinin antinosiseptif etkisini azaltıcı bir etki göstermedi. Daha yüksek dozlarda kullanılan mekamilaminin (3 mg/kg) kendisinin de antinosiseptif etki gösterdiği tespit edildiğinden koniinin antinosiseptif etkisi mekanizmasını araştırmada kullanılmadı. Kolinerjik etki gösteren kimyasal ajanların olduğu kadar antikolinerjik ajanların da antinosiseptif etkilerinin olduğu bilinmektedir (17). Koniinin antinosiseptif etkisini bloke edebilecek ancak kendisi antinosiseptif etki göstermeyecek mekamilamin dozu literatür ile de uyumlu olarak 1 mg/kg olarak belirlendi ve antinosiseptif mekanizmanın aydınlatılmasında bu doz kullanıldı.

Koniinin toksisitesi ile ilgili deneylerde ise koniinin 20 mg/kg'ın üzerinde letal etki gösterdiği gözlemlendi. Koniinin 10 ya da 20 mg/kg olarak tek

doz uygulanması farelerde deney süresince ve sonraki 1 haftalık dönemde herhangi bir ölüm ya da komplikasyon oluşturmadi. 20 mg/kg koniinin uygulanan farelerin bir sonraki hafta gerçekleştirilen antinosiseptif testlerinde kontrol farelere göre anlamlı bir fark gözlenmedi. Bu bulgu koniinin toksik etkisinin kısa süreli gangliyon blokajından kaynaklandığını ve dozun letal düzeyde olmadığı sürece sinirlerde daha sonraki denemelerde antinosiseptif tepkileri bozabilecek fonksiyonel bir hasar meydana getirmediğini düşündürmektedir. Ancak hücre düzeyinde bu durumun test edilmesi için biyokimyasal parametreleri de içeren testlere ihtiyaç vardır. Ayrıca tek doz yerine, kronik subletal doz uygulamaların toksisiteye sebep olup olmadığı, bu tez çalışması kapsamında incelenmediği için bilinmemektedir.

Mekamilamin'in 3 mg/kg dozda kullanılmasının, hayvanların tümünde letal etki göstermesi beklenen 50 mg/kg koniinin dozunda ölümleri önlediği gösterildi. Koniinin letal etkisini nikotinik reseptörlere bağlanarak ganglionların temporal blokajı üzerinden gerçekleştirdiği ve antinosiseptif etkinin de nikotinik reseptörler aracılığı ile meydana geldiği düşünüldüğünde daha önce başka araştırmacılar tarafından ön planda tutulan gangliyon stimülasyonu seçeneği sorgulanabilir (10).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, 1898 yılından bu yana bilimsel araştırmalara konu olan, ilk izole edilmiş alkaloidler arasında yer alan koniinin antinosiseptif etkisi ilk kez gösterilmiştir. Elde edilen bu veriler, gerek koniinin ile gerçekleştirilecek gelecek çalışmalar için gerekse antik dönemde yaşanmış önemli bir tarihsel olay hakkında fikir verici niteliktedir. Batı felsefesinin kurucusu sayılan Sokrates'in idamında kullanılan karışımın içeriğinde baldıran otunun yanı sıra ağrısını ortadan kaldırmak için haşhaş ekstresi gibi analjezik etkili bir maddenin de bulunabileceği yönünde kesin olmayan tarihsel yorumlar mevcuttur. Bu çalışmanın sonucunda koniinin kendisinin analjezik etkisinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca antik yazarlar tarafından iddia edildiği gibi haşhaş ekstresi (morfin) ve baldıran otu ekstresi (koniinin) birlikte kullanılmış ise bu idam sırasında analjezi açısından bir potansiyalizasyon olduğu ve Sokrates'in muhtemelen hiç ağrı hissetmediği düşünülebilir.

Tez sonrası çalışmalarda:

1. Koniinin antinosiseptif özelliklerinin araştırılmasında, hiperaljezi oluşturulan durumlarda ve allodini yanıtlarında koniinin etkisi araştırılabilir.
2. Koniinin subletal dozda kronik uygulamalarının sonuçları bilinmemektedir. Nikotinik reseptörlerde bu uygulamanın sonuçları histopatolojik ve elektrofizyolojik yöntemleri de içeren metotlarla incelenebilir.
3. Koniinin ile ilgili günümüzde sürdürülen araştırmalar daha çok teratojenite üzerinedir. Tez kapsamında deneyler erkek fareler ile gerçekleştirilmesine rağmen bu hayvanların daha sonradan üremesine imkan verilmediğinden ve teratojenite tez konusu kapsamı dışında olduğundan bu konuda bir veri elde edilmedi. Gelecek çalışmalarda mekamilamin gibi antagonistler kullanılarak koniinin teratojenik ve toksikolojik etkilerinin bu tür

ajanlar varlığında incelenmesi özellikle hayvanlarda gözlenen bu istenmeyen durumlar açısından antidot geliştirmede faydalı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Bannon, A.W., Decker, M.W., Holladay, M.W., Curzon, P., Donnelley-Roberts, D., ve diğeri. (1998). Broad spectrum, non-opioid analgesic activity by selective modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Science* 279, 77-81.
2. Barocelli, E., Calcina, F., Chiavarini, M., Impicciatore, M., Bruni, R., Bianchi, A., ve Ballabeni, V. (2004). Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon "Grosso" essential oil. *Life Sciences*. 76, 213-223.
3. Barry S. F., Michelson, W. B., Panter, K., ve Gardner, D. R. (1995) Ingestion of poison hemlock (*Conium maculatum*). *West J Med*; 163, 573-574.
4. Baumann H. (1993) *The Greek plant world in myth, art and literature*. Timber Pres. Oregon. 112-114
5. Baytop, T., Baytop, A., Mat, A., ve Sun S. (1989) *Türkiye’de zehirli bitkiler, bitki zehirlenmeleri ve tedavi yöntemleri*. İstanbul. 42.
6. Baytop A. (1995). Bitkilerin *bilimsel adlarındaki niteleyiciler ve anlamları*. . İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayın No: 3889. 163.
7. Baytop T. (1997). *Türkçe bitki adları sözlüğü*. Ankara: Türk Dil Kurumu Yayınları: 578. 42.
8. Biberici, E., Altuntaş, Y., Cobanoğlu, A., ve Alpınar, A., (2002). Acute respiratory arrest following hemlock (*Conium maculatum*) intoxication. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology* 40, 517-518.

9. Bloch E. (2001). Hemlock poisoning and the death of socrates: Did plato tell the truth? *J. Int Plato Society*.
10. Bowman W.C., ve Sanghvi I.S. (1963) Pharmacological actions of hemlock (*Conium maculatum*) alkaloids, *J. Pharm. Pharmacol.*, 15, 1-25.
11. Bouaziz, H., Tong, C., ve Eisenach, J.C. (1995). Postoperative analgesia from intrathecal neostigmine in sheep. *Anesthesia and Analgesia* 80, 1140-1144.
12. Candrian U, Luthy J, ve Schmid P. (1984). Stability of pyrrolizidine alkaloids in hay and silage. *J. Agr. Food Chem* 39, 930-933.
13. Carroll, F.L., Lee, J.R., Navarro, H.A., Ma, W., Brieady, L.E. Abraham, P., ve diğerleri. (2002). Synthesis, nicotinic acetylcholine receptor binding, and antinociceptive properties of 2-exo-2-(2',3'-disubstituted 5'-pyridiniyl)-7-azabicyclo[2.2.1]heptanes: epibatidine analogues. *Journal of Medicinal Chemistry* 45, 4755-4761.
14. Chen, S.R., Khan, G.M., ve Pan, H.L. (2001) Antiallodynic effect of intrathecal neostigmine is mediated by spinal nitric oxide in a rat model of diabetic neuropathic pain. *Anesthesiology* 95, 1007-1012.
15. Damaj, M.I., Fei-Yin, M., Duket, M., Glassco, W., Glennon, R.A., ve Martin, B.R. (1998). Antinociceptive responses to nicotinic acetylcholine receptor ligands after systematic and intrathecal administration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 284, 1058-1065.
16. Decker, M.W., Bannon, A.W., Buckley, M.J., Kim, D.J.B., Holladay, M.W., Ryther, K.B., ve diğerleri. (1998). Antinociceptive effects of the novel

neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonist, ABT-594, in mice. *European Journal of Pharmacology* 346, 23-33.

17. Decker, M.W. (1999) The analgesic potential of compounds acting at acetylcholine receptors. *Current Opinion in Anaesthesiology*. Volume 12(5), 597-601

18. Donnelly-Roberts, D.L., Puttfarcken, P.S., Kuntzweiler, T.A., Briggs, C.A., Anderson, D.J., Campbell, J.E., ve diğerleri. (1998). ABT-594 [(R)-5-(2-Azetidinylmethoxy)-2-chloropyridine]: a novel, orally edective analgesic acting via neuronal acetylcholine receptors: I. In vitro characterization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 285, 777-786.

19. Donner Josef. (Ed. Çolak, A.). (2007) *Türkiye Bitkileri Yayılış Haritaları*. İstanbul. 147.

20. Dussor, G.O., Helesic, G., Hargreaves, K.M., ve Flores, C.M. (2004). Cholinergic modulation of nociceptive responses in vivo and neuropeptide release in vitro at the level of primary sensory neuron. *Pain* 107, 22-32.

21. Eisenach J. C., Detweiler D.J., Tong C., D'Angelo R., ve Hood D.D. (1996) Cerebrospinal fluid norepinephrine and acetylcholine concentrations during acute pain. *Anesthesiology and Analgesia* 82, 621-626.

22. Erkent Ü. Koniinin Presinaptik Nikotinik Reseptörleri Üzerine Etkisi. Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2004.

23. Frank, A.A., ve Reed, W.M. (1990). Comparative toxicity of coniine, an alkaloid of *Conium maculatum* (poison hemlock), in chickens, quails and turkeys. *Avian Disease* 34, 433-437.

24. Galey F.D., Holstege D.M., ve Fisher E.G. (1992). Toxicosis in dairy cattle exposed to poison hemlock (*Conium maculatum*) in hay: isolation of Conium alkaloids in plants, hay, and urine. *J. Vet. Diagn Invest* 4, 60-64.
25. Cordell, G. A., Quinn-Beattie M. L., ve Farnsworth N. R. (2001). The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother. Res.* 15, 183-205.
26. Gomeza, J., Shannon, H., Kostenis, E., Felder, C., Zhang, L., Brodtkin, J., ve diğeri. (1999). Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 1692-1697
27. Guyton, A.C., ve Hall, J.E. 2001. *Tıbbi Fizyoloji*. Onuncu Baskı. Nobel Yayınevi. 556-557.
28. Holm L. (1997). *World Weeds, Natural Histories and Distribution*. Wiley, New York. 1129.
29. Hood, D.D., Mallak, K.A., James, R.L., Tuttle, R., ve Eisenach, J.C. (1997). Enhancement of analgesia from systemic opioid in humans by spinal cholinesterase inhibition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 282, 86-92.
30. Jones Philip G, ve John Dunlop. (2007) Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. *Neuropharmacology* 53, 197-206.
31. Jowett M.A.B. (1998) *The Dialogues of Plato*. (Ed. Uraş, A.A.) İstanbul: Şule Yayınları. 222-224.

32. Keeler, R.F. (1974). Coniine, a teratogenic principle from conium maculatum producing congenital malformations in calves. *Clin Toxicol.* 7, 195-206.
33. Keeler, R.F., Balls, L.D., ve Shupe, J.L. (1980) Teratogenicity and toxicity of coniine in cows, ewes and mares. *Cornell Vet.* 70, 19-26.
34. Kiguchi, N., Takehiko, M., Tsugura, M., Yamamoto, A., Chizuko, Y., Ozaki, M., ve diğerleri. (2007). Involvement of spinal Met-enkephalin in nicotine induced antinociception in mice. *J. Brain Research.* 1189, 70-77.
35. Lavand'homme, P.M., ve Eisenach, J.C. (1999). Sex differences in cholinergic analgesia II: differing mechanisms in two models of allodynia. *Anesthesiology* 91, 1454-1455.
36. Lawand, N.B., Lu, Y., ve Westlund, K.N. (1999) Nicotinic cholinergic receptors: potential targets for inflammatory pain relief. *Pain* 80, 291-299.
37. Lopez A., Cid S., ve Bianchini L. (1999). Biochemistry of hemlock (Conium maculatum L.) alkaloids and their acute and chronic toxicity in livestock. A review. *Toxicon*, 37, 841-865
38. James, L. F. Panter, K. E., Gaffield, W., ve Molyneux, R. J. (2004). Biomedical applications of poisonous plant research. *Journal of Agricultural and food chemistry.* 52, 3211-3230.
39. MacDonald AD ve diğerleri (1946). Analgesic actions of pethidine derivatives and related compounds. *Br. J. Pharmacol.* 1. 4-14.
40. Marubio L. M., del Mar Arroyo-Jiminez, M., Cordero-Erausquin, M., Lena, C., Le Novere., de Kerchove d'Exaerde, A., Hutcher, M., ve diğerleri. (1999).

Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature* 398, 805-810.

41. Moore, B., ve Row, R. (1898) A comparison of the physiological actions and chemical constitution of piperidine, coniine and nicotine. *J. Physiol.* Feb 17, 22(4): 273-95.

42. Nishiyama, T., Gyerek, L., Trudell, M.L., ve Hanaoka, K. (2003). Spinally mediated analgesic and receptor binding affinity of epibatidine analogs. *European Journal of Pharmacology* 470, 27-31

43. Öztekin-Mat A. (1994). Plant poisoning cases in Turkey, *Ann. Pharm. Fr.* 52(5), 260-265.

44. Panter K.E. (1988). Toxicoses in livestock from the hemlocks (Conium and Cicuta spp.). *J. Animal Sci.* 66, 2407-2413.

45. Prado, W.A., ve Segalla, D.K. (2004). Antinociceptive effects of bethanecol or dimethylphenylpiperazinium in models of phasic or incisional pain in rats. *Brain Research* 1018, 272-282.

46. Tzanetea R., Sakellaropoulos, N., Hadjopoulos, N., Schina, M., Rombos, J., Kalotychou, V., ve Konstantopoulos, K. (2000). Nutrition borne myolysis; an uncommon cause of myolysis in Europe. *Upsala J Med Sci* 105, 255-258.

47. Reynolds T. (2005) Hemlock alkaloids from Socrates to poison aloes. *Phytochemistry*. 66, 1399-1406.

48. Sampson S.R., Esplin D.W., ve Zablocka B., (1966). Effects of coniine on peripheral and central synaptic transmission, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 152(2), 313-324.

49. Sheardown, M.J., Shannon, H.E., Swedberg, M.D.B., Suzdak, P.D., Bymaster, F.P., Olesen, P.H., ve diğerleri. (1997). M1 receptor agonist activity is not a requirement for muscarinic antinociception. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 281, 868-875.
50. Siegmund EA ve diğerleri (1957). A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 95, 729-731.
51. Svoronos 1903-12, plate 83 2001. [http : // www.perseus.tufts.edu / cgibin / image?lookup = Perseus:image:1998.01.0083](http://www.perseus.tufts.edu/cgi-bin/image?lookup=Perseus:image:1998.01.0083).
52. Tomizawa, M., ve Casida J.E. (2003) Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 339-64.
53. Vetter J. (2004). Poison hemlock (*Conium maculatum* L.), *Food Chem. Toxicol.* 42, 1373-1382,
54. Wess, J., Duttaroy, A., Gomeza, J., Zhang, W., Yamada, M., Felder, ve diğerleri. (2003). Muscarinic recetor subtypes mediating central and peripheral antinociception studied with muscarinic receptor knockout mice: a review. *Life Sciences* 72, 2047-2054.
55. Williamson, E.M., Okpako D.T., ve Evans F.E. (1996). *Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material*. Wiley. 145-154.
56. Zdanevich, V., ve Belodubrovskaya, A. (1997). *Conium maculatum*: chemical composition, useful and harmful properties. *Rastitelnye Resursy* 33, 108-113.