

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

NOSİSEPSİYONDA PÜRİNERJİK P2Y12 RESEPTÖRLERİNİN
ROLÜ ÜZERİNE DENEYSEL ÇALIŞMALAR

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ergül ALÇİN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

ELAZIĞ
2009

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR _____

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR _____

Doç. Dr. Selim KUTLU _____

Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK _____

Yrd. Doç. Dr. Mete ÖZCAN _____

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞ _____

Eşim Hatice ALÇİN

ve kızıma...

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkı sağlayan, tezimin hazırlanmasında yardım ve desteklerini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet AYAR'a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışması süresince yardımlarını gördüğüm Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Selim KUTLU'ya, araştırma görevlisi Dr. Emine KAÇAR'a, Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK ve Yrd. Doç. Dr. Mete ÖZCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2002 yılında yaklaşık 177 milyon olan ve 2025 yılı itibari ile dünyada yaklaşık 300 milyon insanı etkilemesi beklenen diyabet hastalarının yaklaşık yarısında, uzun sürede (kan şekerinin düzenlenme düzeyine de bağlı olarak) nöropati gelişmektedir. Ağrılı diyabetik nöropati gelişmiş ülkelerdeki en sık nöropati nedenidir.

Diyabetik nöropatinin sebepleri tam olarak anlaşılmış değildir ve etkin ideal bir tedavisi halen yoktur. Bu tez çalışmasında nöropatik ağrı patofizyolojisinde P2Y₁₂ reseptör alt tipinin olası rolü ile bu reseptörün selektif antagonisti olan klopidoğrel ve MRS 2395'in ağrılı diyabetik nöropatide olası tedavi edici rolleri incelendi.

Dorsal kök gangliyonları (DKG) 1-2 günlük yeni doğan sıçanların dekapitasyonundan sonra enzimatik ve mekanik işlemlerle tek hücrelere ayrıştırıldı. Flüoresan kalsiyum görüntüleme çalışmaları yapılarak klopidoğrel ve MRS 2395'in hücre içi serbest kalsiyum seviyelerine etkisi incelendi. Her iki ajan da doz bağımlı olarak hücre içi serbest kalsiyum miktarında belirgin artış meydana getirdi.

İn vivo deneylerde hot plate analjezimetre kullanılarak nosiseptif davranış latansından ağrı eşiği belirlendi. Klopidoğrel ve MRS 2395 (1, 10 ve 30 mg/kg) diyabetik nöropati oluşturulan farelerde doz bağımlı olarak ağrı eşiğini önemli ölçüde artırdı.

Sonuç olarak; antitrombotik ilaç olarak yaygın kullanıma sahip klopidoğrel ile yeni keşfedilen MRS 2395'in in vitro deneylerde hücre içi kalsiyum oranlarında artış oluşturduğu ve in vivo deneylerde de ağrı eşiğini yükselttiği görülmektedir. Bu bulgular klopidoğrel ve MRS 2395'in nöropatik ağrı tedavisinde terapötik potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Klopidoğrel, MRS 2395, kalsiyum, ağrı

ABSTRACT

EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF THE ROLE OF P2Y₁₂ RECEPTORS IN NOCICEPTIVE PROCESSES

According to data from the World Health Organization in 2002, has approximately 177 million diabetics and in 2025 this number is expected to reach 300 million. Diabetic patients, depending on the level of the regulation of blood sugar, about half are in the neuropathy. Painful diabetic neuropathy in developed countries is the most common cause neuropathy.

Diabetic neuropathy has not been fully understood causes and there is no ideal treatment is still effective. In this thesis, pathophysiology of neuropathic pain possible role of the P2Y₁₂ receptor subtype and selective antagonist of these receptors as potential therapeutic role of clopidogrel and MRS 2395 painful diabetic neuropathy were examined.

Dorsal root ganglia (DRG) were removed from 1-2 day old neonatal rats after decapitation and DRG neurones were isolated by enzymatic and mechanical procedures. Fluorescent calcium imaging studies can be made to the effect of clopidogrel and MRS 2395 intracellular free calcium levels were investigated. Both agents dose-dependent as also in the amount of intracellular free calcium led to significantly increased.

In in vivo experiments, hot plate analgesimeter was used to determine pain threshold from latency of the nociceptive behavior. clopidogrel and MRS 2395 (1, 10 ve 30 mg/kg) significantly increased the pain threshold when diabetic neuropathy was induced.

In conclusion; the widespread use of antithrombotic drug clopidogrel and newly discovered MRS 2395 created an increase in intracellular calcium ratio and increased pain threshold. This finding indicates that, in the treatment of neuropathic pain seems to have potential therapeutic clopidogrel and MRS 2395.

Key words: Clopidogrel, MRS 2395, calcium , pain

İÇİNDEKİLER

İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Sinirlerde İstirahat Membran Potansiyeli	1
1.2. Membran Uyarılabilirliği ve Aksiyon Potansiyeli	1
1.3. Membran İyon Kanalları ve İyon Seçiciliği	2
1.4. İyon Kanallarının Kapı Özellikleri	4
1.5. Membran İyon Kanalları	4
1.5.1. Klor Kanalları	4
1.5.2. Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları	5
1.5.3. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları	6
1.5.4. Proton Kapılı İyon Kanalları	7
1.5.5. Voltaj-Kapılı Kalsiyum Kanalları	8
1.5.5.1. Kalsiyum Kanal Alt Birimleri	9
1.5.5.2. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının Sınıflandırılması	10
1.5.5.3. Kalsiyum Kanal Tipleri	11
1.5.5.3.1. L Tipi Kalsiyum Kanalları	11
1.5.5.3.2. Nöronal Tip Kalsiyum Kanalları	12
1.5.5.3.3. T tipi kalsiyum kanalları	12
1.6. Dorsal Kök Gangliyonu Nöronlarının Sınıflandırılması ve Özellikleri	13
1.7. Ağrı	14
1.7.1. Ağrının Sınıflandırılması ve Özellikleri	15
1.7.1.1. Nosiseptif Ağrı	17

1.7.1.2. Nöropatik Ağrı	18
1.7.2. Ağrının Bastırılması (Analjezi)	19
1.7.3. Ağrı Modelleri	21
1.7.3.1. Deneysel Ağrı Modelleri	21
1.7.3.2. Hücresel Ağrı Modelleri	21
1.8. Diyabet	22
1.9. Pürinerjik Sistem	24
1.9.1. Pürinerjik Reseptör Alt Tipleri	28
1.9.1.1. P1 Reseptörleri	28
1.9.1.2. P2X Reseptörleri	29
1.9.1.3. P2Y Reseptörleri	29
1.9.1.4. P2Y12 Reseptörü	31
1.9.2. Pürinerjik Sistem ve Ağrı	32
1.9.3. P2Y Reseptörleri ve Ağrı	33
1.10. Klopidoğrel	34
1.11. MRS 2395	35
2. GEREÇ VE YÖNTEM	37
2.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyon Nöronlarının Primer Kültürü	37
2.1.1. Kültür İçin Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Ajanlar	37
2.1.2. Kültür Vasatı	39
2.1.3. Kültür İçin Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri	39
2.1.4. Diseksiyon Malzemeleri	39
2.1.5. Diğer Ekipmanlar	39
2.1.6. Dorsal Kök Gangliyonu Hücre Kültürü İçin Genel Prensipler	40
2.1.7. Dorsal Kök Gangliyonu Hücre Kültürü Protokolü	40
2.2. Flüoresan Kalsiyum Görüntüleme	42
2.3. Hücre İçi Kalsiyum Görüntüleme ve Görüntü analizleri	42
2.4. <i>In Vivo Hot Plate</i> Testinde Nosiseptif Davranış Yöntemiyle	

Ağrı Eşiğinin Belirlenmesi	45
2.4.1. <i>Hot Plate</i> Testi	45
2.4.1. 1. Normal Farelerde <i>Hot Plate</i> Testi	46
2.4.1. 2. Diyabetik Farelerde <i>Hot Plate</i> Testi	47
2.5. İstatistiksel Metot	47
3. BULGULAR	48
3.1. Giriş	48
3.1.1. Hücre İçi Flüoresan Kalsiyum Görüntüleme Bulguları	48
3.1.1.1. Klopidoğrelın Dorsal Kök Gangliyonlarında Hücre İçi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkileri	48
3.1.1.2. MRS 2395'in Dorsal Kök Gangliyonlarında Hücre İçi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkileri	55
3.1.2. Normal ve Diyabetik Farelerde Ağrı Eşiğinin Tespit Edilmesi	62
3.1.2. 1. Diyabetik Farelerde Klopidoğrelın ve MRS 2395'in Ağrı Eşiği Üzerine Etkisi	62
4. TARTIŞMA	66
4.1. Kalsiyum Görüntüleme Deneyi Bulguları	66
4.2. Hot-Plate Testi Bulguları	69
5. KAYNAKLAR	71
6. ÖZGEÇMİŞ	93

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. VKKK'nın tarihsel gelişimi.	11
Tablo 2. Pürin ve pirimidin reseptör alt tiplerinin genel dağılımı, agonist ve antagonistleri ile iletim mekanizmalarını gösteren tablo.	27
Tablo 3. Klopidoğrelın sıçan DKG nöronlarında hücre içi kalsiyum düzeylerine etkilerinin özetlenmesi.	49
Tablo 4. Klopidoğrelın sıçan DKG nöron kültürlerinde hücre içi bazal kalsiyum düzeylerine etkisi.	49
Tablo 5. MRS 2395'in sıçan DKG nöronlarında hücre içi kalsiyum düzeylerine etkilerinin özetlenmesi.	55
Tablo 6. MRS 2395'in sıçan DKG nöron kültürlerinde hücre içi bazal kalsiyum düzeylerine etkisi.	56
Tablo 7. Normal ve diyabetik farelerin hot-plate testinde ağrı eşiğı değeri	62
Tablo 8. Klopidoğrel için hot-plate testi uygulanan diyabetik farelerde ağrı eşiğı değeri.	63
Tablo 9. MRS 2395 için hot-plate testi uygulanan diyabetik farelerin ağrı eşiğı değeri.	64

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Ağrı sinyal yolu	16
Şekil 2.	Duyusal nöron tipleri	17
Şekil 3.	Klopidogrel'in kimyasal yapısı	34
Şekil 4.	MRS 2395'in kimyasal yapısı	35
Şekil 5.	A: CCD-kamera ataşmanı aracılığı ile çekilen fotoğrafta sıçan DKG sinir hücrelerinin aydınlık alan görünümü, B: Fura 2 AM ile yüklenmiş 1 günlük kültüre DKG hücrelerinin flüoresan görünümü	44
Şekil 6.	Flüoresan kalsiyum görüntüleme sisteminin fotoğrafik görünümü	45
Şekil 7.	Hot-plate analjezimetre cihazının fotoğrafik görünümü	46
Şekil 8.	10 nM klopidogrel'in sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi	50
Şekil 9.	100 nM klopidogrel'in sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi	51
Şekil 10.	300 nM klopidogrel'in sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi	52
Şekil 11.	Ca^{+2} free solüsyonu içeren lamellerde 100 nM klopidogrel'in sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi	53
Şekil 12.	Klopidogrel'in sıçan DKG hücrelerinde meydana getirdiği farklı kalsiyum artış patternleri A) Klopidogrel'in indüklediği uzun süreli kalsiyum artışı B) DKG nöronlarında klopidogrel'in meydana getirdiği kalsiyum osilasyonları.	54
Şekil 13.	100 nM MRS 2395'in sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi	57
Şekil 14.	1 μ M MRS 2395'in sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi	58
Şekil 15.	10 μ M MRS 2395'in sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi	59
Şekil 16.	Ca^{+2} free solüsyonu içeren lamellerde 1 μ M MRS 2395'in sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi	60
Şekil 17.	MRS-2395 sıçan DKG hücrelerinde meydana getirdiği farklı kalsiyum artış patternleri A) MRS-2395 indüklediği uzun süreli kalsiyum artışı B) DKG nöronlarında MRS-2395 meydana getirdiği kalsiyum osilasyonları.	61

Şekil 18. Klopidoğrelın (1, 10 ve 30 mg/kg, i.p.) hot-plate testi uygulanan normal farelerde ısı uyaranaına karşı verdiği yanıtın ortalama $\pm$ SH değeri 64

Şekil 19. MRS 2395'in (1,10 ve 30 mg/kg, i.p.) hot-plate testi uygulanan normal farelerde ısı uyaranaına karşı verdiği yanıtın ortalama $\pm$ SH değeri 65

KISALTMALAR LİSTESİ

[Ca²⁺]_i	: Hücre içi serbest kalsiyum
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
ADİK	: Aside Duyarlı İyon Kanalları
ADP	: Adenozin difosfat
AP	: Aksiyon Potansiyeli
ATP	: Adenozin trifosfat
Ba⁺²	: Baryum İyonu
BTZ	: Benzotiyazepin
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
Cl⁻	: Klor İyonu
Cs⁺	: Sezyum
DHP	: Dihidropiridin
DKG	: Dorsal Kök Gangliyonu
DNAz	: Deoksiribo nükleik asitaz
DVA	: Düşük Voltajla Aktive Olan
F	: Florür
FAA	: Fenil Alkil Amin
G-Protein	: Guanidin Bağlayıcı Protein
H⁺	: Hidrojen iyonu
IASP	: Uluslararası Ağrı Çalışmaları Birliği
IP₃	: İnoзитol trifosfat
İMP	: İstirahat Membran Potansiyeli
K⁺	: Potasyum İyonu
KCl	: Potasyum klorür
KFTR	: Kistik Fibrozid Transmembran Regülatör
Li⁺	: Lityum İyonu
Mg⁺²	: Magnezyum İyonu
mV	: Milivolt

Na⁺	: Sodyum İyonu
NaCl	: Sodyum Klorür
NaHCO₃	: Sodyumbikarbonat
NGF	: Sinir Büyütme Faktörü
NH₄	: Amonyum
NO	: Nitrik oksit
OH	: Hidroksil
P	: Pürinerjik
PBS	: Steril Dulbeco'nun Tamponlanmış Fosfat Tuzu
PKİK	: Proton Kapılı İyon Kanalları
pS	: Piko Simens
Rb⁺	: Rubidyum
ROS	: Reaktif oksijen türü
sAMP	: Siklik Adenozin Mono Fosfat
SO₄⁻	: Sülfat
STZ	: Streptozotosin
TEA	: Tetraetilamonyum
TM	: Transmembran
TTX	: Tetrodotoksin
VKKK	: Voltaj kapılı kalsiyum kanalları
VKPK	: Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları
VKSK	: Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları
YVA	: Yüksek Voltajla Aktive Olan

1. GİRİŞ

1.1. Sinirlerde İstirahat Membran Potansiyeli

Bütün canlı hücrelerde membranın iki tarafı arasında bir elektiriksel potansiyel bulunur. İstirahat membran potansiyeli (İMP) denilen bu potansiyel kas veya sinir hücresi tipine göre 60-100 milivolt (mV) arasında değişir. İMP'nin sebebi hücre içi sıvı ile hücre dışı sıvı arasında iyonların farklı konsantrasyonlarda dağılışıdır (1). Kalın sinir liflerinin membran potansiyeli, sinir sinyallerinin iletilmediği istirahat durumlarında yaklaşık -90 mV'dir. Normal membran dinlenme potansiyelinin sabit değeri Na^+ difüzyon potansiyeli, K^+ difüzyon potansiyeli ve Na^+-K^+ pompası tarafından sağlanır. Membranın iki tarafı arasındaki potansiyel farkı, bir iyonun membrandan bir yönde net difüzyonunu önleyecek düzeyde ise, bu potansiyele o iyon için "Nerst Potansiyeli" denir. Bu potansiyelin büyüklüğü, membranın iki tarafındaki iyonların konsantrasyonu ile tayin edilir. Hücre içindeki K^+ hücre dışından 35 kat daha fazladır. Nerst potansiyeli bu orana uygun olarak K^+ iyonu için yaklaşık -94 mV'dir. Membranın içi ile dışı arasındaki Na^+ iyonlarının oranı 0,1'dir. Na^+ için Nerst potansiyeli +61 mV olarak hesaplanır. Normal bir sinir lifinde membranın potasyum iyonuna geçirgenliği sodyum iyonuna göre 100 kat daha fazladır. Bu yüzden bu iki iyon dikkate alındığında membran potansiyeli K^+ potansiyeline yakın bir değer olan -86 mV olarak bulunur. Elektrojenik Na^+-K^+ pompası iki tane K^+ 'yı hücre içine üç tane Na^+ 'yı hücre dışına pompalar. Na^+-K^+ pompası hücre içinden dışına doğru sürekli bir pozitif yükün kaybına neden olur ve membran potansiyeline -4 mV'lık bir katkı sağlar. Bu üç faktörün ortak etkisi ile net membran dinlenme potansiyeli -90 mV olur (2).

1.2. Membran Uyarılabilirliği ve Aksiyon Potansiyeli

Sinir impulsları veya AP sinir veya kas hücreleri gibi uyarılabilir hücrelerde membran potansiyelinde meydana gelen hızlı, kısa süreli ve geçici bir değişikliktir. AP akson veya kas lifi boyunca yayılabilme özelliği ile sinir sisteminde iletişimi sağlayan bilgilerin taşınması görevini görür. AP geliştiğinde membran voltajı dinlenme değeri olan -70'den +30'a 1 ms'den daha kısa süre içinde çıkar ve daha sonra birkaç ms içinde tekrar dinlenme değerlerine geri döner. Zarın bir bölgesinde 1 ms kadar süren bu potansiyel değişikliğinden sonra, zar bu bölgede dinlenme

durumuna dönerken, potansiyel değışikliğı zar boyunca yayılmasına devam eder. Lif boyunca iletilen inforasyonun temel birimi olan bu potansiyel değışikliğıne AP denir (3, 4).

Farklı uyarılabilir hücrelerde mikroelettrot tekniğı ile yapılan gözlemler, dinlenim zar potansiyelinin hücreden hücreye -60 mV ile -95 mV arasında, AP tepe değerin +20 mV ile +50 mV arasında, aksiyon potansiyel süresinin ise 0,5 ms ile 0,5 sn arasında değıştiğini göstermektedir. Farklı hücreler için gözlenen bu çeşitliliğe karşılık, yalıtılmış tek hücrelerde yapılan deneyler, AP büyüklüğünün ve zamanla değışim biçiminin uyarının cinsine ve büyüklüğüne bağı olmadığını göstermektedir. Bir sinir uyarıtısı, sönümlenmeden ve biçim bozulmasına uğramadan bir akson boyunca sabit hızla iletilmektedir. Bu özellikleri anlatmak için sinir lifinin hep ya da hiç davranışına uyduğu söylenir. Yani bir sinir lifi ya iletim durumundadır ya da değildir. İletimde ise AP bu lif için karakteristik, aynı desende ortaya çıkar (4).

VKSK'nın aktivasyonu ile başlatılan bir AP esnasında VKKK açılarak bu AP'nin süresini önemli ölçüde uzatabilir. Kardiyak hücrelerde çok belirgin olan bu durum nöronlarda da meydana gelmektedir. Bazı duyuusal nöronlarda AP süresindeki uzama TTX dirençli Na^+ kanalının aktivasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır (5).

Diğer nöronlarda Ca^{+2} kanallarının bloklanması AP süresini uzatır. Bunun yüksek iletkenlikli Ca^{+2} bağımlı K^+ kanallarının aktivasyonu sonucu oluştuğı sanılmaktadır (6).

1.3. Membran İyon Kanalları ve İyon Seçiciliğı

Hücre zarındaki iyon kanallarının kesikli olarak çalışan, iyon seçici moleküler gözenekler olduğu bilinmektedir. Kanalın yapısını meydana getiren integral proteinler, iç çeperleri polar grup ve yüklü gruplarca sıvanmış, içi su dolu bir gözenek oluşturmaktadır. Bir iyon kanalının belli bir iyonla karşı seçiciliğinde membranın her iki tarafındaki iyonların elektrostatik olarak birbirini itmeleri teorisi kabul görmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar kanallarının iyon seçiciliğine ilişkin çeşitli teoriler ortaya koymuştur. Bu çalışmalara göre Na^+ , K^+ ve Ca^{+2} kanallarının delik yüzeyinde yüksek affiniteli bağlanma bölgesinin olduğu ve bunu yandan kuşatan 2 adet düşük affiniteli bağlanma bölgesinin daha yer aldığı ve iyonun kanaldan geçişi esnasında büyük bir sıçrama hareketi yerine iki adet nispeten yavaş

hareket gösterdiği teorisi ağırlık kazanmıştır. Bu teori iyon bağlanma bölgesine bağlanmada yarış esasına göre seçicilik gösterdiğini vurgular. İlk başta Ca^{+2} kanalları için geliştirilen bu teori, Na^+ ve K^+ kanalları için de geçerlidir. Na^+ kanallarıyla ilgili bir diğer teori ise; katyonların kanalı geçmesinde kanal içindeki iyonlaşmış bir karboksil grubu yardımcı olmaktadır. Bu grup asidik ortamda bir proton bağlayarak negatif yükünü kaybedince kanal bloke olmaktadır. Kanalin en darlaştığı yerde bulunan bu karboksil grubu ile hidrojen bağı yapabilen hidroksil veya amino guruplarını içeren pozitif yüklü birçok iyon da Na^+ kanalından geçebilmektedir. Hidrojen bağı yapamayan, metil grubu içeren pozitif yüklü iyonlar ise Na^+ kanalını geçememektedir (4, 7).

Kapılı kanalları oluşturan makromoleküllerin açık ve kapalı gibi iki farklı konformasyonu vardır. Kapının açılıp kapanması için gerekli konformasyon değişiklikleri, yüklü veya dipolar yapıdaki bir voltaj sensörüne etkiyen elektiriksel kuvvetlerle veya nörotransmitter moleküllerin bağlanmasından doğan kimyasal kuvvetlerle yönetilir (4).

Bir kanal göreceli olarak zayıf olsa bile birçok farklı türden iyonla geçirgendir. İyon kanallarının farklı iyonlara karşı geçirgenlikleri arasında farklılıklar vardır. Örneğin; Na^+ kanalları H^+ 'e karşı yüksek oranda geçirgen iken Ca^{+2} kanalları H^+ ile bloklanmaktadır. Na^+ kanallarının bazı iyonlara karşı geçirgenliği sırasıyla $\text{H}^+ > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{OH-NH}_3 > \text{TI}^+ > \text{H}_2\text{N-NH}_3 > \text{NH}_4 > \text{Ca}^{+2} > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ şeklinde iken, K^+ kanalının iyon geçirgenliği $\text{TI}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{NH}_4 > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{H}_2\text{N-NH}_3$ şeklindedir (7).

Ca^{+2} kanalları, Ca^{+2} 'dan başka Ba^{+2} ve Sr^{+2} 'a oldukça geçirgendir. Bu geçirgenlik hem voltaj kenetleme deneyleri ile hem de bu iki iyonun varlığında aktive edilen AP ile gösterilmiştir (8). Cl kanallarının anyonlara karşı geçirgenliğinin $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ şeklinde olduğu tespit edilmiştir (9).

Bunların dışında iyon kanalları için iyonun hücre içi ve hücre dışı konsantrasyonu da önemli bir faktördür. Nernst denkleminde göre belli potansiyelden sonra iyon zıtlanarak hücre içine girmeye veya hücre dışına çıkmaya başlar.

1.4. İyon Kanallarının Kapı Özellikleri

Hücreler dinlenim halindeyken voltaj kapılı kanalların çoğu kapalıdır. Membran potansiyeli değiştiği zaman kanalların açılması ile sonuçlanan bir dizi konformasyonel değişim meydana gelir (10). VKSK ve VKKK depolarizasyona cevaben açılırlar. Bu açılma Na^+ kanalları ile kıyaslandığında Ca^{+2} kanallarında daha yavaştır. Depolarizasyonun etkisi ile kanalların açılarak içe yönelik Na^+ ve Ca^{+2} akımının gerçekleşmesi sırasında kısa bir gecikme olması kanalın açılmadan önce birden fazla kapalı durum değişikliğine uğradığına işaret eder. Depolarizasyonla açılan bir kanal hiperpolarizasyonun etkisi ile kapanır. Kanalin hiperpolarizasyonla kapanması durumuna “deaktivasyon” denilir. Şiddetli depolarizasyon gibi bazı durumlar voltaj bağımlı iyon kanallarının kapanmasını geciktirebilir (11).

VKPK akımları hücre membranının depolarizasyona karşı, Na^+ kanallarına göre oldukça geç aktive olurlar ve membranın repolarize olmasını sağlarlar. Bunun yanında depolarizasyon sürdükçe Na^+ kanalları kendiliğinden kapanırken K^+ kanalları açıktır (4).

Depolarizasyon sırasında gözlenen iyon kanal akımının zamanla başlangıçtaki aktivitesini kaybetmesine “inaktivasyon” denir (10). Yapılan çalışmalar devam eden depolarizasyon sırasında gözlenen aktivite düşüşünün sadece depolarizasyona değil aynı zamanda özellikle Ca^{+2} kanallarında kalsiyuma bağlı olarak da düşebildiğini göstermektedir (12). Bunun yanında iyon kanalları voltaj bağımlı olarak yavaş bir şekilde de inaktive olurlar (13).

1.5. Membran İyon Kanalları

1.5.1. Klor Kanalları

Klor kanalları birçok hücrenin plazma membranında mevcuttur. Hücre hacminin düzenlenmesi, transepitelyal taşıma, salgı hücrelerinden sıvı salıverilmesi ve membran potansiyelinin stabilizasyonunda önemli rolleri vardır. Klor kanalları hücre dışı ligandlar, hücre içi kalsiyum, siklik Adenozin Mono Fosfat (sAMP), G protein, hücre şişmesi, mekanik gerilim ve transmembran (TM) voltaj etkisi ile aktive edilebilir (14, 15).

Günümüze kadar yapısal olarak birbirinden çok farklı 3 büyük klor kanal ailesi klonlanmıştır (16). Bunlar voltaj kapılı klor kanalları, GABA ve glisin tarafından

açılan ligand kapılı klor kanalları ve Kistik Fibrozid Transmembran Regülatör (KFTR) geni tarafından kodlan bir protein tarafından oluşturulan sAMP bağımlı klor kanallarıdır.

Voltaj kapılı klor kanalları epitel hücreleri ve uyarılabilir hücrelerde bulunur. Voltaj kapılı klor kanalları bulundukları dokulara göre membran potansiyelinin stabilizasyonu, hücre volümünün ve hücre dışı sıvının konsantrasyonunun düzenlenmesi gibi fonksiyonları vardır (17).

Ligand kapılı klor kanalları ağırlıklı olarak sinir dokularından eksprese edilir. İnhibitör sinapslar için klor iletkenliği önemlidir. Bu kanallar açıldığında membran hiperpolarize olur ve depolarizasyon üreten içeriye doğru akımların azalmasına yol açar (18).

sAMP bağımlı klor kanalları daha çok solunum yolları ve sinüslerde salgı epitel hücrelerinde bulunur (19).

Klor kanalları için yüksek afiniteli ve selektif antagonistlerin sayısı diğer iyon kanallarına göre çok azdır. Klor kanallarını etkileyen ajanların çoğu diğer katyon kanallarını da etkilediğinden selektif değildir. Bilinen en selektif ve güçlü antagonistler arasında niflumik asit, poliamin örümcek toksini olan argiotoksin-636 ve akrep venomundan izole edilen klorotoksin yer almaktadır (20, 21).

1.5.2. Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları

Potasyum duyarlı kanallar iyon kanallarının en geniş ve en çok çeşit içeren grubudur (22). Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları (VKPK) bilginin taşınması ve işlenmesi süreçlerinde gereklidir. Presinaptik sonlanmalardan nörotransmitter salıverilmesinin düzenlenmesi, membran dinlenim potansiyelinin oluşturulması ve nöronlarda repolarizasyonu sağlayarak aksiyon potansiyeli (AP)'nin sonlandırılması gibi birçok fonksiyonu vardır (23). Ayrıca potasyum kanalları sıvı homeostazisini, sinir dokularında sinyalleşmeyi, kas kasılmasını da düzenler. Bu düzenlemeler hücre zarından potasyum iyonlarının difüzyonunu sağlayan içi su dolu kanalların açılıp kapanmasıyla başlar (7). VKPK'ler lipid membran boyunca 4 protein alt birimi tarafından sarılan K^+ ya duyarlı su dolu bir pordan oluşur. Her bir alt birim 6 TM segmentten (S1–S6) oluşur. İlk 4 segment (S1–S4) voltaj sensör bölümünü, kalan 2 segment (S5–S6) ise kanalın gözenek bölgesini oluşturur (24).

Moleküler olarak incelendiğinde on ikinin üzerinde α alt birimi (25) ve 3 farklı β ($\beta 1-3$) alt birimi (26) olan VKPK'lerin alt tipleri ile ilgili yapılan çalışmalarda VKPK'lerin gecikmiş-doğrultucu K^+ kanalları, içeri yönelik K^+ kanalları, hızlı geçici A tipi VKPK ve yavaş aktive olan VKPK şeklinde sınıflandırılmıştır. Aynı zamanda Ca^{+2} bağımlı K^+ kanalları, adenosin tri fosfat (ATP) veya serotonin tarafından kapı kontrolü yapılan ligand kapılı K^+ kanalları ve bunlara ilaveten Na^+ bağımlı K^+ kanalları ve hücre hacmine duyarlı K^+ kanalları da bulunmaktadır (27).

K^+ kanal alt tiplerinin farmakolojik ajanlara karşı duyarlılıkları diğer iyon kanalları alt tiplerinde olduğu gibi büyük oranda birbirlerinden farklılık gösterir. Örneğin; gecikmiş-doğrultucu potasyum kanal blokörleri; tetraetilamonyum (TEA), dendrotoksin, 4-aminopiridin, kapsaisin, reziniferatoksin, flekainit, nifedipin, diltiazem, karbodotoksin, kalitoksin, fensiklidin, falloidin, 9-aminoakridin, hongotoksin-1, margatoksin, imperator toksin (28-30) gibi ajanlarla, hızlı geçici A tipi VKPK; 4-aminopiridin, TEA, UK78282, riluzol, nikardipin (30-33) gibi ajanlarla, yavaş aktive olan VKPK; kinidin (34) ve içeri yönelik K^+ kanalları; astemizol, BeKM-1, ergotoksin, sertindol, dofelit, sisaprid, pimozid, terfenadin, halofantirin, BRL32872, E-4031, haloperidol, imipramin, kokain, ketokonazol gibi ajanlar tarafından bloke edilebilir (35-37). Ca^{+2} bağımlı K^+ kanalları ise iberiotoksin, tubokurarin, karibdotoksin, noksiustoksin, penitrem-A, TEA, apamin, trifloroperazin ve haloperidol tarafından bloklanır. Aynı zamanda bu kanalın açıcıları arasında NS004, NS1619, DHS-1 yer almaktadır (38) . Bunlara ilaveten Na^+ bağımlı K^+ kanallarını Mg^{+2} , Ba^{+2} , hücre hacminin artışıyla aktive olan hücre hacmine duyarlı K^+ kanallarını, kinidin, lidokain, setiedil, ATP duyarlı K^+ kanallarını ise glibenklamid, tolbutamid, fentolamin, siklazindol ve lidokain bloklar. ATP duyarlı K^+ kanal açıcıları ise levkromakalim, diazoksit, aprikalim ve pinasilidir (39, 40).

1.5.3. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları

Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları (VKSK) uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin (AP) oluşması ve yayılması için gerekli bir TM proteindir (41). VKSK farmakolojik olarak tetrodotoksine (TTX) duyarlı ve TTX'e dirençli Na^+ kanalları olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Kanalın TTX'e duyarlı veya dirençli olmasını belirleyen α alt birimleridir (42). Memeli sodyum kanalları 260 kDa ağırlığındaki

kanalın kor proteinini kodlayan α alt birimi ve 30 – 40 kDa ağırlığındaki kanal fonksiyonlarını değiştirmeye yardımcı olan β alt biriminden oluşur (41). Günümüze kadar 9 α (α_{1-9}) alt birimi (42) ve 4 β (β_{1-4}) alt birimi (43) tanımlanmıştır. α alt birimi 4 bölgeden (I–IV) oluşur ve her bölge 6 α TM sarmalı (S1–S6) içerir. Farmakolojik ajanların hepsi sodyum kanallarının α alt birimi üzerinden etkileri gösterirler. Nörotoksinler için en az 6 farklı ve lokal anestezikler ve ilişkili ilaçlar için bir reseptör bölgesi tanımlanmıştır (44).

TTX kanalın S1 ve S2 bölgelerindeki hidrojen bağlarının oluşturduğu kanal porunun dışına bağlanır. I. alt birimin S2 bölgesi TTX bağlanması için çok önemlidir (45). Bu spesifik bağlanmadan dolayı TTX sodyum kanallarını bloklamada çok sıklıkla kullanılan kimyasal bir ajandır. Bununla birlikte TTX'e yüksek konsantrasyonlarda bile dirençli olan çeşitli sodyum kanalları da vardır (46). TTX dirençli kanallar daha çok küçük ağrıya spesifik nöronlarda eksprese edildiğinden bu kanalların ağrı duyusunda özel rollerinin olduğunu düşündürür (47). Genel olarak kabul edilen aksonal AP'nin iletilmesinden TTX duyarlı kanalların, ağrı sinyallerinin iletiminden ise TTX dirençli kanalların sorumlu olduğudur (48).

Akrep, deniz anemonu, yılan, örümcek ve böcek zehirlerinden elde edilen toksinler VKSK'ların α alt birimi üzerindeki 9 farklı reseptör bölgesini tanımlamak için kullanılmıştır. Bu bölgelerin hepsi kanal fonksiyonunun spesifik etkileri ile ilişkilidir fakat bugüne kadar sadece 1-5 bölgeleri moleküler olarak tanımlanmıştır (49). 1. bölgeye bağlanan toksinler fiziksel olarak poru kapatıp iyon transportunu etkilerler. Bu toksinler TTX, saksitoksin ve ω konotoksindir.

1.5.4. Proton Kapılı İyon Kanalları

Proton Kapılı İyon Kanalları (PKİK)/ Asit Duyarlı İyon Kanalları (ADİK) mekanosensör dejenere/epitel Na^+ kanal ailesine ait kanallardır (50). Bu kanallar ekstrasellüler pH seviyesindeki değişikliklere (pH=7.4 ile 4) cevaben açılıp kapanırlar (51). ADİK hücre dışı asidozis tarafından aktive edilen voltaj-bağımsız katyonlara geçirgen iyon kanallarıdır (52). Asit duyarlı iyon akımları ilk kez duyuşal nöronlardan rapor edilmiştir (53). 4 ADİK geni en az 6 ADİK alt birimini (ADİK 1a, 1b, 2a, 2b, 3, ve 4) kodlar (54).

ADİK alt birimleri merkezi ve periferik nöronlarda eksprese edilir. H^+ -kapılı akımların özellikleri bu hücrelerde eksprese edilen ADİK alt birimleri tarafından belirlenir. ADİK1a, ADİK2a, ve ADİK2b özellikle serebral korteks, hipokampus, amigdala, olfaktor bulbus ve serebellum olmak üzere beyin birçok bölgesinde eksprese edilir (55). ADİK-3 miyelinsiz küçük çaplı peptiderjik nosiseptörler ve büyük çaplı mekanoreseptörlerin yanı sıra duyuşal sinir terminallerinde ve serbest sinir uçlarında da bulunmaktadır (55).

ADİK'ler hücre dışı protonlar tarafından aktive edildikleri için hücre dışı asidozis dahil birçok biyolojik olayda rol alır (56). İnflamasyon, enfeksiyon, nöbet, iskemi ve inme gibi durumlarda asidozis de gelişmektedir (52). Hücre dışı asidozis ADİK1a'yı aktive ederek nöronal hasar ve nöronal ölümü indükler. Ayrıca ADİK'ler inflamasyonda asidozin indüklediği ağrıya aracılık eder. Farelerde ADİK1a aktivasyonun farmakolojik olarak önlenmesi veya *Asic1* geninin mutasyonunun serebral iskemiye bağılı nöronal ölümü belirgin bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (57). Bu yüzden ADİK1a'yı hedef alan farmakolojik tasarımlar insanlarda inmemin başlattığı beyin hasarını sınırlayabilir veya önleyebilir (58).

Proton kanallarının klasik inhibitörleri inorganik maddeler olan çok değerlikli katyonlardır. Zn^{+2} voltaj kapılı proton kanallarının en güçlü inhibitörüdür (59). İnhibitör olarak etki eden iki değerlikli metal katyonların etkinlik sıralaması $Zn^{+2} \approx Cu^{+2} > Ni^{+2} > Cd^{+2} > Co^{+2} > Mn^{+2} > Ba^{+2}$, Ca^{+2} , $Mg^{+2} \approx 0$ şeklindedir (60). İki değerlikli bu metallerin yanında La^{+3} , Gd^{+3} ve Al^{+3} gibi metallerde inhibisyon yaparlar.

1.5.5. Voltaj-Kapılı Kalsiyum Kanalları

Kalsiyum birçok hücreşel fonksiyonun düzenlenmesinde önemli rolleri olan bir iyonudur. Kas kasılmasının başlatılması, sinir sonlanmalarından nörotransmitterlerin ve sekretuar hücrelerden hormonların salıverilmesinin tetiklenmesi, hücre döngüsü ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve hücre ölümü gibi birçok olayda görev alır. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu hücre dışından oldukça düşük seviyededir. Ca^{+2} 'nin hücre içinde kısa süreli artışı birçok hücrede 2. haberci reseptör çiftini aktive eder. Ca^{+2} 'nin hücre içindeki bu artışı voltaj veya ligand kapılı kalsiyum kanallarının vasıtasıyla hücre dışından Ca^{+2} girişi ya da hücre içi depolardan (inozitol 1,4,5

trifosfat (IP_3) ve ryanodin reseptörü/kalsiyum (RyR) salıverilme kanalı) Ca^{+2} salıverilmesi ile olur (10).

1.5.5.1. Kalsiyum Kanal Alt Birimleri

Kalsiyum kanalları çeşitli genler tarafından kodlanan biyokimyasal olarak 4 veya 5 farklı alt birimden oluşmuş kompleks proteinlerdir (61). Bunlar; α_1 , $\alpha_2\delta$, β ve γ alt birimleridir. 190-250 kDa ağırlığındaki α_1 alt birimi en büyük alt birimdir ve voltaj saptayıcılığı ve Ca^{+2} 'a geçirgen gözenekleriyle Ca^{+2} akışının kontrolünü yapar. Sodyum kanallarının α_1 alt birimlerinde olduğu gibi voltaj kapılı kalsiyum kanalları (VKKK) da 4 homolog bölge ve her bölgede 6 TM segment (S1–S6) içerir. S4 segmenti voltaj algılayıcı olarak görev yapar. S5 ve S6 TM segmentler arasındaki por halkası iyon iletkenliği ve seçiciliğini belirler (62). β alt birimi tüm yüksek voltajla aktive olan (YVA) kanalların α_1 alt birimi ile birlikte eksprese olan hücre içi yardımcı bir alt birimdir. Düşük voltajla aktive olan (DVA) kanalların α_1 alt birimi ile β alt biriminin birlikte ekspresyonu henüz gösterilememiştir (63). Bugüne kadar farklı genler tarafından kodlanan 4 β alt birimi izoformu (β_{1-4}) tanımlanmıştır (64). 125.0 kD ağırlığındaki $\alpha_2\delta$ alt birimi Ellis ve ark. (65) tarafından klonlanmıştır. Günümüzde 3 yeni $\alpha_2\delta$ alt birimi daha ($\alpha_2\delta$ -2, 3, 4) klonlanmıştır (66). γ alt birimi bir integral membran proteinidir. İlk olarak, 25.1 kDa ağırlığında 222 aminoasit içeren γ -1 alt birimi tavşan iskelet kasından pürifiye edilmiştir (67). Chu ve ark. (68) γ alt birim ailesini sıçan, fare ve insanda analiz etmiştir. Sıçan dokularında 3 yeni genide içeren 8 γ alt biriminin ekspresyonu tanımlanmıştır ve bu genlerin örnekleri insan ve farelerde de gösterilmiştir. Hücre içi bir β alt birim ve disülfid bağlı $\alpha_2\delta$ alt birim kompleksi kalsiyum kanallarının çoğu tipinin bileşenlerini oluşturur. A γ alt birimi iskelet kası kalsiyum kanallarında bulunur ve A γ alt birimine benzeyen alt birimler beyin ve kalpte eksprese edilmiştir. Bu yardımcı alt birimler kanal komplekslerinin özelliklerini düzenlemesine rağmen farmakolojik ve elektrofizyolojik olarak kalsiyum kanal çeşitliliği birincil olarak çeşitli α_1 alt birimlerin varlığında artar (69).

1.5.5.2. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının Sınıflandırılması

VKKK'nın ilk sınıflaması farmakolojik ve elektrofizyolojik özellikler temel alınarak yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda bazı kalsiyum kanalları, aktivasyon için sadece küçük bir depolarizasyona ihtiyaç duyarlarken diğer bir kısmının ise göreceli olarak daha yüksek depolarizasyonla açıldığı görülmüştür (70). Bu kriterler baz alınarak kalsiyum kanalları YVA kalsiyum kanalları ve DVA kalsiyum kanalları olarak iki gruba ayrılmıştır.

VKKK'nın ikinci sınıflandırılması 1980'lerde yapılmıştır. Klonlama çalışmalarında kalsiyum kanallarının temel α_1 alt birimi ve birkaç yardımcı β , $\alpha_2\delta$, ve γ alt birimlerinden oluştuğu gösterilmiştir. α_1 alt birimi kanalın temel elektrofizyolojik ve farmakolojik özelliklerden sorumludur. L tipi kalsiyum kanallarında çeşitli α_1 alt birimleri tanımlanmıştır. İlk olarak iskelet kaslarından α_1 alt birimi pürifiye edilmiş (71), klonlanmış ve α_{1S} olarak adlandırılmıştır (72). Daha sonra kalpte (α_{1C-a}) (73) ve düz kasta (α_{1C-b}) (74) α_1 alt birimi klonlanmıştır. Bunları takiben L tipi kanalların alt ailesini temsil eden diğer iki üye α_{1D} (75) ve α_{1F} (76) tanımlanmıştır.

Kalsiyum kanallarının 3 nöronal tipini temsil eden 3 α_1 alt birimi klonlanmıştır. P/Q-tip kanallar α_{1A} alt birimi (77), N tip kanallar ise α_{1B} alt birimi (78) ile eşleşmiştir. α_{1E} alt birimi (79) başlangıçta DVA T-tip kanallara ait olduğu düşünülmüş fakat daha sonra yapılan çalışmalar R tip kanalın özelliklerini taşıdığını göstermiştir. Şu ana kadar α_{1G} (80), α_{1H} (81), ve α_{1I} (82) olmak üzere DVA T-tip kanallarının 3 üyesi tanımlanmıştır.

Kalsiyum kanallarının α_1 alt birimlerinin sayısının gün geçtikçe artması sistematik bir sınıflandırmanın gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bu düşünceyle uyumlu olarak α_1 alt birimleri Cavx.y şemasına göre isimlendirilmiştir (83). Cav voltajla aktive olan kalsiyum kanallarını, x sayısı kanal alt ailesini (L-tip, N-tip ve T-tip) ve y sayısı ise alt ailelerin üyelerini simgeler (Tablo 1).

Tablo 1. VKKK'nın tarihsel gelişimi kaynak (83)'den değiştirilerek alınmıştır.

Aktivasyon Özelliği	Biyofiziksel veya Farmakolojik Tanımlama	α_1 Alt Birimine Göre Sınıflama	Yapısal Sınıflama
YVA	L-Tip	α_{1S}	Cav1.1
		α_{1C}	Cav1.2
		α_{1D}	Cav1.3
		α_{1F}	Cav1.4
	P/Q-Tip	α_{1A}	Cav2.1
	N-Tip	α_{1B}	Cav2.2
	R-Tip	α_{1E}	Cav2.3
DVA	T-Tip	α_{1G}	Cav3.1
		α_{1H}	Cav3.2
		α_{1I}	Cav3.3

1.5.5.3. Kalsiyum Kanal Tipleri

1.5.5.3.1. L tipi kalsiyum kanalları

YVA kalsiyum kanal grubudur. Nöronlarda olduğu kadar iskelet, düz ve kalp kaslarında da bol miktarda bulunurlar. DKG hücrelerinde ilk keşfedilen Ca^{+2} kanalıdır. İletkenliği oldukça yüksektir (25 pS) (84). YVA olan kalsiyum kanallarının inaktivasyon göstermedikleri kabul edilir. Büyük (large) iletkenlikleri ve uzun süreli (long lasting) akım vermelerinden dolayı bu kanallara L tipi kalsiyum kanalları adı verilmiştir (4). Farmakolojik olarak tüm L tipi kanalların karakteristik bir özelliği ya inhibitör (nifedipin, nisoldipin, isradipin) ya da aktivatör (Bay K 8644) olarak etki eden dihidropiridin (DHP) grubuna ait ilaçlara duyarlı olmasıdır (85).

L-tip kanal ailesinin şu ana kadar tespit edilmiş olan 4 alt üyesi (Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3, Cav1.4) vardır. DHP, fenilalkilaminler (FAA) ve benzotiyazepinler (BTZ) gibi ilaçların büyük çoğunluğu organik kanal blokörleridir. Öncül deneysel çalışmalar iskelet kası kanallarında bu 3 ilaç grubunun α_1 alt biriminin tekrarlayan

IV. ve ek olarak III ve I. TM bölgesine bağlandığını göstermiştir (86). Çeşitli çalışmalarda DHP'nin yüksek bir affinite ile bağlanabilmesi ve/veya kalsiyum akımının yüksek bir affinite ile DHP tarafından inhibe edilebilmesi için β , $\alpha_2\delta$ ve γ alt birimlerinin birlikte eksprese olması gerektiğini göstermiştir (87).

Verapamil, gallopamil veya devapamil gibi FAA'lar da L tip akımları bloke eder (88) ve allosterik etkileşim ile DHP'lerin bağlanmasını etkiler. Ek olarak diltiazem gibi BTZ'ler de allosterik etkileşim ile DHP'lerin bağlanmasını etkiler (89).

1.5.5.3.2. Nöronal Tip Kalsiyum Kanalları

1980'lerde nöronlarda yapılan çalışmalar DHP'lere duyarlı olmayan yeni bir kalsiyum kanalını ortaya çıkarmıştır (90). Bu kanallar nöronlarda tespit edildiği için N tipi kalsiyum kanalları olarak adlandırılmıştır. Daha sonra nöronal non-L-tip kalsiyum kanalları örümcek ve yılandan izole edilen peptit toksinlerine duyarlılığına göre alt birimlere (N, P/Q, R) ayrılmıştır. ω -conotoxin GVIA'ya duyarlı olan kanallar N-tipi kalsiyum kanalları olarak kalmıştır. ω -Aga IVA toksinine duyarlı kanallar ise P/Q-tip kalsiyum kanalları olarak adlandırılmıştır (P harfi purkinje hücrelerinden gelir). Bu iki toksine dirençli kanallar ise R-tipi kalsiyum kanallar olarak adlandırılmıştır (R resistant).

N-tip, P/Q-tip ve R-tip kalsiyum akımları aktive olmaları için güçlü depolarizasyonlara ihtiyaç duyarlar. Bu tip kalsiyum akımları göreceli olarak L-tip kalsiyum kanal antagonistleri tarafından etkilenmezler fakat spesifik yılan ve örümcek polipeptit toksinleri tarafından bloklanır. Bunlar primer olarak nöronlarda eksprese edilir ve çoğu hızlı sinapslarda nörotransmisyonu başlatır ve hücre gövdesi ve dentritlere kalsiyum girişine aracılık eder (91).

1.5.5.3.3. T tipi kalsiyum kanalları

DVA kalsiyum kanal grubudur. Hızlıca voltaj bağımlı inaktivasyon gösterirler. İletkenliklerinin küçük (tiny) ve geçici (transient) akım vermelerinden dolayı bu tür kanallar T tipi kalsiyum kanalları olarak adlandırılmıştır (4).

T-tip kalsiyum kanalları sinir sistemi, kalp, böbrek, düz kas ve pek çok endokrin organ dahil olmak üzere vücudun birçok bölgesinden eksprese edilmiştir. Beyindeki T-tip kalsiyum kanalları tekrarlayan düşük eşikli ateşlemeler (92) ve ağrı ile ilişkilidir (93). Kalpte T-tip kalsiyum kanalları sinoatriyal düğümde eksprese edilir

ve sinoatriyal düğümünden çıkan uyarılara katkıda bulunur (94), fakat kalp kasılmasına bir etkisi yoktur. T-tip kalsiyum kanallarının farklı L-tip kalsiyum kanalları ile birlikte mikro dolaşımın düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu gösteren çeşitli arter ve venlerde ekspresyonu gösterilmiştir (95). T-tip kalsiyum kanallarının bronş, ileum, kolon, mesane ve uterus düz kaslarında da eksprese edildiği gösterilmiştir. T-tip kalsiyum kanallarının aldosteron, renin, atrial natriüretik peptit (ANP) ve insülin gibi hormonların salıverilmesinde katkısının olduğu tespit edilmiştir (96, 97). Bütün bunlar göz önünde bulundurulduğunda T-tip kalsiyum kanalları kalp krizi, aritmi ve hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıklar ve epilepsi ve ağrı gibi nöronal hastalıkların tedavisinde yeni tedavi edici ajanlara katkıda bulunabilirler.

Kalsiyum kanal blokörleri (L-tip kalsiyum kanallarını bloke eder) FAA (verapamil), BTZ (diltiazem) ve DHP (nifedipin) olmak üzere 3 büyük gruba ayrılırlar. Bu ilaçlar T ve L tipi kanalların her ikisinde de etki gösteren bazı DHP bileşikleri hariç tutulduğunda tedavi edici dozlarda T-tip kanallarını inhibe etmezler. Flunarizin ve sinnarizin gibi düşük seçicilikteki kalsiyum kanal blokörlerinin T tipi kanallarını inhibe ettiği rapor edilmiştir (98). Bu ilaç hipertansiyon ve anjina pectoris gibi hastalıkların tedavisinde umut verici bir ilaç olabilir (99).

T-tip kanalları bloke eden birçok bileşik vardır fakat bunların çoğu diğer iyon kanal ve taşıyıcılarını da inhibe eder. Günümüze kadar spesifik bir inhibitör bulunamamıştır (98).

1.6. Dorsal Kök Gangliyonu Nöronlarının Sınıflandırılması ve Özellikleri

DKG nöronları somatosensöriyal bilgiyi AP olarak MSS'ye taşır. Bu nöronların iki ana tipi vardır: Birincisi; düşük yoğunluklu, hasar oluşturmeyen ve normalde ağrı vermeyen uyarılara cevap veren non-nosiseptif nöronlar, ikincisi; yüksek yoğunluklu, hasar oluşturu ve normalde ağrı verici stimulusa karşı cevap oluşturan nosiseptif nöronlardır (100). Hücresel elektrofizyoloji çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılan DKG, duyuşal nöronların elektrofizyolojik ve farmakolojik olarak incelenmesinde iyi bir model oluşturmıştır.

DKG nöronları, iletim hızına göre C (≤ 0.8 m/sn), A δ (1.5-6.5 m/sn) ve A α/β (>6.5 m/sn) şeklinde sınıflandırılmaktadır (100). DKG nöronları ile ilgili yapılan

çalışmalar farklı DKG nöronlarının farklı Na^+ (101), K^+ (102) ve Ca^{+2} kanal akımlarına sahip olduğunu göstermektedir (103).

DKG nöronlarının diğer bir sınıflandırması ise çap boyutu açısından yapılmaktadır. DKG nöronları çaplarına göre büyük ($>50 \mu\text{m}$ çap), orta ($30-50 \mu\text{m}$ çap) ve küçük ($<30 \mu\text{m}$ çap) olmak üzere üç alt sınıfa ayrılır. DKG nöronlarında iyon akımlarının biyofiziksel özelliklerinin ve iyon kanal alt birimlerinin dağılımının hücre çapıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (104). Na^+ kanallarıyla ilgili ağrı ve analjezi çalışmalarında küçük çaplı DKG nöronları kullanılmaktadır. Bunun nedeni, büyük ve orta çapa sahip DKG nöronlarına kıyasla küçük çaplı nöronlarda daha fazla sayıda ve farklı tipte VKSK'nın eksprese olmasıdır (105). DKG nöronlarında K^+ kanalları ile ilgili yapılan çalışmalarda, hücre çapıyla K^+ kanal alt birimlerinin yoğunluğu arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (106). Ca^{+2} kanalları ile ilgili yapılan çalışmalarda da kanal alt birimi ve kanal yoğunluğunun DKG hücre çapıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bazı Ca^{+2} kanal alt birimleri küçük veya orta çaplı nöronlarda daha yoğun şekilde eksprese olurken bazı altbirimler ise büyük çaplı nöronlarda eksprese olmaktadır. Örneğin α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1E} , α_{1I} ve α_{1S} alt birimleri tüm DKG nöronlarında eksprese olurken, α_{1A} , α_{1D} , α_{1E} , α_{1I} ve α_{1S} 'nin küçük çaplı DKG nöronlarında daha yoğun bir şekilde eksprese olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında büyük çaplı DKG nöronlarına göre α_1 ve $\alpha_{2\delta}$ alt birimleri küçük ve orta çaplı nöronlarda daha yoğun şekilde eksprese olmaktadır (107).

1.7. Ağrı

Uluslararası Ağrı Çalışmaları Birliği (IASP) ağrıyı gerçek veya potansiyel doku hasarı ile ilişkili olarak ortaya çıkan, hoş olmayan duyu ve emosyonel deneyim olarak tanımlamaktadır (108). Bir başka tanıma göre ise ağrı; “bedenin içten ya da dıştan bir uyarı karşısında gösterdiği bir savunma mekanizması”dır. Böylelikle ağrı, vücut için bir şeylerin yolunda gitmediğinin sinyallerini veren koruyucu bir mekanizma olarak da düşünülmektedir (109). Ağrı yalnızca bir duyu değil aynı zamanda bu duyuya karşı ortaya çıkan emosyonel reaksiyondur. Ağrı çok boyutlu bir deneyimdir ve her kişi için özeldir. Nörofizyolojik, biyokimyasal, psikolojik, etnik, kültürel, dinsel, bilişsel ve çevresel boyutları olan karmaşık bir duyumdur. Çocukluk çağından itibaren yaşanan deneyimler ile öğrenilir. Ağrıya karşı oluşan reaksiyon

değişkendir. Kişilik özellikleri, duygu durumu, etnik alt yapısı, geçmiş deneyimleri, ağrı ile başedebilme becerisi ve ailenin tutumu gibi faktörler ile belirlenir (108).

1.7.1. Ağrının Sınıflandırılması ve Özellikleri

Ağrı sınıflaması ile ilgili birçok farklı görüş vardır ve ağrı sınıflaması henüz ideale ulaşmamıştır. Ağrı nörofizyolojik özelliklerine göre sınıflandırıldığında nosiseptif, nöropatik ve psikojenik ağrı olarak incelenmektedir. Nosiseptif ağrının somatik ve visseral, nöropatik ağrının ise santral ve periferik ağrı alt grupları vardır (108).

Ağrı süresine göre sınıflandırıldığında ise akut, kronik ve rekürren ağrı olarak ayrılmaktadır. Akut ağrı doku hasarı ile ilişkili olarak oluşur ve iyileşme sürecine uyumlu olarak ortadan kalkar. Kronik ağrı ise beklenenden daha uzun süren veya iyileşme sürecinden sonra devam eden ağrıdır. Bu süre farklı kaynaklarda 3 veya 6 ay olarak tanımlanmaktadır (108, 110). Romatoid artritte olduğu gibi ağrı devam eden patolojiye bağlı oluşuyorsa bu uzamış akut ağrı olarak kabul edilir. Ağrı uzun süre devam ettiğinde kişi fizyolojik ve davranışsal adaptasyon geliştirir. Ağrının iki parametresi vardır; patoloji ve süre. Bu bakış açısından bakıldığında kısa süreli ve belirgin fiziksel patoloji olan durumlarda akut ağrı, düşük fiziksel patoloji ve uzun süreli durumlarda ise kronik ağrıdan bahsedilir (111).

Ağrı duyusunun reseptörleri, vücudun hemen her noktasında bulunan çıplak sinir uçlarıdır. Ağrı duyusu, merkezi sinir sistemine (MSS) DKG nöronları ile taşınır. DKG nöronları fonksiyonel olarak üç subsellüler kısma ayrılır.

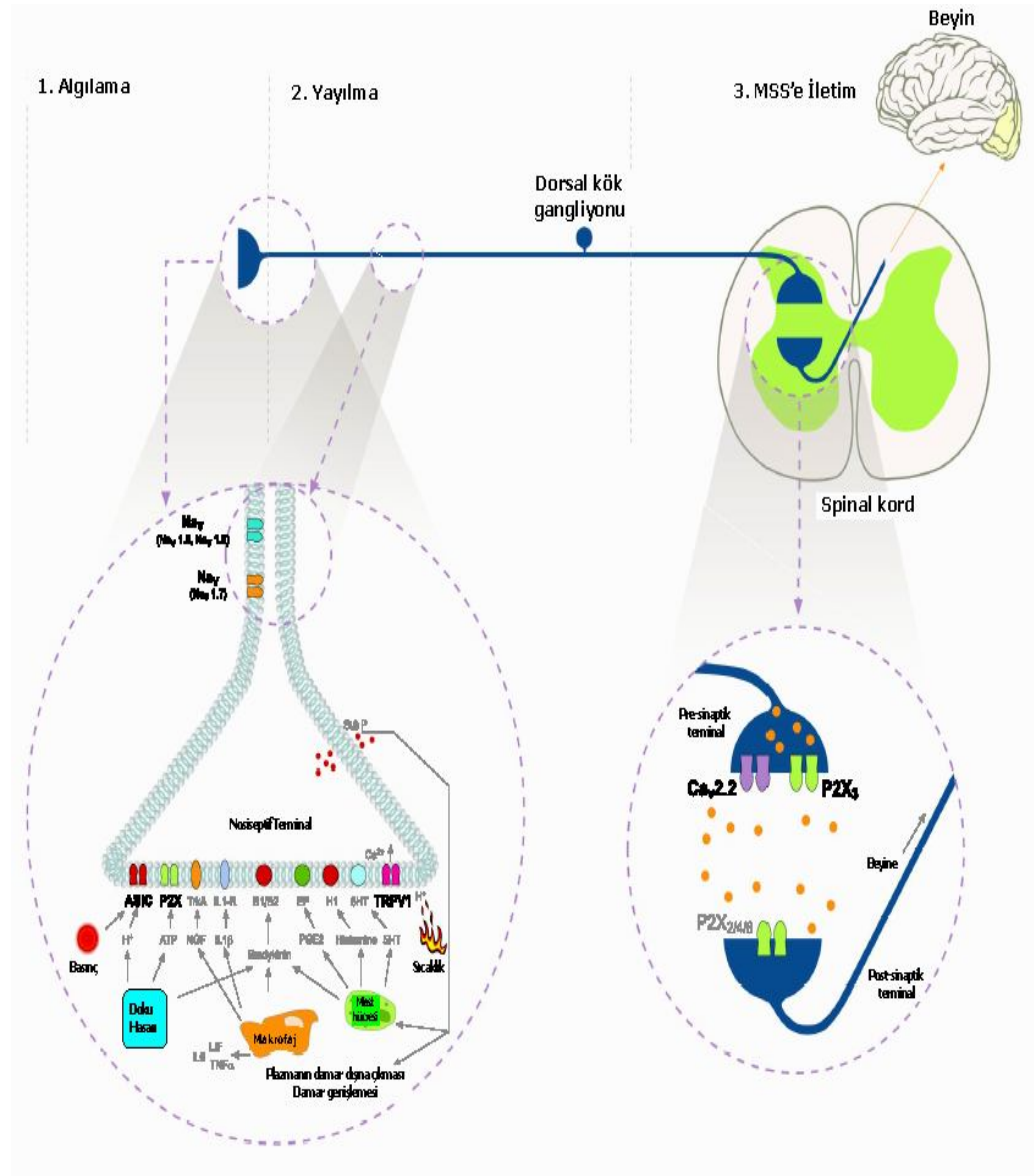
1. Ağrı duyusuna neden olan uyarıyı (mekanosensitizasyon, termal sensitizasyon, nosisepsiyon) algılayan nosiseptör periferik sonlanma.
2. Nosiseptif sinyali ileten akson.
3. Ağrı sinyalinin ilerleyip bir sonraki nörona ve beyine ulaşmasını sağlayan presinaptik terminal (Şekil 1).

Duyusal nöronların hücre gövdeleri üç dallıdır ve DKG'ye yerleşmiştir (112). Primer duyusal nöronların morfolojik ve fonksiyonel olarak; A α / β , A δ ve C tipi lifleri bulunmaktadır (Şekil 2).

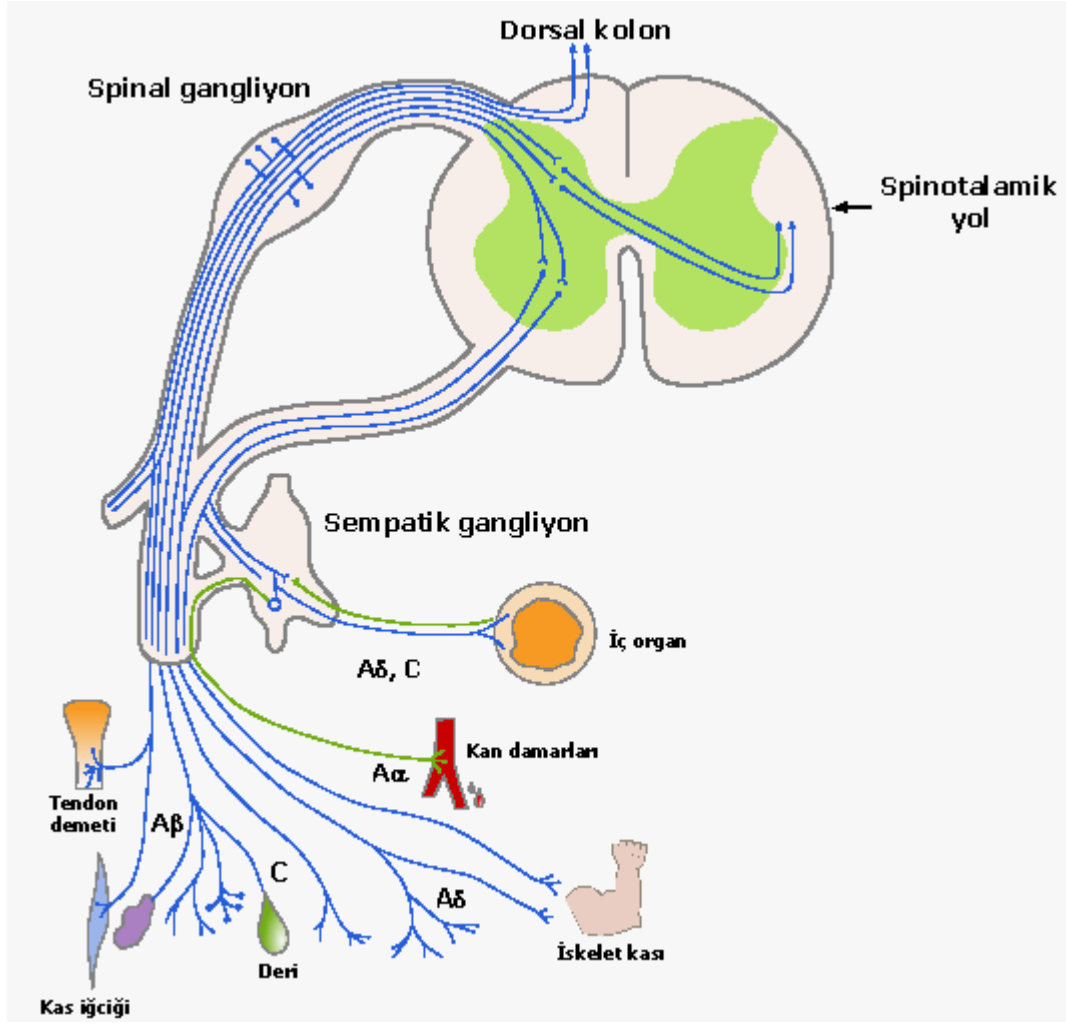
Ağrı sinyalleri iletim hızlarına göre farklı tip liflerle taşınmaktadır. Hızlı ağrı sinyalleri miyelinli A δ lifleri (1.5-6.5 m/sn) ile, kronik ağrı sinyalleri ise yavaş

miyelinsiz C tipi lifler (≤ 0.8 m/sn) ile medulla spinalise iletilirler (100). Kronik ağrılı hastalarda C tipi liflerin iletim hızının daha da düşük olduğu gösterilmiştir (113). C tipi lifler, arka köklerin lateral bölümünde yer alır ve çoğunlukla arka kök C lifleri olarak adlandırılır.

Yukarıda da bahsedildiği gibi ağrının çok çeşitli sınıflandırılmaları bulunmaktadır. Bu tezde ağrı temel olarak iki tipte incelenmiştir. 1- Nöroseptif ağrı ve 2- Nöropatik ağrı.



Şekil 1. Ağrı sinyal yolu (Kaynak (114)'den değiştirilerek alınmıştır).



Şekil 2. Duyusal Nöron Tipleri (Kaynak (114)'den değiştirilerek alınmıştır).

1.7.1.1. Nosiseptif Ağrı

Ağrı, kapsülsüz sinir sonlarının aktivasyonu sonucu doku yaralanmasıyla oluşur. Bedenin bir bölgesindeki doku yaralanmasında uyarının özelleşmiş sinir uçları ile (nosiseptör) alınıp, santral sinir sistemine götürülmesi, belirli bölge ve nöral yapılarda entegre edilmesi, bu zararlı uyarının algılanması, buna karşı fizyolojik, biyoşimik ve psikolojik önlemlerin harekete geçirilmesidir. Nosisepsiyon, doku hasarı ile ağrının algılanması arasında oluşan karmaşık elektrokimyasal olaylar serisinin bütünüdür (115). Ağrı, nosisepsiyon içinde bir algılama olayıdır (116). Latince *Noci* zarar veya zedelenme anlamındadır. Travmatik veya *noxious* stimulasyona nöral cevaptır. Tüm nosiseptör uyarılar ağrı oluşturur, fakat tüm ağrılar

nosisepsiyondan kaynaklanmaz (117). Aslında nosiseptörler periferik terminalleri ağırlı uyaranlara hassas primer afferent ve tüm deri, deri altı dokularında bulunan çıplak ve serbest sinir uçlarıdır (118). Miyelinsiz C lifleri ile miyelinli A-δ liflerinin distal uzantılarından oluşmuşlardır ve 100-400 µm uzunluğundaki aksonal sonlanmalar, küçük kan damarları ve mast hücreleri kenarında sonlanırlar. A-δ liflerinin uçları genellikle uyarıldıkları tipe göre termal veya mekanik nosiseptörler adını alır ve 1,5-6 m/sn hızda ileti oluştururlar. Dolayısıyla bu nosiseptörlerin aktivasyonu keskin, iğneleyici ve iyi lokalize edilebilen bir ağrı oluşturur. C liflerinin uçları, polimodal nosiseptör adını alır ve şiddetli mekanik, kimyasal, aşırı sıcak ve soğuk uyaranlarla aktive olurlar. C lifleri, enflamasyonda olduğu gibi gecikmiş, yanıcı ve inatçı karakterdeki ağrıdan sorumludurlar. İmpulsları 0.5-2 m/sn gibi çok yavaş olarak iletirler. Dolayısıyla daha donuk, daha yaygın ağrı ve hiperestezi oluştururlar (115, 116).

1.7.1.2. Nöropatik Ağrı

Nöropatik ağrı nöronal ağrı iletim sisteminde periferik ve santral lezyonlarla ortaya çıkan çok şiddetli, genellikle analjeziklere yanıtsız kompleks bir ağrı sendromudur (119). IASP Taksonomi Komitesi tanımlamasına göre nöropatik ağrı sinir sisteminin bir lezyonu veya disfonksiyonu sonucu gelişir, bir disfonksiyon belirtisi olup kendi başına bir hastalık değildir (120). Nöropatik ağrı sendromları heterojendir ve tek bir etiyoloji veya patolojik mekanizma ile açıklanamazlar. Toplam nüfusun %1'inde görülen bu sendromun tedavisi çok zordur ve ağrı yıllarca sürebilir (121).

Nöropatik ağrının nosiseptif ağrıdan en belirgin farkı, sürekli bir nosiseptif uyaranın bulunmamasıdır. Sorunu başlatan fonksiyonel bir bozukluktur ve bu durum diyabet, immün yetmezlikler, enflamatuvar süreçler, malignite, travma ve iskemik durumlar gibi, periferik ya da santral nedenlerden de köken alabilir. Nöropatik ağrı hasardan veya oluşan hasarın şiddetinden bağımsız olarak devam edebilir ve hatta haftalar, aylar, yıllar içinde şiddetlenebilir. Ağrının yanlış tanımlanması, yanlış lokalize edilmesi, algılamanın gecikmesi ve yayılma söz konusudur (122).

Nöropatik ağrıda, ağrı spontan olarak ortaya çıkabilir. Ağrı eşiği düştüğü için normalde ağrısız olan uyarı ağrı oluşturabilir (allodini). Uyarıya verilen cevap hem

sürekli hem de amplitüd bakımından abartılı olabilir (hiperaljezi). Ağrı duyusu sağlam bölgelere yansıyabilir (123). Sinir hasarı sonucu meydana gelen nöropatik ağrının temel mekanizması belirlenememiştir. Ancak yapılan bazı patch kenetleme çalışmalarında periferik sinir hasarını takiben DKG hücrelerinde uyarılabilirlikte artış meydana geldiği ve DKG hücrelerinin anormal spontan aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur (124).

1.7.2. Ağrının Bastırılması (Analjezi)

İnsanların ağrıya karşı gösterdikleri reaksiyon dereceleri çok değişiktir. Bu değişik davranışlar kısmen beynin kendisinin analjezi sistemi denen bir ağrı kontrol sistemini kontrol ederek, sinir sistemine giren ağrı sinyallerini bastırabilmesine bağlıdır. Periferik ağrı lifleri ile omurilikteki arka boynuz hücreleri arasındaki kavşak bağlantıları, oldukça önemli plastisite bölgeleridir. Bu nedenle arka boynuz, ağrı dürtülerinin “kapılandığı”, yani ağrı duyusunun şiddetinin denetlendiği değişikliğe uğradığı yer anlamında olmak üzere, kapı olarak adlandırılır. Ağrının başlatıldığı bir alandan gelen geniş çaplı afferent liflerin uyarılması ile o bölgeden gelen ağrı hafifler (125).

Analjezi sistemi hem C hem de Aδ liflerinin dorsal boynuzda sinaps yaptıkları yerlerde presinaptik inhibisyon yaparak ağrı sinyellerini omurilikte ilk giriş noktasından itibaren bloke edebilir. Bunun yanında analjezi/nosisepsiyon indiksiyonu ve homeostazisin tekrar sağlanabilmesi için Ca^{+2} kanal antagonistleri, proton kapılı kanal antagonistleri, VKSK antagonistleri, VKPK antagonistleri, NMDA reseptör antagonistleri, glutamat reseptör antagonistleri ve GABA’erjik, kolinerjik ve opioid reseptör agonistleri kullanılmaktadır (20, 51, 91, 126-128).

Akut ve kronik ağrının tedavisinde kullanılan analjezikler periferik ve santral etkili analjezikler olarak sınıflandırılabilir. Periferik etkili analjezikler nonopioidlerdir, santral etkililer ise opioid analjeziklerdir (129).

Periferik etkili nonopioid analjezikler parasetamol, aspirin ve nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ)’dir. Bu grup hafif ve orta şiddette ağrının semptomatik tedavisinde kullanılır. Parasetamol para-aminofenol grubundandır, aspirine denk analjezik etkisi vardır, ancak antiinflamatuvar ve antitrombotik etkileri yoktur. Oldukça güvenli olmasına karşın yüksek dozlarda hepatotoksiktir. Aspirin

düşük dozlarda analjezik, yüksek dozlarda antiinflamatuvar etkiye sahiptir. Antipiretik ve antitrombotik etkileri de vardır (129). NSAİİ'ler arasıdonik asitten prostoglandinlerin (PG) oluşumunu sağlayan siklooksijenazı (COX) inhibe ederek etki gösterir. COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki tip siklooksijenaz enzimi vardır. COX-1 enzim inhibisyonu trombosit, mide mukozası ve böbrekler üzerinde etki göstererek yan etkilere neden olur. COX-2 inhibisyonu ise inflamasyon üzerine daha etkilidir. COX-2'nin beyin, böbrek, uterus ve daha az miktarda da gastrointestinal sistemde saptanması bazı fizyolojik görevlerinin olduğunu düşündürmektedir. Kullanılan NSAİİ'ler her iki enzim formunu farklı düzeylerde inhibe etmekte ve bu seçicilik özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Tüm NSAİİ'lerin tavan etkileri vardır. Önerilen dozun üzerinde kullanıldığında analjezik etki artmaz, ancak toksisite artar. Hepsinin atılımı böbrek ve karaciğer yolu ile olmaktadır. NSAİİ'ler aktif ya da geçirilmiş gastrointestinal lezyonu olanlarda, koagülasyon bozukluğu olanlarda, gebelikte ve allerjik reaksiyonu olanlarda dikkatle kullanılmalıdır (129).

Opioid analjezikler kendilerine özgü mü, kappa, sigma, delta ve epsilon reseptörlerine bağlanarak etki gösterir. Opioidler gastrointestinal yoldan iyi emildikleri gibi nazal mukoza ve akciğerlerden de emilimleri söz konusudur. Parenteral etki ise daha belirgindir. Analjezik etkileri birden fazla mekanizma ile gerçekleşir. Afferent sinir uçlarında yer alan mü reseptörleri aracılığıyla nörotransmitterlerin ve P maddesinin salınımını inhibe ederler. P maddesinin ara nöronlarda ve spinotalamik yoldaki nöronlarda olan etkilerini postsinaptik düzeyde duraklatır, böylece noisepatif uyarının yukarı merkezlere geçişini önlerler. Opioidler beyin sapındaki solunum merkezini doza bağımlı olarak inhibe ederler. Morfin opioid ilaçların prototipidir, primer olarak mü reseptörlerine bağlanır. Agonist, antagonist ve her iki etkiye sahip ilaçlar vardır. Endorfin ve enkefalinler ise endojen opioidler olarak bilinirler. Opioidlerin en önemli yan etkisi tolerans gelişimidir. Tolerans uygulanan doza, kullanım yoluna, tekrarlama sıklığına bağılı olarak değişiklik gösterebilir. Analjezik etkiye karşı tolerans yan etkiye karşı olandan daha hızlı gelişmektedir. Diğer bir yan etki ise fiziksel ve psikolojik bağımlılıktır. Ayrıca, sedasyon, konstipasyon, bulantı, kusma, letarji, konsantrasyon bozukluğu gibi yan etkiler görülebilir. Kafa travmalarında, gebelikte, pulmoner fonksiyon bozukluğunda ve karaciğer yetmezliğinde kullanılmamalıdır (129).

1.7.3. Ağrı Modelleri

Birçok çeşitli nedenle ortaya çıkabilen ağrının mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için deneysel ve hücresel olarak geliştirilen ağrı modelleri, ağrı çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadır. Hayvanlarda deneysel olarak oluşturulan değişik ağrı modelleri ve hücresel ağrı modelleri ağrı mekanizmasını anlama ve ağrıya müdahale etme konusunda önemli bilgiler sağlamaktadır (130).

1.7.3.1. Deneysel Ağrı Modelleri

Deneysel ağrı modelleri, çok çeşitli yollarla deney hayvanlarında oluşturulabilir; bu modeller aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir (130).

1. Termal uyarana karşı kuyruk veya ayak çekme modeli (örneğin; kuyruk çırpma testi)
2. Hot plate testi (Sıcak plaka modeli)
3. Mekaniksel duyarlılığı belirleme modeli (Von-Frey filament stimülasyonu)
4. Diş eti stimülasyonu modeli
5. Formalin, antijen, maya vb.den birinin ayak veya intra artikular enjeksiyon modeli
6. Tahriş edici bir maddenin intramusküler enjeksiyonu
7. Tahriş edici solüsyonun intraperitoneal enjeksiyonu
8. Kemik içine osteolitik sarkoma hücrelerinin intramedullar enjeksiyonu
9. İçi oyuk organ distansiyonu
10. Deri kesilmesi
11. Periferik veya spinal sinir veya köklerinin ezilmesi veya sıkıştırılması
12. Periferik veya spinal sinir veya köklerinin kısmen veya tamamen transeksiyonu

1.7.3.2. Hücresel Ağrı Modelleri

Ağrının hücresel ve moleküller mekanizmasının anlaşılması için yapılan çalışmalarda neonatal ve embriyonik sıçanlardan izole edilen duyuşal nöronların primer ve kalıcı kültürleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (131). Bu tez çalışmasında da kullanılan DKG primer hücre kültürü; civciv, fare, sıçan gibi farklı hayvan türlerinden elde edilebilir. Kültüre edilmiş trigeminal ve DKG duyuşal

nöronları ile yapılan çalışmalar, bu nöronların in vivo duysal nöronlarla benzer özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur (132). Duyusal nöronların primer kültürü bu nöronların doğuştan kazanılan birçok özelliğini yansıtmaktadır. Ancak izolasyon prosedürü, hücre sayısının sınırlı olması ve primer kültürün heterojen yapıya sahip olması, primer hücre kültürüyle çalışmanın zorluklarından birkaçıdır. Bu nedenle endojen duysal nöronların özelliklerine sahip olan kalıcı duysal hücre dizileriyle çalışılmaktadır. Kalıcı duysal hücre dizileri; DKG ile retroviral vektör içeren *v-myc* onkojeni ile insan embriyonik duysal nöronlarının ölümsüzleştirilmesiyle elde edilebildiği gibi (133), postmitotik embriyonik veya yetişkin DKG duysal nöronlarının fare N18Tg2 neuroblastoma hücreleriyle etkileşimi ile ölümsüzleştirilmiş hücre dizileri olan F11 ve ND oluşturulabilir (134).

1.8. Diyabet

Diabetes mellitus (DM), insülin salgılanması ya da insülinin etkisindeki tam veya kısmi yetersizlikle ilişkili olarak ortaya çıkan kronik hiperglisemi; karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklar ve bu bozuklukları takiben ileri dönemde ortaya çıkan çeşitli komplikasyonlarla (anjiopati, kardiyomiyopati, nöropati, nefropati ve retinopati gibi) karakterize bir sendromdur (135).

DM'nin bütün tipleri ya dolaşımdaki insülin konsantrasyonlarının azalmasından (insülin yetersizliği) ya da hedef dokuların insüline yanıt verebilirliğinin azalmasından (insülin rezistansı) kaynaklanmaktadır. Dünyada en çok kabul gören diabetes mellitus sınıflaması Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen ve DM'ü 3 ana başlık altında toplayan sınıflamadır. Bu sınıflamaya göre:

I. Bu ilk grup 4 alt başlıktan oluşmaktadır.

- a. Tip-1 Diabetes Mellitus: İnsulin Bağımlı Tip (IDDM)
- b. Tip-2 Diabetes Mellitus: İnsulin Bağımsız Tip (NIDDM)
- c. Malnutrisyonla ilişkili DM

d. Bazı koşullar ve sendromlarla beraber olan DM

II. Bozulmuş glukoz toleransı ile beraber olan Tip

III. Gebelik diabeti (Gestasyonel diabet)

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2002 yılında yaklaşık 177 milyon olan ve 2025 yılı itibari ile dünyada yaklaşık 300 milyon insanı etkilemesi beklenen diyabet

hastalarının, uzun sürede (kan şekerinin düzenlenme düzeyine de bağlı olarak) yaklaşık yarısında nöropati gelişmektedir. Ağrılı diyabetik nöropati gelişmiş ülkelerdeki en sık nöropati nedenidir ve nontravmatik amputasyonların %50-75'inden sorumludur (136).

Nöropatinin oluşmasında etyopatogeneizde hiperglisemi, diyabetin süresi, ileri yaş, hipertansiyon, hipoinsülinemi, hiperinsülinemi vardır. Bunlar dışında bazı bağımsız risk faktörleride etyolojide suçlanmıştır; sigara ve alkol kullanımı, uzun boylu olmak, albüminüri, vücut kitle indeksi, trigliserid, kolesterol ve genetik faktörlerden söz edilir. Erkeklerde, kadınlara oranla diyabete bağlı nöropati daha siktir (137).

Diyabet periferik ve merkezi sinir sisteminde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olur (138). Öğrenme ve hafıza bozulması diyabetli yetişkinlerde gözlemlenmiştir (133). Diyabet kronik hiperglisemi yoluyla bilişsel bozukluklara da yol açmaktadır (139). Tip I ve Tip II diyabet genel olarak vücudun tamamında sinir hasarına neden olur. Bu da çoğunlukla ayak parmaklarında, ayaklarda, ellerde ve kollarda ağrı ve uyuşukluğa yol açar. Bu kronik ağrı durumu, ruhsal duruma, hareket kabiliyetine, çalışma ve uykuya olumsuz yönde etki ederek yaşam kalitesini düşürmektedir (140).

Diyabetik nöropatinin sebepleri tam olarak anlaşılmış değildir ve etkin ideal bir tedavisi halen yoktur. Tedavisi başlıca kan şekerinin düzenlenmesidir, hastalara ayrıca B vitamin komplekslerinin verilmesi, parasetamol verilmesi, amitriptilin türevi antidepresanlar hastalardaki nöropatik ağrıları azaltmakta fayda sağlar. Son zamanlarda yeni çıkan bazı antiepileptik ajanların da nöropatik ağrılara iyi geldiği bildirilmektedir. Ancak henüz ideal düzeyde etkin bir tedavi geliştirilememiştir. Tedavi geliştirme çabaları devam etmekte olup selektif COX-2 inhibitörleri, sodyum kanal blokörleri ve spinal eksitatörük nörotransmitter antagonistlerinin etkileri halen deneysel aşamada denenmekte olup, yakın gelecekte klinik kullanıma geçme potansiyeli vaat eden ajanlardır (141). Nöropatik ağrı tedavisinde spesifik mekanizmaları hedef alan tedavi yöntemlerinin etkin olduğu düşünülmektedir.

Ağrılı diyabetik nöropati konusunda, deneysel modeller geliştirilmiş ve patofizyolojik mekanizmanın anlaşılması ve potansiyel tedavi uygulamaları için faydalı modeller olduğu ortaya konmuştur. Deneysel diyabet modeli, alloxan ve

streptozosin (STZ) kullanılarak oluşturulabilir (142). Kimyasal maddelerin her ikisi de oksidan madde meydana getirerek Langerhans adacıklarını seçici olarak haraplar. Bu tez çalışmasında da kullanılan bir glukonitrozure olan STZ'nin etki mekanizması ise daha az anlaşılmıştır. Ancak STZ'nin uygun olmayan nitrik oksit (NO) cevapları meydana getirdiği, NO cevabının neden olduğu adacık hücre yıkımının artmasının diyabeti oluşturduğu düşünülmektedir. STZ'le indüklenmiş diyabet insüline bağımlı tip I diyabet için bir deneysel model olarak karakterize edilir (143). Bu modelde diyabetin yol açtığı ilerlemiş yapısal ve fonksiyonel anormalliklerin, hem periferik hem de merkezi sinir liflerinde meydana geldiği tanımlanmıştır (144). Oksidatif stres diyabetik komplikasyonlar ve diyabetin altında yatan bir mekanizma olarak değerlendirilir. Oksidatif strese sebep olan serbest radikal gruplarından biri reaktif oksijen türleri (ROS)'dir. ROS diyabetlilerde yükselir. Bunun ana kaynakları glikoz otooksidasyonunun ve metabolitlerinin dahil olduğu metabolitlerdir. Bunların yanısıra ilerlemiş glikasyon, değişken prostanoit üretimi ve anormal veya etkisiz mitokondriyal fonksiyon vardır (145). Periferik sinirlerde yapılan çalışmalarda ROS'un direk olarak nöronları ve *schwann* hücrelerini tahrip ettiği bulunmuştur. Bu durum diyabetle birlikte DKG'de ve onların mitokondrieleri ve hücre gövdeleri üzerine kötü etkilerin yanısıra demiyelinizasyon ve aksonapati gibi kümülatif nörodejeneratif değişikliklere yol açabilmektedir (146).

1.9. Pürinerjik Sistem

Azotlu baz olarak da bilinen pürin ve pirimidinler nükleik asitlerin yapısına katılan önemli organik bileşiklerdendir. Pürinler biri altı diğeri beş atomdan oluşan iki halkasal yapının kaynaşmasından ortaya çıkmıştır. Pirimidinler ise yalnızca altı üyeli bir tek halkadan meydana gelir. Dört tane pürin dört tane de pirimidin bazı mevcuttur. Pürinler; adenin, guanin, ksantin ve hipoksantinden oluşurken pirimidinler ise urasil, timin, sitozin ve orotik asitten oluşur (147).

Bir pürin veya pirimidine riboz veya 2-deoksiriboz şekerlerinden biri eklenirse nükleozit adı verilen bileşikler oluşur. Nükleotitler, nükleozitlerin mono, di veya trifosfat esterleridir. Riboz veya deoksiriboz şekerlerine bir veya daha fazla fosfat grubunun eklenmesi ile nükleotitler ortaya çıkar. Mononükleotitler, nükleozitlerdeki

şeker molekülünün tek bir hidroksil grubunun fosforile edilmiş şeklidir. Örneğin AMP, adenin + riboz + fosfat şeklinde bir yapı göstermektedir (148).

Hücre içinde birçok fizyolojik rolü ve görevi bulunan ATP'nin hücre dışında hem periferik (149) hem de MSS'de (150) bir nörotransmitter veya nöromodulatör olarak da rolleri vardır. ATP sinaptik veziküllerde depolanır ve noradrenalin, asetilkolin veya diğer transmitterlerle birlikte salıverilir (151) ve kendilerine özgü hücre yüzeyi reseptörleri üzerinden etki eder.

Pürin nükleotit ve nükleozitlerinin hücre dışı etkileri ilk defa 1929 yılında Drury ve Szent-Györgyi (152) tarafından kardiyovasküler sistemde daha sonra uterus ve bağırsaklarda tanımlanmıştır (153). Pürinlerin kardiyovasküler sistemdeki öneminin anlaşılmasını takiben sinir sistemi üzerine etkileri çalışılmaya başlamıştır.

Sinir-kas kavşağında ATP'nin fizyolojik bir rolünün olduğu çok önceden beri biliniyordu. Buchthal ve Folkow kurbağa gastrokinemius kasındaki siyatik artere ATP enjekte edilmesinin tetanus benzeri kasılmalara yol açtığını göstermişlerdir (154). Aynı zamanda siyatik arterin asetilkoline (ACh) duyarlılığı ATP'nin ön uygulamasına bağlı olarak belirgin şekilde artmıştır. Yapılan birçok çalışmada spinal kanal bölümlerinin ATP'ye duyarlı olduğu gösterilmiştir (155). Emmelin ve Feldberg kedilerde intravenöz (iv) olarak uygulanan ATP'nin periferik, refleks ve santral mekanizmaları etkileyerek kompleks etkileri başlattığını bulmuşlardır (156). Kedilerde ATP'nin lateral ventriküle enjeksiyonu kas güçsüzlüğü, ataksi ve uykuya eğilim meydana getirmiştir (157).

Adenozin veya ATP beynin çeşitli bölgelerine uygulandığı zaman biyokimyasal ve elektrofizyolojik değişikliklere sebep olur (158). ATP ve ilişkili nükleotitlerin anti-anestezik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (159). ATP'nin periferik sinir sisteminde bir nörotransmitter olabileceğine dair ilk işaret kulak sinirinin antidromik uyarılması esnasında duyuusal sinirlerden ATP'nin salıverilmesi sonucu tavşan kulak arterinde vazodilatasyon meydana gelmesiyledir (160).

Hücre ve doku hasarı meydana geldiğinde, egzozitoz veya plazma membran taşıyıcılarının aktive olmasıyla ATP hücre dışına salıverilir. Eksitatör veya eksitatör olmayan pek çok hücre tipinin membranında ATP veya diğer nükleotitler için spesifik reseptörler bulunur. Nükleotit reseptörleri Pürinerjik (P)1 adenozin reseptörlerinin aksine P2 reseptörleri olarak adlandırılırlar.

Ekstraselüler nükleotitler nörotransmitter ve hormon saliverilmesi, düz kasların yüzey reseptörleri bağlantılı mekanizmalar aracılığı ile kasılması gibi çok çeşitli hücrel biyolojik olaylarda rol oynarlar (161). Tablo 2’de pürin ve pirimidin reseptör alt tiplerinin genel dağılımı, agonist ve antagonistlerinin iletim mekanizmaları görülmektedir.

Tablo 2. Pürin ve pirimidin reseptör alt tiplerinin genel dağılımı, agonist ve antagonistleri ile iletim mekanizmalarını gösteren tablo. Kaynak (162)'den değiştirilerek alınmıştır.

Reseptör Tipi	Genel Dağılım	Agonist	Antagonist	İletim Mekanizması
P1 (Adenozin)				
A ₁	Beyin, medulla spinalis, testis, kalp, Otonom sinir sonlanmaları	CCPA>R-PIA=S-ENBA>NECA; CVT-510	DPCPX, N-0840, MRS1754, N-0840, WRC-0571	G _i /G _o ↓cAMP
A _{2A}	Beyin, kalp, akciğer, dalak	NECA>CGS 21680=CVT-3146	KF17837, SCH58261, ZM241385, KW 6002	G _s ↑cAMP
A _{2B}	Kalın barsak, mesane	NECA (nonselektif)	Enprofillin, MRE2029-F20, MRS17541, MRS1706	G _s ↑cAMP
A ₃	Akciğer, karaciğer, beyin, testis, kalp	IB-MECA>NECA>2-Cl-IB-MECA; DBXRM; VT160	MRS1220, L-268605, MRS1191, MRS1523, VUF8504	G _i /G _o , G _q /G ₁₁ , ↓ cAMP, PLC-β aktivasyonu
P2X				
P2X ₁	Düz kas, platelet, serebellum, DKG	ATP=2-MeSATP≥αβ-meATP=L-β,γ-meATP (hızlı desensitizasyon)	TNP-ATP, IP ₅ I, NF023, NF449	İntirinsik katyon kanalları (Ca ⁺² ve Na ⁺)
P2X ₂	Düz kas, MSS, retina, kromaffin hücreler, otonom ve duyuşal gangliyonlar	ATP≥ATP γ S≥2-MeSATP>>αβ-meATP (pH + çinko duyarlı)	Suramin, isoPPADS, RB2, NF770, NF279	İntirinsik iyon kanalları (özellikle Ca ⁺²)
P2X ₃	Duyuşal nöronlar, NTS, bazı sempatik nöronlar	2-MeSATP≥ATP≥αβ-meATP ≥ApsA (hızlı desensitizasyon)	TNP-ATP, PPADS, A317491, NF110, Ip5I, Fenol kırmızısı	İntirinsik katyon kanalları
P2X ₄	MSS, testis, kolon	ATP>>αβ-meATP=2-MeSATP=CTP	TNP-ATP (zayıf), BBG (zayıf), fenolftalen	İntirinsik iyon kanalları (özellikle Ca ⁺²)
P2X ₅	Deri, bağırsak, mesane, timus, medulla spinalis	ATP=2MeSATP= ATP γ S>αβ-meATP	Suramin, PPADS, BBG	İntirinsik iyon kanalları
P2X ₆	MSS, motor nöronlar			İntirinsik iyon kanalları
P2X ₇	Apopitotik hücreler, immün hücreler, pankreas, deri	BzATP≥2MeSATP≥ATP>>αβ-meATP	KN62, KN04, MRS2427, RN6189, Az11645373, A-740003	İntirinsik katyon kanalları
P2Y				
P2Y ₁	Epitel, endotel ve immün hücreler, platelet, osteoklast	MRS2365>2-MeSADP=ADPβS>2-MeSATP=ADP>ATP	MRS2179, MRS2500, MRS2279, PIT	G _q /G ₁₁ ; PLC-β aktivasyon
P2Y ₂	İmmün hücreler, epitel ve endotel hücreler, böbrek tübülü, osteoblast	2-thioUTP>UTP=ATP>UTPγS; INS 37217; INS 365	Suramin>RB2, AR-C126313	G _q /G ₁₁ ve muhtemelen G _i /G _o ; PLC-β aktivasyon
P2Y ₄	Endotel hücreler	UTP>ATP>Up ₄ U>UTPγS; INS 37217	RB2>suramin	G _q /G ₁₁ ve muhtemelen G _i , PLC-β aktivasyon
P2Y ₆	Bazı epitel hücreleri, plasenta, T hücreleri, timus	3-Fenilaçil-UDP>UDPβS>UDP>UTP>>ATP	MRS2578	G _q /G ₁₁ ; PLC-β aktivasyon
P2Y ₁₁	Dalak, barsak, granülosit	AR-C67085MX>BzATP=ATPγS>ATP; NF546	Suramin>RB2, NF157, 5'-AMPS, NF340	G _q /G ₁₁ ve G _s ; PLC-β aktivasyon
P2Y ₁₂	Platelet, glial hücreler	2-MeSATP≥2-MeSADP>ADP>ATP	CT50547, AR-C69931MX, INS49266, AZD6140, PSB0413, ARL66096, 2-MeSAMP	Gα _i , adenil siklaz inhibisyonu
P2Y ₁₃	Dalak, beyin, lenf nodu, kemik iliği	ADP=2-MeSADP>>2-MeSATP>ATP	MRS2211, 2-MeSAMP	G _i /G _o
P2Y ₁₄	Plasenta, adipoz doku, mide, beyin çeşitli bölgeleri	UDP glukoz≥UDP-galaktoz		G _i /G _o

1.9.1. Pürinerjik Reseptör Alt Tipleri

Pürinerjik sinir hipotezi (mesane ve bağırsak düz kasında ATP'nin bir transmitter olarak nonadrenerjik, nonkolinerjik (NANC) iletimden sorumlu olduğu) ilk kez 1972 yılında Burnstock tarafından önerilmiş (163) ve pürinerjik reseptörlerden bu yıllarda bahsedilmeye başlanmıştır (164). İki yıl sonra pürinoreseptörler P₁ (adenozin) ve P₂ (ATP/ADP) olarak tanımlanan 2 ana tipe ayrılmıştır (165). Yine bu yıllar içinde P₁'in 2 alt tipi tanımlanmıştır (166). P₂ reseptörlerinin farmakolojik olarak P_{2X} ve P_{2Y} alt tiplerine ayrılması ancak 1985 yılında gerçekleşmiştir (165). Bir yıl sonra platelet membranında bulunan ve ADP'ye selektif P_{2T} reseptörü ile makrofaj membranında bulunan P_{2Z} reseptörü olmak üzere 2 farklı P₂ pürinoreseptör alt tipi tanımlanmıştır (167). Bu reseptörleri takiben tanımlanan reseptörlerden P_{2U} reseptörü ATP'ye olduğu kadar UTP gibi pirimidinlere de duyarlıydı (168). 1994 yılında Mike Williams'ın düzenlediği bir toplantı da P₂ pürinoreseptörlerin rastgele alfabetik olarak isimlendirilmesini temel alan sınıflandırmanın yeterli olmadığı kararına varılmıştır. Abbraccio ve Burnstock (169) iletim mekanizması çalışmaları (170) ve nükleotit reseptörlerinin klonlanmasına dayanan yöntemlerle (171) pürinoreseptörlerin P_{2X} (ligand-kapılı iyon kanal reseptörleri) ve P_{2Y} (G protein-bağımlı reseptörler) olmak üzere 2 ana aileye ait olması gerektiğini önermişlerdir. Bu bilimsel sınıflandırma büyük oranda kabul görmüştür. Şu ana kadar 7 tane P_{2X} ve 8 tane de P_{2Y} reseptör alt tipi memelilerde tanımlanmıştır. Bu reseptörler pürinlere olduğu kadar pirimidinlere de duyarlıdır (172). Diadenozin polifosfataz için C6 glioma hücreleri ve sıçan orta beyinde presinaptik terminallerinde reseptörler tanımlanmıştır, fakat henüz klonlanamamıştır (173).

1.9.1.1. P₁ Reseptörleri

P₁ reseptörlerinin A₁, A_{2A}, A_{2B} ve A₃ olmak üzere 4 alt tipi tanımlanmıştır (174). P₁ adenosin reseptörlerinin hepsi G protein kenetli reseptörlerdir ve tüm G protein çiftlerinde olduğu gibi 7 TM bölge içerir. Proteinin NH₂ (N) terminali hücrenin dışına, COOH (C) terminali ise membranın sitoplazmik tarafına doğru uzanır. Tipik olarak hücre dışı halka TM4 ve TM5 arasında ve sitoplazmik halka ise TM5 ve TM6 arasında genişlemiştir. Reseptörün hücre içi segmenti G protein ile etkileşerek hücre

içi sinyal iletim mekanizmalarını aktive eder. TM bölgeleri içerisindeki kalıntılar ligandın tanınması ve bağlanmasında çok önemlidir. N terminali ve C terminalinin ligand bağlanması ile ilişkisi gözükmemektedir (175). Sığırlarda A₁ adenosin reseptörünün bölgesel mutasyonu TM6 ve TM7’de histidin rezidülerinin korunmasının ligandın bağlanmasında önemli olduğunu göstermiştir. P1 reseptör alt tipleri için spesifik agonist ve antagonistler mevcuttur (175).

1.9.1.2. P2X Reseptörleri

P2X reseptörleri ATP tarafından aktive olan ligand kapılı non selektif katyon kanallarıdır (176). P2X reseptör alt birimlerini kodlayan 7 gen vardır (177) ve P2X reseptörleri en az yedi alt gruba (P2X₁₋₇) ayrılır. Bu reseptörler % 26-47 oranında benzerlik gösterir ve aminoasit uzunluğu her bir reseptör için 379 ile 595 arasında değişir (178). Tüm P2X alt tipleri geniş hücre dışı bir halka, hücre içi N ve C terminali ve 2 TM (TM1 ve TM2) bölge içerir (179). Hücre içi N ve C sonlanmaları protein kinazlar için bağlanma yerlerini oluştururlar (171). TM bölgeler iyon geçirgenliğinde rol alır (180) ve sahip oldukları kalıntılarla reseptöre agonist veya antagonistlerin bağlanmasını etkilerler (181).

P2X reseptörlerinin varlığı beyindeki nöronlarda, retinada, medulla spinalisteki nöronlarda, glial hücrelerde, otonomik nöronlarda, primer duyuşal nöronlarda, epitelyal ve endotel hücrelerde, iskelet kaslarında ve kan hücreleri gibi çeşitli doku ve hücrelerde gösterilmiştir (178).

P2X reseptörleri üzerinde antagonistik etkilere sahip pek çok ajan mevcuttur. Bunlar arasında suramin, piridoksal fosfat-6-azofenil-2,4’-disülfonik asit (PPADS) (182), üç değerlikli katyonlar (183), hücre dışının asidifikasyonu, Zn⁺² (184) ve sibakron mavisi (185), trinitrofenil (TNP) ATP (186), MRS 2220 (187) P2X reseptörleri üzerine antagonistik etkiler gösterirler.

ATP, αβ-metilen ATP (α,β Me-ATP), 2 metil-tiyo ATP (2 Me-S-ATP) ve benzoil-benzoil ATP (BzATP) ise P2X reseptörlerinin agonistleridir (188).

1.9.1.3. P2Y Reseptörleri

P2Y reseptörleri nükleotitlerle aktive olan G protein bağımlı reseptör ailesine mensup reseptörlerdir. P2Y reseptörlerinin adenin veya urasil ve 5’-difosfatlar veya 5’-trifosfatlara karşı çeşitli duyarlılığa sahip en az 8 (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}) farklı alt tipi

vardır (189, 190). P2Y reseptörlerinin 1-14 arasındaki eksik numaraları ya memeli olmayanlara ya da P2Y reseptörlerine bazı yönlerden benzeyen fakat nükleotitlere cevap verdiklerine dair kanıtlar bulunmayan reseptörlere aittir.

Metabotropik P2Y reseptörleri hücre dışı N terminali ve hücre içi C terminali ile karakterizedir. C terminali, protein kinaz için bağlanma bölgelerine sahiptir. Diğer G protein kenetli reseptörlerde olduğu gibi P2Y reseptörleri 7 TM bölgeye sahiptir. Bu TM bölgelerde ligandların bağlanması için cepler bulunmaktadır. Özellikle TM3, TM6 ve TM7 olmak üzere bazı TM bölgeler arasında yüksek oranda benzerlik vardır. TM6 ve TM7 de bulunan spesifik aminoasit motifleri ekstraselüler nükleotitlerin bağlanması için önemlidir. İnsanlara ait P2Y reseptörlerinde ortak olan TM6 H-X-XR/K motifi agonist aktivitesi için önemlidir (191). TM7 de bulunan A Q/K-X-X-R motifin P2Y_{1,2,4,6} ve P2Y₁₁ reseptörlerinde ligand bağlanmasına katkı sağladığı önerilmektedir. P2Y_{12,13,14} reseptörlerinde bu motif ile birlikte K-E-X-X-L motifi ligand bağlanmasını etkiler.

Farmakolojik olarak P2Y reseptörleri birkaç gruba ayrılabilir. Bunlardan birinci grup ADP ve ATP'ye duyarlı olan insan ve kemirgen P2Y₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, ve P2Y₁₁ reseptörleri (192), ikincisi urasil nükleotitlerine duyarlı olan insan P2Y₄ ve P2Y₆ reseptörleri, üçüncüsü hem adenin hem de urasil nükleotitlerine duyarlı olan insan ve kemirgen P2Y₂, kemirgen P2Y₄ ve muhtemelen P2Y₁₁ reseptörleri, dördüncüsü ise sadece UDP-glukoz ve UDP-galaktoz gibi şeker nükleotitlerine duyarlı olan P2Y₁₄ reseptörüdür.

Yapısal ve filogenetik kriterlere göre yapılan bir sınıflamaya göre ise P2Y reseptörleri iki farklı gruba ayrılmaktadır. Birinci grup P2Y_{1,2,4,6,11} reseptörlerini ikinci grup ise P2Y_{12,13,14} reseptörlerini içerir. Klonlanan bu reseptörler arasında aminoasit dizilişleri % 21-48 oranında özdeşdir. İkinci gruptaki reseptörler arasındaki benzerlik daha yüksektir. P2Y₁₁ reseptörü diğer reseptörlerden farklıdır. P2Y₁₁ reseptörü P2Y₁ reseptörüne farklılaşabilir ve daha sonra çeşitli modifikasyonlarla ayrı bir reseptöre dönüşebilir. Ayrıca bu iki P2Y reseptör alt grubu ilişkili oldukları G protein çiflerine göre de ayrılırlar. İlk gruptaki (P2Y_{1,2,4,6,11}) reseptörler temel olarak G_q/G₁₁'i kullanarak PLC/IP₃ yolağını aktive ederek hücre içi kalsiyum salıverilmesine sebep olurlar. 2. gruptaki reseptörler (P2Y_{12,13,14}) ise G protein ailesinin G_{i/o} üyeleri aracılığı ile adenil siklaz inhibisyonu yapar (190). Özellikle

birinci grup olmak üzere 2 farklı G protein kullanan reseptörler de rapor edilmiştir (193). Örneğin 2. grup reseptörlerden $P2Y_{13}$ $G_{\alpha 16}$ 'yı kullanarak PLC'yi stimüle ederken (194), $P2Y_{11}$ reseptörü G_s aracılığı ile adenilat siklazı stimüle eder (188).

$P2Y$ reseptörlerinin vücutta geniş bir dağılımı vardır. Bu reseptörler; uyarılabilir hücreler, nöronlar, glial hücreler, kas hücreleri, immün hücreler, endokrin ve adipoz dokular, bağırsak, karaciğer, safra sistemi, böbrek, mesane, akciğer, kemik ve kıkırdak, deri, endotelial hücreler, özel duyu organları ve plateletlerden eksprese edilmiştir (195).

1.9.1.4. $P2Y_{12}$ Reseptörü

$P2Y_{12}$ reseptörleri genellikle megakaryositler/trombositlerde eksprese edilir ve bu reseptörler antiplatelet ilaç klopidoğrelinin aktif metabolitinin moleküler hedefidir (196). Bu metabolit hücre dışı halkanın sistin kalıntılarını bağlayarak ligand bağlayıcının inhibisyonuna neden olur (197). Güçlü direk etkili yarışmalı $P2Y_{12}$ antagonistleri mevcuttur ve bunların hepsi ATP analogudur (198). Plateletlerin yanında $P2Y_{12}$ reseptörünün ekspresyonu beynin alt bölgelerinde de gösterilmiştir (199), fakat fonksiyonları henüz bilinmemektedir. Glial hücreler (200), beyin kapiller endotelium hücreleri (201), düz kas hücreleri (202), ve kromaffin hücreleri (203) $P2Y_{12}$ eksprese eder. Bu farklı bölgelerde yerleşmiş olan $P2Y_{12}$ reseptörlerinin görevleri araştırılmaktadır. $P2Y_{12}$ *knock out* farelerde, uzamış kanama zamanı, ADP'ye platelet agregasyonunun inhibisyonu ve çeşitli modellerde arteriyel trombozise direnç görülmektedir (204). İnsanlarda bu reseptörün moleküler defektleri mevcuttur, bu durum hemorajik sendromlarla sonuçlanır. Böyle aynı fenotip gösteren 4 aile tanımlanmıştır. Bunlardan üçünde reseptör ekspresyonunda bir defekt mevcuttur, diğer ailede ise reseptördeki bir mutasyona bağlı olarak fonksiyonel olarak etkisiz reseptörler yapılmaktadır (205). Bu reseptör suramin ve *Reactive Blue 2* tarafından bloke edilir. 2 Me-S-ADP'nin güçlü agonistik etkisine karşın, 2 Me-S-AMP düşük affiniteli antagonisttir (199). ATP de trifosfat türevleri gibi insan $P2Y_{12}$ reseptörlerinde antagonistik etkilere sahiptir (206). ATP düşük affiniteli antagonist iken, bazı trifosfat analogları; AR-C67085 ve kangrelor oldukça güçlü ve yarışmalı antagonisttir (198). AR-C67085 insan $P2Y_{11}$ reseptörünü ve hem AR-C67085 hem de kangrelor insan ve sıçan $P2Y_{13}$ reseptörlerini bloke eder.

Tiyenopiridin bileşiklerinin aktif metabolitleri P2Y₁₂'ye selektif antagonist olarak etki etmektedir. Tiyenopiridin bileşikleri tiklopidin, klopidoğrel ve prasugrel *in vivo* olarak kullanıldığında ADP'nin indüklediği platelet agregasyonunu güçlü bir şekilde inhibe eder (207). Adenozin bifosfatların asiklik analogları P2Y₁₂ reseptör antagonistleridir.

1.9.2. Pürinerjik Sistem ve Ağrı

Ekstraselüler adenin (ATP, ADP) ve urasil nükleotitlerinin (UTP, UDP ve UDP-glukoz) aracılığı ile olan sinyalleşmenin duysal sistemlerle ilişkisi uzun zamandan beri bilinmektedir. Bu moleküller P2X ve P2Y reseptörleri aracılığı ile bir kotransmitter ve/veya nöromodulator olarak etki ederler (208). Birçok etkisinin yanında ekstraselüler nükleotitlerin spesifik bir özelliği temel algenik transmitter olarak bilinmesidir (209). ATP'nin sebep olduğu ağrının mekanizmasının ortaya çıkarılmasındaki belirgin ilerlemeler son zamanlarda hücre yüzeyinde keşfedilen ATP ve diğer nükleotitleri tanıyan duysal nöronlardaki reseptörlerdir (210). Primer afferent duysal nöronların bir alt grubunda ATP ve onun analogları P2X (211) ve P2Y (212) reseptörleri aracılığı ile elektrofizyolojik ve biyolojik cevaplar üretmiştir. Periferik duysal sinirlerde olduğu kadar MSS'de noziseptif nöronlarda ve duysal gangliyonlarda eksprese edilen P2X₃ ve P2X_{2/3} kanallarının ATP'nin tetiklediği ağrı sinyallerinin iletiminde esas rolü oynadığı yaygın kabul görmektedir (213). Bununla birlikte diğer kalsiyum-iliskili P2 reseptörleri ağrı sinyallerine katkıda bulunabilir (214).

ATP deriye uygulandığı zaman ağrı duysunu güçlü bir şekilde uyarır. Ayrıca ATP kapsaisin duyarlı TRPV₁ reseptörlerinin aktivasyonu için gerekli olan termal eşiği düşürmüştür. ATP'nin varlığında bu reseptörler normal vücut ısısında ağrı duysunu tetikleyebilmektedir (214). Ekstraselüler ATP konsantrasyonu doku travması, inflamasyon, visseral gerginlik ve migren gibi durumlarda belirgin olarak artmaktadır. Bu artış P2 reseptörlerinin aktivasyonuna sebep olarak ağrı duysuna katkıda bulunur veya ağrı duysunu düzenler (215). Bununla birlikte, P2X veya P2Y reseptörlerinin farmakolojik olarak bloklanması veya ekspresyonunun duysal nöronlarda veya medulla spinaliste baskılanması mekanik veya termal etki ile tetiklenen akut fizyolojik ağrıya etkisi küçük olmuştur (216), fakat inflamatuvar ağrıyı

azaltmıştır. Endojen ATP ve onun reseptörleri fizyolojik durumlardan ziyade nöropatik ağrı veya inflamatuvar ağrı gibi kronik ağrı durumlarında daha fazla öne çıkmaktadır (217) .

Son yıllarda elde edilen bilgiler merkezi sinir sisteminin immün efektör hücreleri olan mikrogliaların nöropatik ağrı patogenezinin katkılarını olduğunu göstermektedir (218). Bundan dolayı mikroglialar son yıllarda nöropatik ağrı tedavisinde artan bir yaygınlıkta hedef alınmaya başlamıştır. Hücre dışı nükleotitler mikrogliaların güçlü uyarıcıları olup (219) pürinerjik P2 reseptörlerini aktive ederek çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde önemli roller oynamaktadır (208). Mikrogliaların P2X₄, P2X₇, P2Y₆ ve P2Y₁₂ pürin reseptörlerini yaygın olarak eksprese ettiği gösterilmiştir (220). P2X₄ sinir hasarı sonucunda spinal mikroglial hücrelerde artış gösterdiği ve beyin kökenli nörotrofik faktörler salıvererek nöropatik ağrıya katkıda bulunduğu bildirilmiştir (221).

Bu bulgular göz önüne alındığında nöropatik ağrı ve inflamatuvar ağrı tiplerinde pürinerjik sistemi hedef alan farmakolojik yaklaşımlar tedavide umut verici olabilir (208).

1.9.3. P2Y Reseptörleri ve Ağrı

Kurbağa DKG hücrelerinde gerçekleştirilen öncül bir çalışmada, ATP uygulanmasının bu hücreleri depolarize ederek AP ateşlemesine yol açtığı tespit edilmiştir (222). Hücre içine, G-protein aracılı reaksiyonları inhibe eden guanozin 5S-O-(2-tiyobisfosfat, GDP-b-S) uygulanmasının ATP'nin bu etkisini inhibe etmesi bulgusu P2Y reseptörlerinin rol oynadığını vurgulamaktadır. ATP'nin bu etkisine düşük eşikli, inaktive olmayan, voltaj bağımlı K⁺ akımı (M akımı) aracılık eder ki bu akım istirahat membran potansiyelinde belirgin olarak rol oynamayıp depolarizasyonda devreye girip nöronal hücre uyarılması üzerine dinamik bir fren gibi etki ederek ateşleme frekansı adaptasyonunda rol oynar (223). Bu M-akımı agonistlerinin antinosiseptif etkili olduğu göz önüne alındığında (224) ve P2Y reseptörlerinin bu akımları inhibe ettiği bilindiğinden P2Y reseptörlerinin ağrı iletimini uyardığı düşünülebilir.

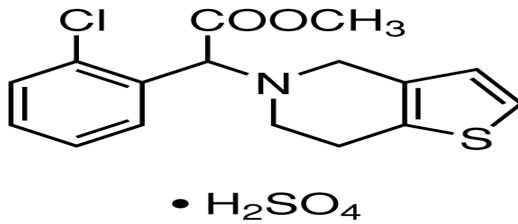
DKG hücre kültürlerinde ATP ve ADP'nin TRPV₁ aktivasyonuna yol açtığı ve P2Y₂ reseptörlerinin TRPV₁ kanalları aracılığı ile nosisepsiyonda rol aldığı da gösterilmiştir (225).

DKG sinir hücreleri hem santral hem de periferel yönde duyuusal nöropeptitleri, aspartat ve gluatamatı aksonal olarak transport ederek reseptör ve iyon kanallarına ulaştırır (226). Bu hücrelerde aksonal transportun inhibisyonunun, periferel hasarın santral nöronlara sinyalle bildirilmesini durdurarak nöropatik ağrıyı durdurduğu bilinmektedir (227). Yeni bir çalışmada mikroglial P2Y₁₂ reseptör aktivasyonunun (reseptör antagonisti ve reseptör *knock-out* fare kullanılarak gerçekleştirilen çalışma) nöropatik ağrıda rol oynadığı gösterilmiştir (228). Bu bulgu P2Y₁₂ reseptörlerinin bloklanmasının nöropatik ağrı tedavisinde etkin olabileceğini düşündürmektedir.

Farklı pürin reseptörlerinin olduğu ve farklı hücresele mekanizmalarla kenetli olayları başlattığı bilinmektedir. Doku hasarına bağılı olarak farklı P2 reseptörleri aracılığı ile ATP'nin nosiseptif duyarlılığı değıştirilebilir. Farmakolojik spesifik antagonistler geliştirilerek veya genetik yoksunluk oluşturmayı kapsayan farklı deneysel stratejiler ile gerçekleştirilen çalışmalar P2X₃, P2X_{2/3}, P2X₄ ve P2X₇; ve P2Y (ör. P2Y₂) reseptör alt tiplerinin ağrı iletiminde rol oynadığını ve ağrı duyusunun algılanmasını modüle ettiğı gösterilmiştir. Örneğın P2X₃ antagonisti A-317491 farklı hayvan modellerinde ağrıyı blokladığı, selektif P2X₇ ve P2Y₂ reseptör antagonistlerinin yangısal ve nöropatik ağrıya duyarlılığı azalttığı da gösterilmiştir (229).

1.10. Klopidoğrel

Klopidoğrel (Klopidoğrel hidrojen sülfat, C₁₆H₁₆ClNO₂S.H₂SO₄: 419.90) antitrombotik olarak klinikte yaygın kullanıma sahip tiyenopiridin türevi bir ilaçtır (230). Şekil 3'te klopidoğrelın kimyasal yapısı görölmektedir.



Şekil 3. Klopidoğrelın kimyasal yapısı.

Tiyenopiridin grubu ilaçlar, P2Y₁₂ reseptörüne selektiftir ve bu reseptörü geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler (199). Klopidoğrel, ADP reseptör antagonistidir ve bir ön ilaçtır. Hepatik sitokrom P 450 3A4 (CYP 3A4) enzimi ile okside olduktan sonra aktif metabolitine dönüşür (231). Oral yoldan alınan ilacın sadece %50'si emilirken, biyoyararlanımı yemeklerden etkilenmez.

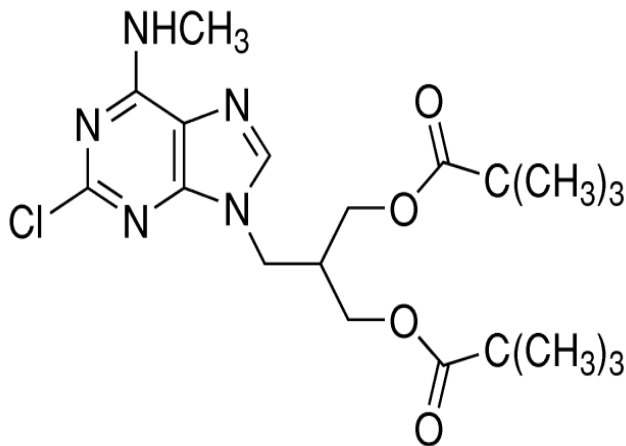
Klopidoğrel 75 mg dozundaki oral uygulamaları takiben hızla emilmekte ve doz uygulamasından yaklaşık bir saat sonra kan dolaşımında bulunan başlıca metabolitinin plazmadaki pik seviyelerine ulaşmaktadır. Klopidoğrel ve metaboliti plazma proteinlerine geri dönüşümlü bir şekilde bağlanmakta, hızlı hidroliz sürecinden geçerek karboksilik asit türevine dönüşmektedir (232).

İnsanlarda, 120 saatlik bir aralıkta yaklaşık % 50 oranında idrarla ve yaklaşık % 46 oranında feçesle atılır. Dolaşımdaki ana metabolitin eliminasyon yarı ömrü tek ve tekrarlanan uygulamalardan sonra 8 saattir (233).

Klopidoğrel'in toksisite endeksi çok düşüktür. LD₅₀ değeri sıçanlar için 1500 mg/kg olarak tespit edilmiştir.

1.11. MRS 2395

Bir dipivaloöl türevi olan MRS 2395 (2,2-Dimetil-propionik asit 3-(2-klor-6-metil aminopürin-9-yl)-2-(2,2-dimetil-propionil oksimetil)-propil ester, M5942, C₂₀H₃₀ClN₅O₄: 439.94) P2Y₁₂ reseptörünün selektif antagonistidir (234). Şekil 4'te MRS 2395'in kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 4. MRS 2395'in kimyasal yapısı.

MRS 2395 insanlarda ve sıçanlarda ADP'nin indüklediği platelet agregasyonunu inhibe eder. Bu etkisini gerçekleştirirken P2Y₁ reseptörünün indüklediği PLC aktivitesini etkilemeden ADP'nin indüklediği sAMP yolağının inhibisyonunu antagonize eder. MRS2395 IC₅₀'de 3.6 µM dozunda ADP'nin indüklediği trombosit agregasyonunun antagonize eder (234).

Bu tez çalışmasında selektif P2Y₁₂ reseptör antagonisti klopidegrol ile yeni keşfedilmiş olan MRS 2395'in deneysel diyabetik nöropati geliştirilmiş fare modelinde ağrı üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Ek olarak bu iki ajanın ağrı üzerine olan olası etkilerinin mekanizması sıçan DKG hücrelerinde hücresel düzeyde irdelenerek kalsiyumun ve rol oynayan hücresel yolların rolü araştırıldı.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada hem DKG primer hücre kültürü hazırlanarak hücresel ağrı modeli, hem de *hot plate* testi kullanılarak *in vivo* deneysel ağrı modeli oluşturuldu. Bu iki farklı deney protokolünden birincisinde DKG hücrelerinde kalsiyum görüntüleme yöntemi ile klopidoğrel ve MRS-2395'in etkileri incelendi. İkinci protokolde ise normal ve diyabetik nöropati oluşturulmuş farelerde *hot plate* testi kullanılarak ağrı eşikleri belirlendi. Böylece hem *in vivo* hem de *in vitro* yöntemlerle klopidoğrel ve MRS-2395'in ağrı sinyalleri üzerine etkisinin olup olmadığı incelendi.

2.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyon Nöronlarının Primer Kültürü

Bu çalışmada, sıçan DKG hücreleri enzimsel ve mekanik işlemlerle izole edilerek tek hücreler halinde hazırlandı ve kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanıldı. DKG hücrelerinin izolasyon ve kültürü Forda ve Kelly (1985) adlı araştırmacıların geliştirdiği ve aşağıda ayrıntılı bir şekilde anlatılan metoda göre gerçekleştirildi (235).

2.1.1. Kültür İçin Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Ajanlar

A) Steril Su: Çift distile suyun laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisinde 0.2 µm çapında olan filtrelerden geçirilmesiyle elde edildi ve otoklavda steril edilmiş cam şişelerde muhafaza edildi.

B) Etil Alkol: % 99.7 - % 100 saflıktaki etanol iki defa distile edilmiş suyla seyreltilerek % 70'lik oranda hazırlandı ve püskürtmeli bir ağızlığı bulunan şişede tutuldu.

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

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

E) Laminin (Sigma; Steinheim, Almanya): Laminin 1 mg/ml olacak şekilde stok solusyonu hazırlandı ve 5 ml'lik steril şişelerde 10 µl olacak şekilde bölündü. Bu 10 µl lik stoklar -70 °C'de tutuldu ve kültür hazırlandığı gün lamellerin üzerine koymadan önce 2 ml steril PBS eklendi.

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

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

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

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

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

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

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

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

Sinir büyüme faktörü embriyonik duysal ve sempatik nöronların yaşamını sürdürmesinde ve farklılaşmasında çok önemli bir yere sahiptir (236).

2.1.2. Kùltür Vasatı

100 mililitrelik bir kùltür medyumunu aşağıdaki şekilde hazırlandı:

10 ml at serumu

10 ml modifiye edilmiş Dulbeco medyumunu

1 ml Penisilin/Streptomisin

120 mg NaHCO₃

Bu karışım distile su ilave edilerek 100 mililitreye tamamlandı, filtreden geçirilerek sterilize edildi ve kullanılana kadar +4 °C’de saklandı. Her bir kùltür yapılmadan önce bu solüsyon taze olarak hazırlandı.

2.1.3. Kùltür İçin Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri

Sterilizasyon amacıyla 0.22 µm porlara sahip filtre

94 x 16 mm ebata sahip, yuvarlak, steril geniş petri kutu

35 x 10 mm ebata sahip, yuvarlak, steril kùk petri kutu

Steril 50 ml polipropilen koni tp

Steril 15 ml polipropilen koni tp

22 x 22 mm ebata sahip, kare, cam mikroskop lameli

150 mm uzunlukta cam pastör pipeti.

2.1.4. Diseksiyon Malzemeleri

1 tane 220 mm uzunluęa sahip büyük makas

1 tane 80 mm uzunluęa sahip kùk makas

1 tane ucu 12 mm uzunluęa sahip içi yaylı makas

1 tane 15 cm uzunluęa sahip forseps

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

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

2.1.5. Diğer Ekipmanlar

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

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

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

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

řarjlı pipet.

2.1.6. Dorsal Kök Gangliyonu Hücre Kültürü İçin Genel Prensipler

Hücre kültürü yapılması ve saklanması sırasında oluşabilecek kontaminasyonlara karşı gerekli önlemler alındı. Bu amaçla kullanılan tüm cerrahi malzemeler, Pastör pipeti, cam saklama kapları, pipet ve pipet uçları otoklav (Nüve, Ankara) yardımıyla sterilize edildi. Otoklavdan alınan malzemeler laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine konulmadan önce % 70'lik alkolle tekrar temizlendi ve laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine yerleştirildi. Steril halde temin edilen plastik malzemeler ise kullanılmadan önce % 70'lik alkol sprey üzerlerine sıkıldıktan sonra diğer cam malzemelerin yanına laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine yerleştirildi. Laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisindeki ultraviyole ışık kaynağı, kabinde hücre kültürü yapılmadığı zaman aralıklarında açık bırakıldı. Cerrahi malzemeler belirli periyotlarla, cam malzemeler ise her hücre kültürü yapılmadan önce sterilize edildi. Hücre kültürünün koyulacağı inkübatörün nemi, gaz düzeyi, sıcaklığı ve temizliğine özen gösterildi.

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

2.1.7. Dorsal Kök Gangliyonu Hücre Kültürü Protokolü

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

hazırlanış tarihi yazıldı. 100 µl laminin (5 µg/ml) her bir lamel üzerine ilave edilerek kültür tablası inkübatöre kaldırıldı. Aynı gün kültür vasatı da hazırlanarak yaklaşık 40 ml kültür medyumunu ve 10 ml PBS steril bir plastik tüp içerisinde ısınması amacıyla inkübatöre yerleştirildi. Diseksiyon mikroskobu ve diseksiyon cerrahi seti dezenfekte edilerek laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine alındı.

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

Bütün DKG gövdeleri çıkarılarak petri kutusunda toplandıktan sonra, petri kutusu hassas yuvarlak hareketlerle sallandı ve bütün gangliyonların bir araya toplanması sağlandıktan sonra kültür medyumunu bir Pastör pipeti ile çekildi ve 900 µl ılık (37 °C'de inkübe edilmiş) kültür vasatı ve 100 µl kollagenaz (% 0.125) ilave edilerek hafifçe çalkalandı ve 13 dakika süreyle inkübatörde tutuldu. Bu süre sonunda hücre, solüsyon, enzim karışımı inkübatörden alınarak hızla üç defa PBS ile yıkandı. Daha sonra 900 µl PBS ve 100 µl tripsin (% 0.25) ilave edilerek hafifçe çalkalandı ve 6 dakika süreyle inkübe edildikten sonra 15 ml'lik steril plastik tüpe aktarıldı ve yaklaşık 4 ml ılık kültür vasatı ilave edildi, gangliyonlar tüpün dibine çöktürüldükten sonra kültür vasatı Pastör pipeti ile uzaklaştırıldı ve bu işlem 3 defa tekrarlandı. Daha sonra 100 µl DNaz ve 900 µl kültür medyumunu ilave edilerek ucu daraltılmış steril bir Pastör pipetine hızla çekip boşaltarak gangliyonlar mekanik olarak tek hücrelere ayrıştırıldı. Bu çekip boşaltma işlemi 3-6-9 defa kademeli olarak yapıldı. Her bir kademede üstte kalan süspansiyon alınarak diğer gangliyonlara mekanik tiritasyon işlemi devam edildi. Şayet gangliyon topağı tam olarak 9 çekip boşaltmadan sonra ayrılmadıysa bu işleme 14 defaya kadar devam edildi. Hücre kültür vasatı süspansiyonu, kültür vasatı ilave edilerek 2.4 ml'ye tamamlandı. Daha sonra inkübasyon için daha önceden lamininle kaplanan lamellerin bulunduğu küçük petri kutuları inkübatörden alındı. Lamellerin laminin ile inkübasyon zamanı en az 3-

4 saat olduğu için dekapitasyon işlemine başlamadan yaklaşık olarak en az 2 saat önce laminin ekim işlemi tamamlandı. Laminin içeren sıvının büyük bir kısmı lamellerden uzaklaştırıldıktan sonra hücre süspansiyonu bulunan solüsyona 240 µl sinir büyütme faktörü (NGF) eklendi ve her lamele 150 µl hücre içeren bu solüsyon ekildi ve yaklaşık 4-6 saat süreyle inkübatörde bekletildi.

2.2. Flüoresan Kalsiyum Görüntüleme

İzole edilen ve lamellere ekilen DKG hücreleri, 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 5).

Hücreler fura-2-AM (1 µM, Molecular Probes, İngiltere) ile oda sıcaklığında bir saat inkübe edilerek floresan boya yüklemesi yapıldı. Yükleme takiben hücreler 45 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-AM'nin de-esterifikasyonu sağlandı ve kalsiyum görüntüleme deneyleri bu bileşimdeki kayıt solüsyonu kullanılarak gerçekleştirildi.

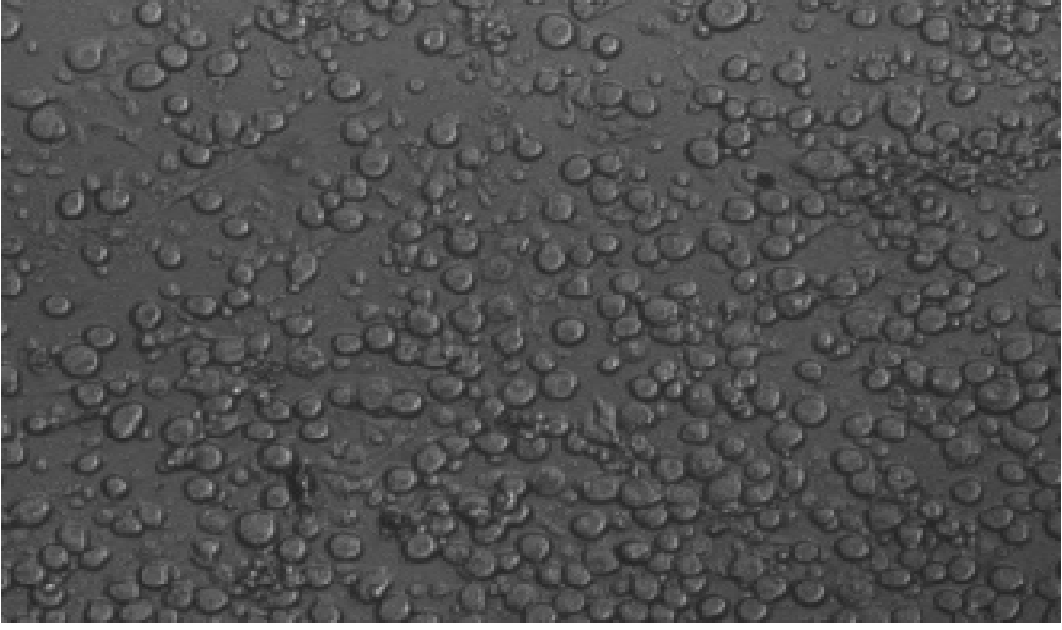
2.3. Hücre İçi Kalsiyum Görüntüleme ve Görüntü Analizleri

Kalsiyum duyarlı floresan boya ile yüklenen hücreleri içeren lameller, mikroinkübasyon kayıt çemberine (Warner Instruments, ABD) aktararak, 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 ataşmanlı Nikon TE 2000S ters mikroskop altında gerektiğinde göz ile değerlendirildi. Bütün deneyler oda sıcaklığında (≈ 22°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

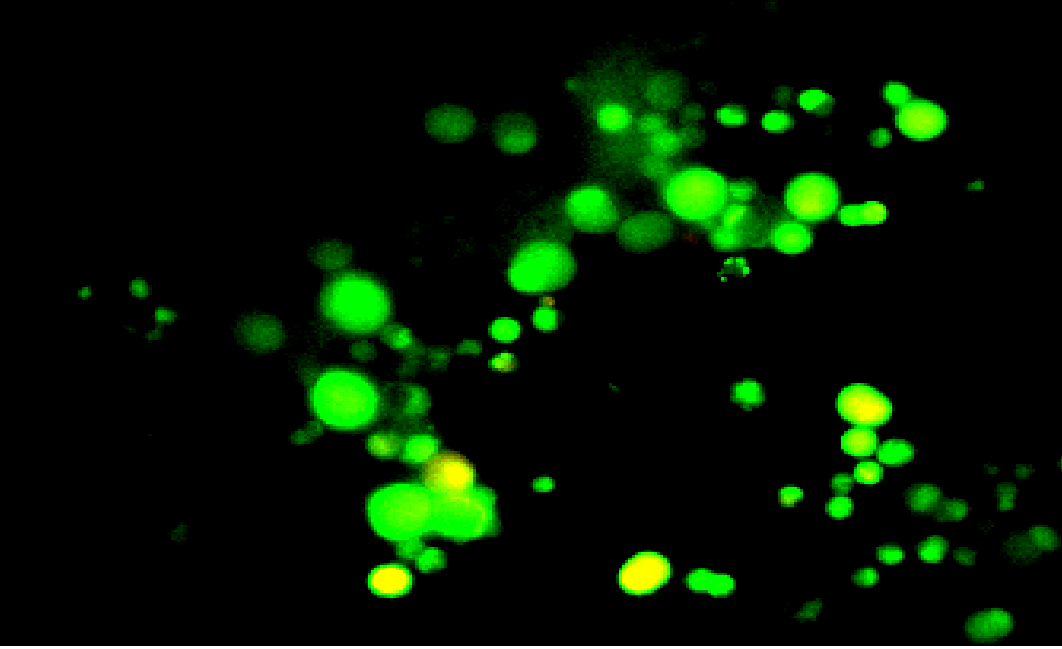
kontrollü filtre sürücüsündeki perde (shutter) donanımı aracılığı ile görüntü alınmadığı zamanlarda flüoresan işaretlenmiş hücrelerin ışık maruziyeti önlendi. *Xenon* ışık kaynağından (LS- Sutter Instr, ABD) gönderilen UV ışınının hızlı bir otomatize filtre sürücüsüne (Lambda-2, Sutter Instr, ABD) yerleştirilen 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 kaydedildi. Sistemin genel bir görünümü şekil 6’da yer almaktadır.

Çalışmanın bu bölümünde hücre içi kalsiyum sinyalleri üzerine MRS 2395 ve klopidegrol’ün etkileri incelendi. MRS 2395 ve klopidegrol DMSO’da çözdürüldü ve deneylerden önce NaCl-esaslı hücre dışı solüsyonu ile sulandırılarak çalışmalarda kullanıldı. MRS 2395 100 nM, 1µM ve 10 µM olacak şekilde 3 farklı dozda uygulandı. Klopidegrol ise 10, 100 ve 300 nM dozlarında uygulandı. Bütün deneyler oda ısısında gerçekleştirildi.

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.



A: Bir günlük kültüre DKG hücrelerinin görünümü



B: fura 2 yüklenmiş 1 günlük DKG hücrelerinin flüoresan görünümüleri

Şekil 5. A: CCD-kamera atışmanı aracılığı ile çekilen fotoğrafta 1 günlük sıçan DKG sinir hücrelerinin aydınlık alan görünümü (20X, 0.7 X kamera C-mount), **B:** 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 6. 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).

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

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

2.4.1. *Hot Plate* Testi

Sıcak bir zemin üzerine yerleştirilen hayvanın ısı uyarana vermiş olduğu cevap süresi ölçülerek ağrı eşiğini tespit etmeye yönelik bir termal akut ağrı modelidir. Çalışmada fareler için uygun büyüklükte olan *hot plate* analjezimetre (Harvard,

Edenbridge, İngiltere) kullanıldı. 50 ± 0.5 °C'ye ayarlanmış ve yanları hayvanların dışarı çıkmalarını engelleyecek plastik saydam silindir şeklinde bir bariyerle kapatılmış tabla bölümüne fareler bırakılarak deneyler yapıldı. Farelerin tablaya bırakıldıkları andan itibaren, ekstremitelerini hızla çekmeleri veya yalamalarına kadar geçen süre saniye cinsinden kronometre kullanılarak kaydedildi. Bu testin uygulanması esnasında ortamın sessizliğine büyük önem verildi ve hayvan 60 sn içerisinde cevap vermediği takdirde doku hasarını önlemek amacıyla bu sıcak tabla üzerinden alındı ve çalışmaya dahil edilmedi. Deneylerden önce hem normal hem de diyabetik farelere 5 gün süreyle *hot plate* testi uygulanarak, bütün hayvanların deney şartlarına alışmaları sağlandı (Şekil 7).



Şekil 7. Hot-plate analjezimetre.

2.4.1. 1. Normal Farelerde *Hot Plate* Testi

Fareler rasgele seçilerek kontrol grubu (n=8) ve çözücü grubu (n=8) olmak üzere 2 grup oluşturuldu. Ağrı eşiği çalışmalarına başlamadan önce tüm gruplardaki hayvanların kuyrukları işaretlenerek hayvanlar numaralandırıldı. Başlangıçta farelere herhangi bir enjeksiyon yapılmadan önceki ağrı eşiği değerleri belirlendi. 30'ar dakika aralıklarla bu işlem iki defa tekrarlandı ve bu işlemi takiben çözücü grubundaki hayvanlara intraperitoneal (ip) 0,3 ml serum fizyolojik (SF) verildi.

Enjeksiyonun yapıldığı an 0. dakika kabul edildi ve 30 dakika aralıklarla tüm grupların ağrı eşiği değerleri 240 dakika boyunca ölçüldü.

2.4.1. 2. Diyabetik Farelerde *Hot Plate* Testi

Çalışmanın bu kısmında kullanılacak 70 adet fareye STZ, 150 mg/kg olacak şekilde 0.3 ml (0.1 M) sodyum-sitrat tamponunda (pH:4.5) çözülürerek ip enjeksiyonla tek doz olarak uygulandı (237, 238). Açlık kan glikoz düzeylerini saptamak için farelerin gece 11' de yemleri alındı ve 8-10 saatlik açlık sonrasında sabah 9-10 arasında kan örnekleri alındı. Kuyruk veninden alınan kan glukometre cihazında ölçülerek tokluk kan glikozu > 300 mg/dl'yi geçen fareler, diyabetik olarak kabul edildi.

Diyabet oluşumundan önce farelerin açlık kan glukoz düzeyi 121 ± 4.3 mg/dl iken diyabet oluşumunu takiben 405 ± 16.0 mg/dl olarak ölçüldü. Diyabet geliştikten iki hafta sonra *hot plate* testiyle bu hayvanların ağrı eşiği değerleri incelendi.

Fareler 10'arlı gruplara bölünerek yedi grup oluşturuldu. Kontrol grubuna SF (n=10), diğer üç gruba sırasıyla DMSO'da çözülürülen ve SF ile sulandırılan 1 mg/kg (n=10), 10 mg/kg (n=10) ve 30 mg/kg dozlarda klopidoğrel, kalan üç gruba ise yine sırasıyla DMSO'da çözülürülen ve SF ile sulandırılan 1 mg/kg (n=10), 10 mg/kg (n=10) ve 30 mg/kg dozlarda MRS-2395 uygulandı.

Enjeksiyon yapılmadan 30 dakika önce tüm grupların kontrol kayıtları alındı ve enjeksiyonun yapıldığı zaman 0. dakika olarak kabul edildi. Enjeksiyonu takiben 30., 60., 90., 120., 150., 180. ve 240. dakikada ağrı eşiği değerleri ölçüldü.

2.5. İstatistiksel Metot

Bütün değerler; ortalama $\pm$ standard hata (AO $\pm$ SH) olarak belirlendi. İstatistiksel analizler ve grafikler sırasıyla; SPSS 15.0 ve Sigma Plot 10.0 programları kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirme, *Student's t* testi ve çift yönlü varyans analizi kullanılarak hesaplandı. Çift yönlü varyans analizinin Post-Hoc hesaplaması için ise *Dunnet's* testi kullanıldı. Bağımsız gruplarda, iki grubun karşılaştırması için *Student's t* testi, üçlü grupların karşılaştırması için ise varyans analizi (*Dunnet's* testi) kullanıldı. Tüm analizlerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Giriş

Bu tez çalışmasında antitrombotik etkilere sahip olan klopidoğrel ve MRS 2395'in *in vivo* ve *in vitro* yaklaşımlarla ağrı sinyalleri üzerine etkisi incelendi. *In vitro* çalışmalarda hücre içi flüoresan kalsiyum görüntüleme yöntemi, *in vivo* çalışmalarda ise *hot plate* testi kullanıldı. Aşağıda her iki deney protokolü ile elde edilen bulgular yer almaktadır.

3.1.1.Hücre İçi Flüoresan Kalsiyum Görüntüleme Bulguları

Bu tez çalışmasının gerçekleştirildiği deneysel şartlarda kalsiyuma duyarlı olan fura-2-AM ile yüklenmiş DKG nöronlarından yaklaşık 45-60 dakika stabil flüoresan sinyalleri kaydedilebilmektedir. Kültüre edilmiş sinir hücreleri standart olarak yüksek K^+ (30 mM) ile uyarılmaya cevaben hücre içi serbest kalsiyum ($[Ca^{2+}]_i$) düzeylerinde artış meydana getirir.

Tez çalışmasının bu bölümünde oransal flüoresan kalsiyum görüntüleme yöntemi kullanılarak kültüre edilmiş hücrelerin $[Ca^{2+}]_i$ düzeyinde meydana gelen değişiklikler incelendi. Çalışmalar sırasında hem klopidoğrel hem de MRS 2395'in tıpkı K^+ gibi $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerinde artış meydana getirmesinden dolayı yüksek K^+ 'nın ön uygulaması yapılmadı ve bu iki ajanın $[Ca^{2+}]_i$ üzerine direk etkileri incelendi.

3.1.1.1.Klopidoğrel'in Dorsal Kök Gangliyonlarında Hücre İçi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkileri

Kalsiyuma duyarlı fluoresan boya fura-2AM ile boyanmış izole sıçan DKG nöron kültürlerinde hücre dışına uygulanan klopidoğrel'in farklı dozlarının $[Ca^{2+}]_i$ düzeyleri üzerine etkisi tablo 3'de özetlenmiştir. Hücre dışına uygulanan klopidoğrel doz bağımlı olarak (10 nM, 100 nM ve 300 nM) hücre içi bazal kalsiyum düzeylerinde anlamlı artış meydana getirdi (tablo 4 ve şekil 8, 9, 10). Deneyler yapılırken her bir doz için en az üç farklı kültüre ait lamellerden kayıt alındı. Ayrıca hücre içi kalsiyum düzeylerinde meydana gelen artışın hücre içi depolardan mı yoksa hücre dışından mı kaynaklandığını tespit etmek için 100 nM dozdaki klopidoğrel Ca^{+2} free solüsyonu içeren en az üç lamelde tekrarlandı. Ca^{+2} free solüsyon içeren lamellerde hücre dışına uygulanan klopidoğrel hücre içi bazal kalsiyum düzeylerinde

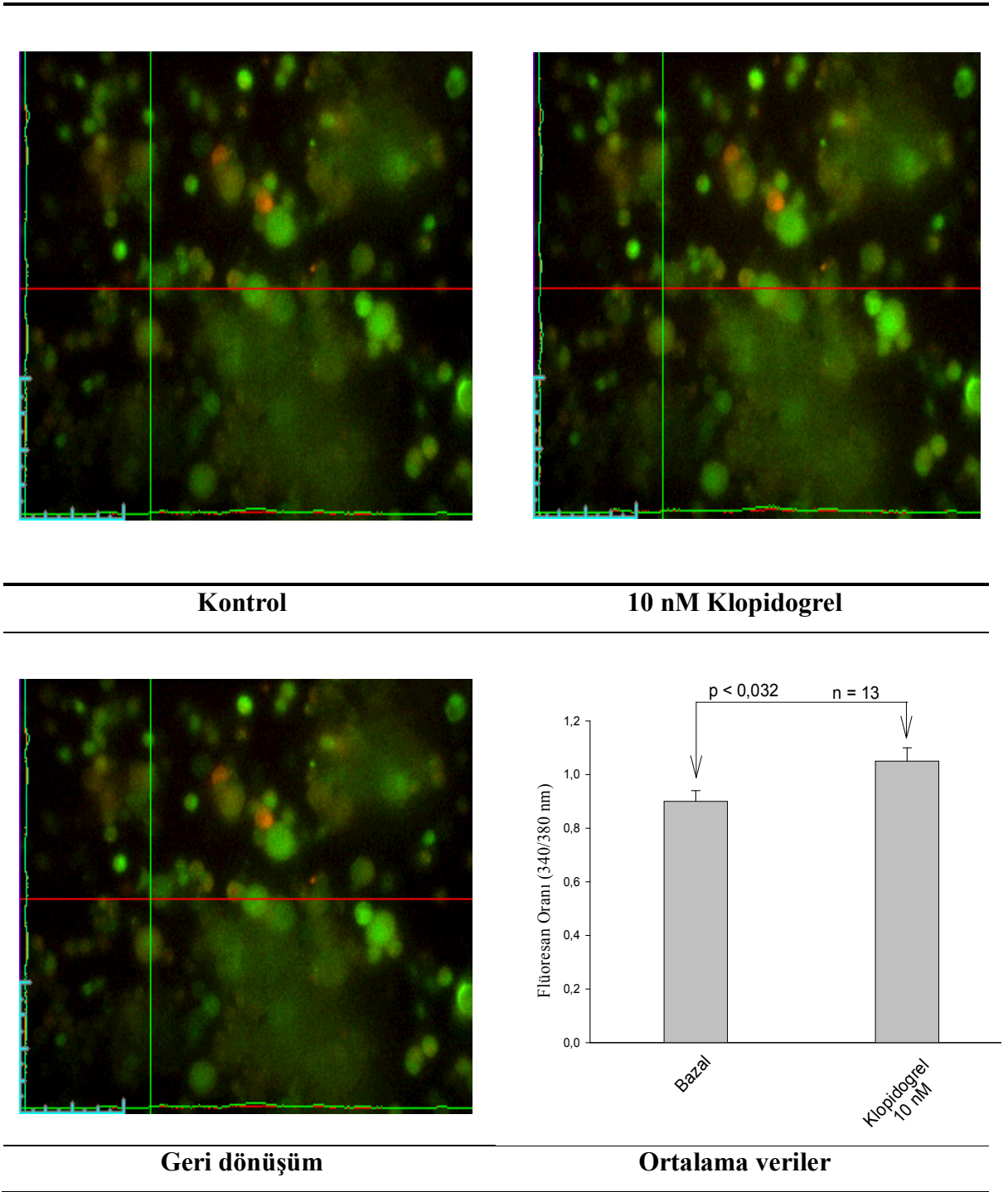
anlamli artış meydana getirdi. Ca^{+2} free solüsyon içeren ortama 2 mM Ca^{+2} eklendiğinde ise hem cevap veren hücre sayısında hem de kalsiyum düzeylerindeki yükselmede artış meydana geldi (şekil 11). Yapılan deneylerde klopidoğrelın sıçan DKG hücrelerinde meydana getirdiğı kalsiyum artışının farklı patternlere sahip olduğı görüldü. Bu farklı yanıtlara ait orijinal örnekler şekil 12’de sunulmuştur.

Tablo 3. Klopidoğrelın sıçan DKG nöronlarında hücre içi kalsiyum düzeylerine (340/380 nm floresan oranları) etkilerinin özetlenmesi.

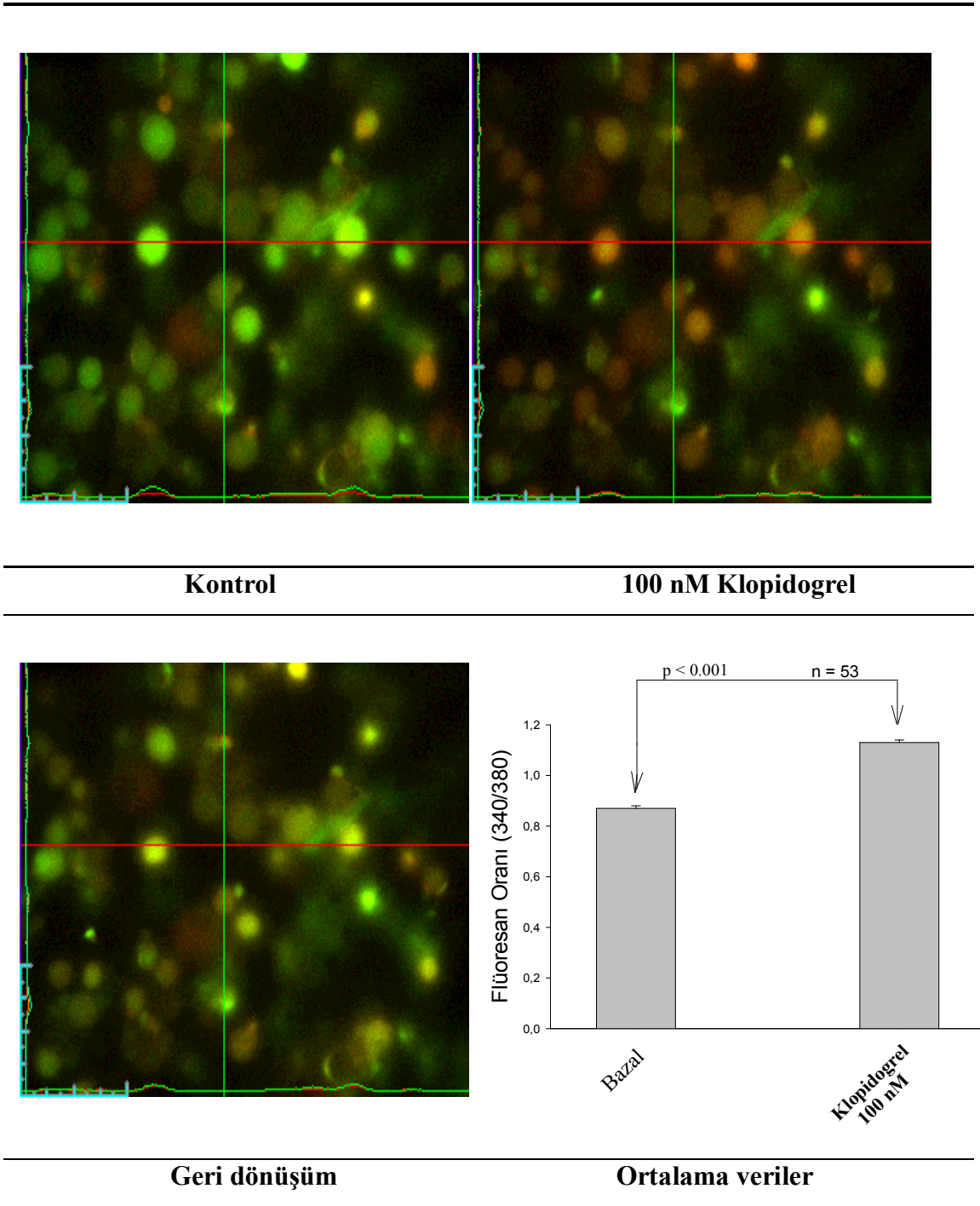
	Konsantrasyon (nM)	Cevap veren n (%)	Cevap vermeyen n (%)	Toplam n (%)
Klopidoğrel	10	13 (22)	47 (78)	60 (100)
	100	53 (46)	62 (54)	115 (100)
	300	57 (54)	49 (46)	106 (100)

Tablo 4. Klopidoğrelın sıçan DKG nöron kültürlerinde hücre içi bazal kalsiyum düzeylerine (340/380 nm floresan oranı) etkisi.

	Doz (nM)	Floresan Oranı (340/380 nM)		p	n
		Bazal	Klopidoğrel		
Klopidoğrel	10	0.89±0.05	1.03±0.05	0.032	13
	100	0.87 ±0.01	1.13±0 .01	0.001	53
	300	0.70 ±0.02	1.16±0.03	0.001	57

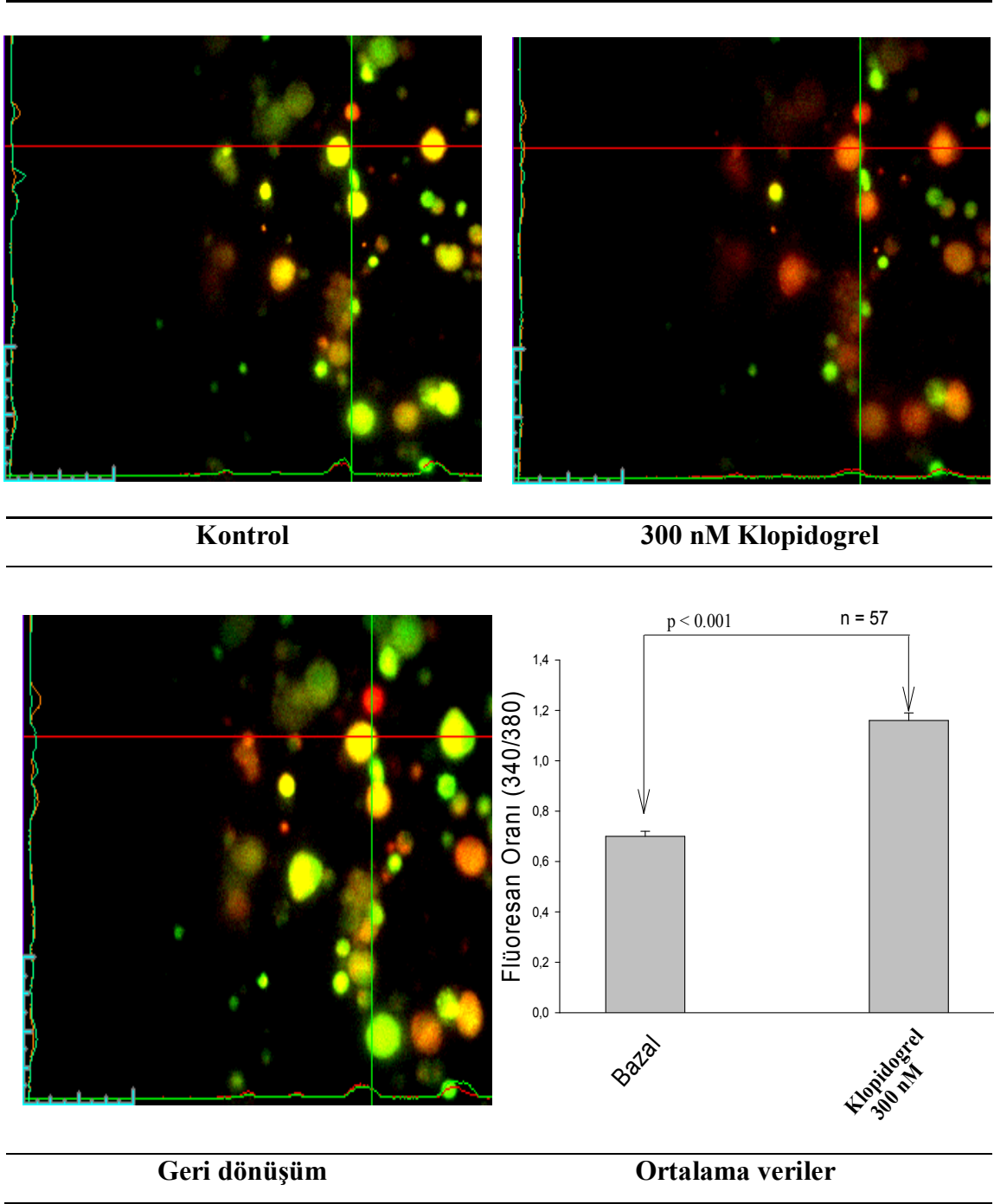


Şekil 8. 10 nM klopidoğrel in sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi. Şekilde fura-2 AM ile yüklenmiş DKG nöronlarında 10 nM klopidoğrel in meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren orijinal kayıt örnekleri ve ortalama verilerden elde edilmiş grafik sunulmuştur. Hata çubukları SEM'i göstermektedir.

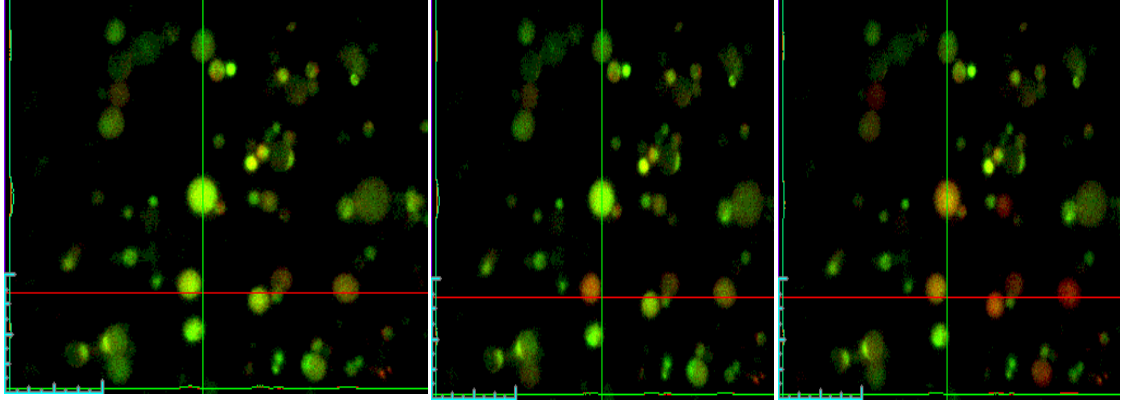


Şekil 9. 100 nM klopidoğrelin sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi.

Şekilde fura-2-AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde 100 nM klopidoğrel uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait orijinal kayıt örnekleri ve ortalama verilerden geliştirilmiş grafik sunulmuştur.



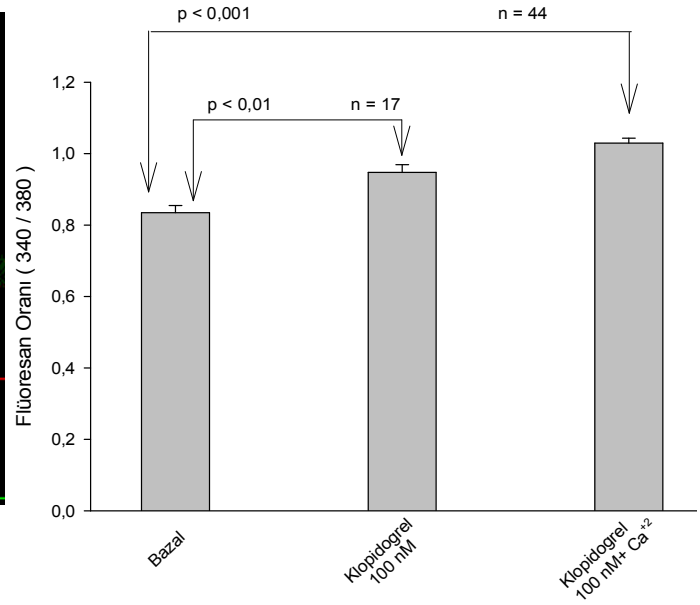
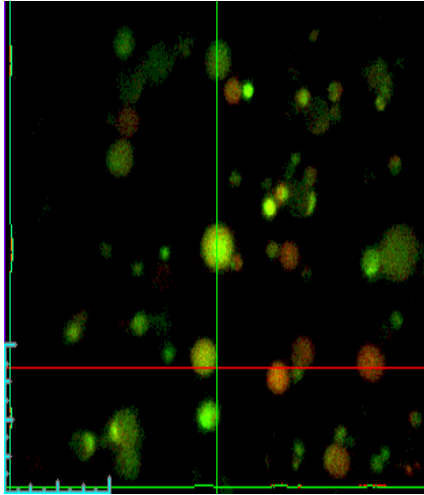
Şekil 10. 300 nM klopidoğrelın sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi. Şekilde fura-2 AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde 300 nM klopidoğrel uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren bir deney uygulamasına ait orijinal kayıt örnekleri ve ortalama verilerden geliştirilmiş grafik sunulmuştur.



Kontrol

100 nM Klopidoğrel

100nM Klopidoğrel+Ca²⁺

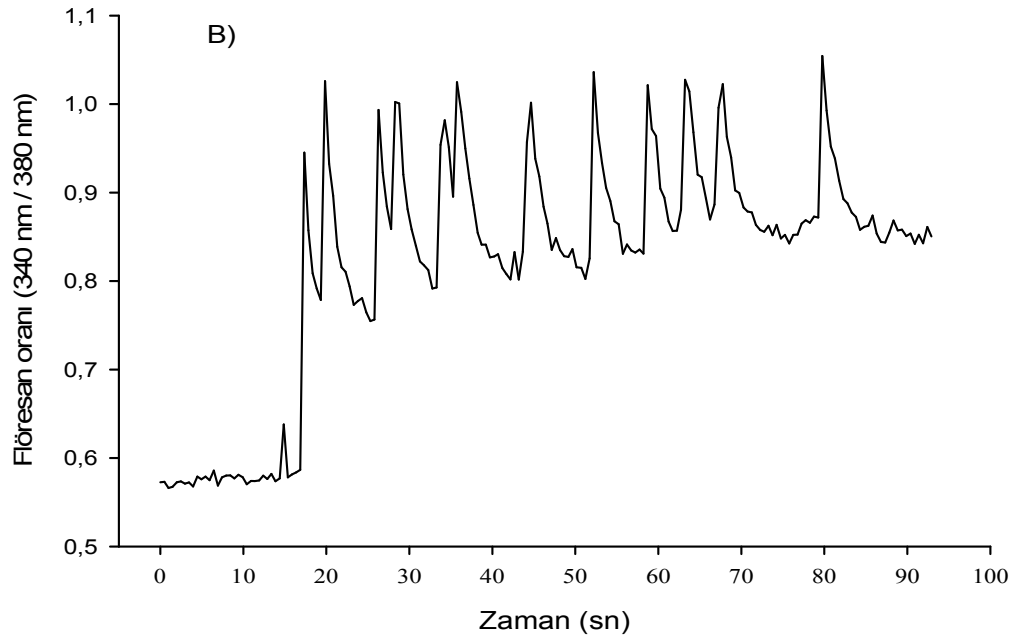
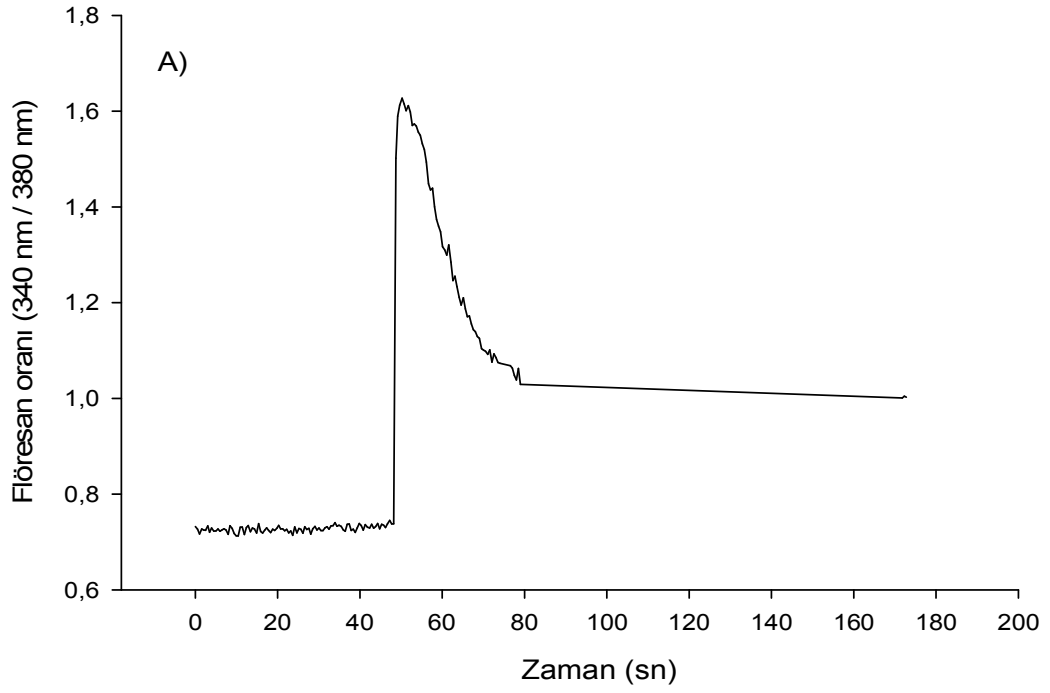


Geri dönüşüm

Ortalama veriler

Şekil 11. Ca²⁺ free solüsyonu içeren lamellerde 100 nM klopidoğrelın sıçan DKG hücrelerinde [Ca²⁺]_i düzeylerine etkisi.

Şekilde fura-2 AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde 10 nM Klopidoğrel uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren deney uygulamasına ait kayıt örnekleri ve ortalama verilerden geliştirilmiş grafik sunulmuştur.



Şekil 12. Klopidoğrelın sıçan DKG hücrelerinde meydana getirdiği farklı kalsiyum artış patternleri A) Klopidoğrelın tetiklediği uzun süreli kalsiyum artışı B) DKG nöronlarında klopidoğrelın meydana getirdiği kalsiyum osilasyonları.

3.1.1.2. MRS 2395'in Dorsal Kök Gangliyonlarında Hücre İçi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkileri

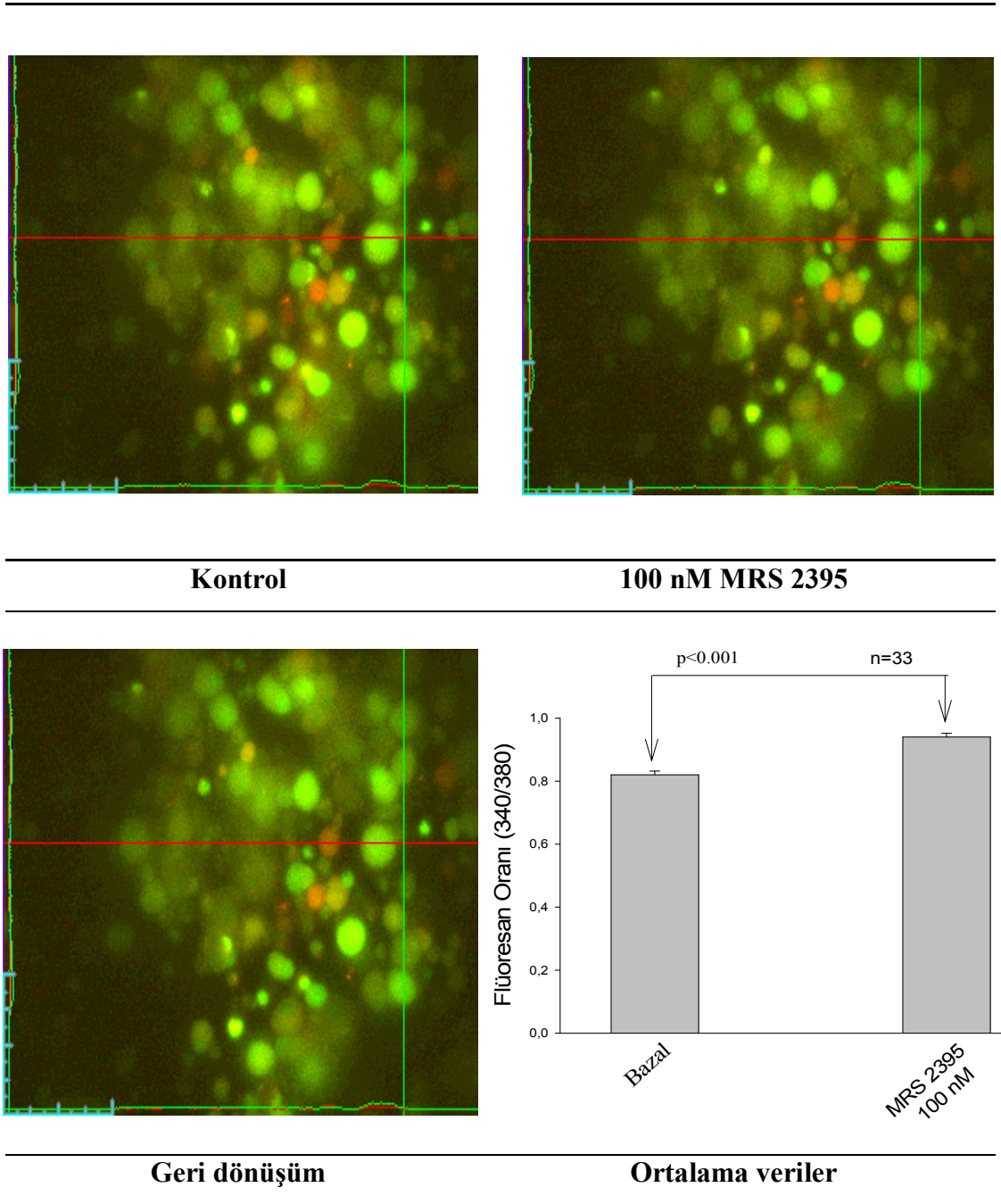
Kalsiyuma duyarlı fura-2AM floresan boya ile işaretlenmiş izole sıçan DKG nöron kültürlerinde hücre dışına uygulanan MRS 2395'in farklı dozlarının $[Ca^{2+}]_i$ düzeyleri üzerine etkisi tablo 5'te özetlenmiştir. Hücre dışına uygulanan MRS 2395 klopidoğrel gibi doz bağımlı olarak (100 nM, 1 μ M ve 10 μ M) hücre içi bazal kalsiyum düzeylerinde anlamlı artış meydana getirdi (tablo 6 ve şekil 13, 14, 15). Deneyler yapılırken her bir doz için en az üç lamel kullanıldı. Bunun yanısıra hücre içi kalsiyum düzeylerinde meydana gelen artışın hücre içi depolardan mı yoksa hücre dışından mı kaynaklandığını tespit etmek için 100 nM dozdaki MRS 2395 Ca^{+2} free solüsyonu içeren en az üç lamelde tekrarlandı. Ca^{+2} free solüsyon içeren lamellerde hücre dışına uygulanan MRS 2395 hücre içi bazal kalsiyum düzeylerinde anlamlı artış meydana getirdi. Ca^{+2} free solüsyon içeren ortama 2 mM Ca^{+2} eklendiğinde ise hem cevap veren hücre sayısında hem de kalsiyum düzeylerindeki yükselmeye artış meydana geldi (Şekil 16). Klopidoğrel deneylerinde olduğu gibi MRS 2395'in de DKG hücrelerinde meydana getirdiği kalsiyum artışının farklı patternlere sahip olduğu görüldü. Bu farklı yanıtlara ait orijinal örnekler şekil 17'de sunulmuştur.

Tablo 5. MRS 2395'in sıçan DKG nöronlarında hücre içi kalsiyum düzeylerine (340/380 nm floresan oranları) etkilerinin özetlenmesi.

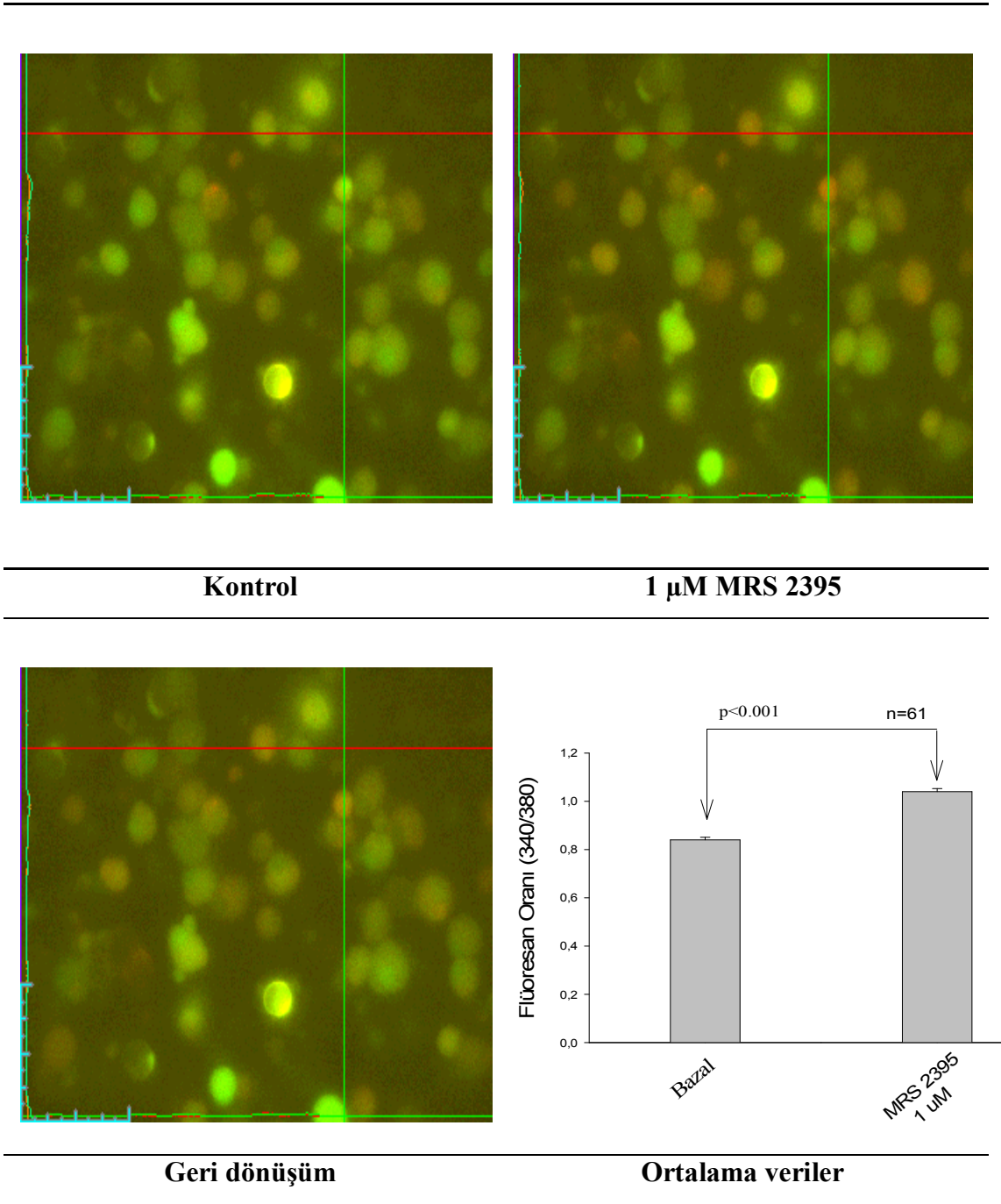
	Konsantrasyon (μ M)	Cevap veren n (%)	Cevap vermeyen n (%)	Toplam n (%)
MRS 2395	0.1	33 (35)	62 (65)	95 (100)
	1	61 (52)	57 (48)	118 (100)
	10	86 (78)	24 (12)	110 (100)

Tablo 6. MRS 2395'in sıçan DKG nöron kültürlerinde hücre içi bazal kalsiyum düzeylerine (340/380 nm floresan oranı) etkisi.

	Doz (μ M)	Fluoresan Oranı (340/380 nM)		p	n
		Bazal	MRS 2395		
MRS 2395	0.1	0.82 $\pm$ 0.012	0.94 $\pm$ 0.012	0.001	33
	1	0.84 $\pm$ 0.011	1.04 $\pm$ 0.013	0.001	61
	10	0.59 $\pm$ 0.011	1.30 $\pm$ 0.021	0.001	86

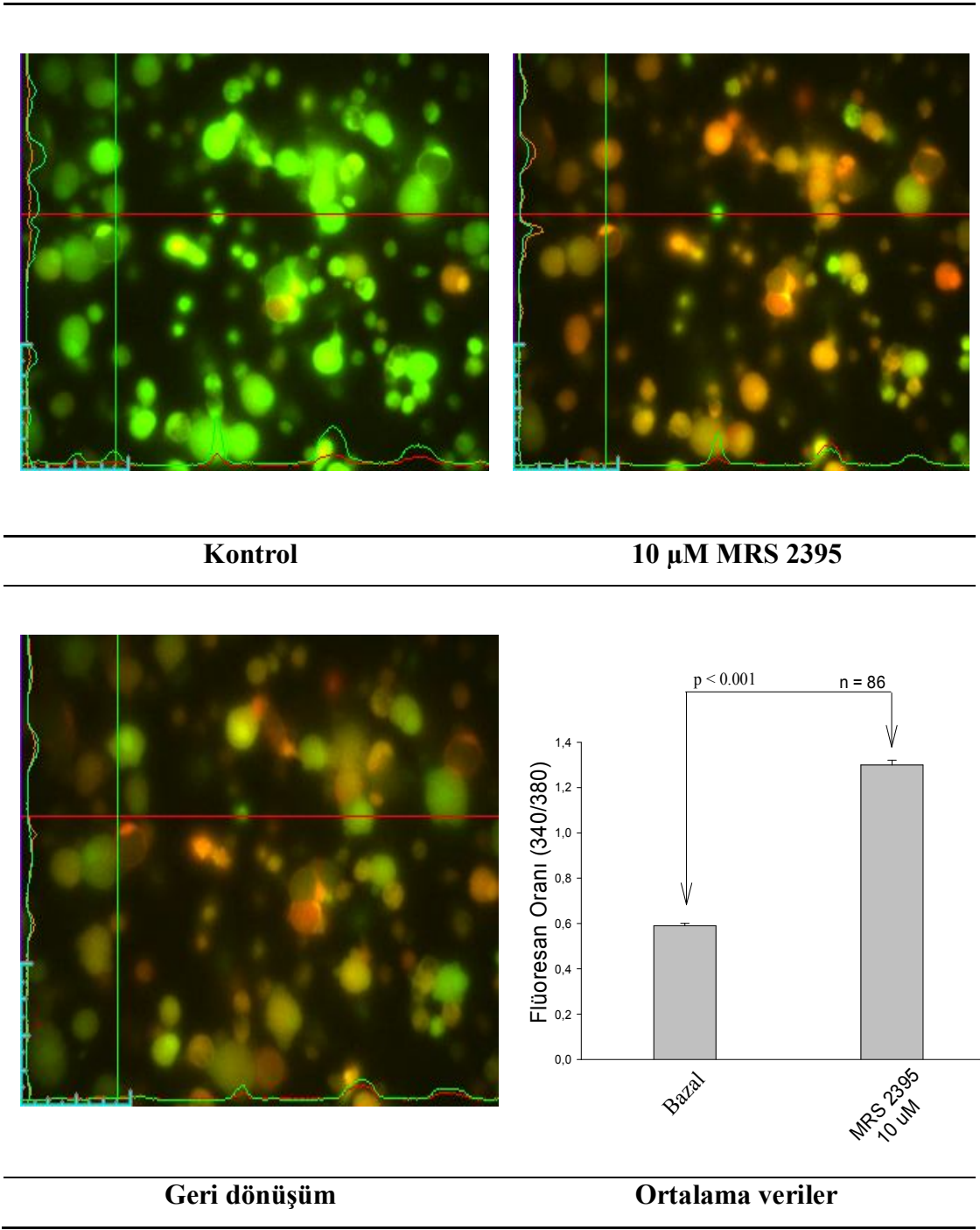


Şekil 13. 100 nM MRS 2395'in sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi. Şekilde fura-2- AM ile yüklenmiş DKG sınır hücrelerinde 100 nM MRS 2395 uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait orijinal kayıt örnekleri ve ortalama verilerden geliştirilmiş grafik sunulmuştur.

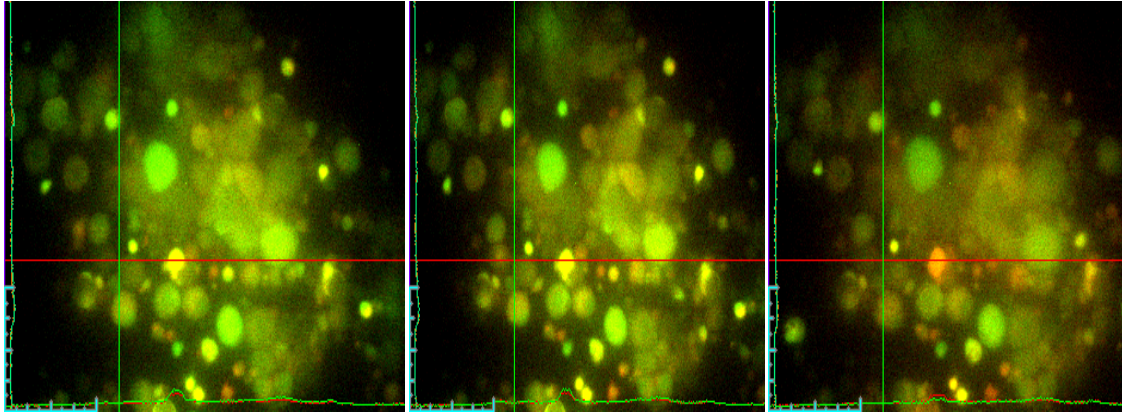


Şekil 14. 1 μM MRS 2395'in sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi.

Şekilde fura-2-AM ile yüklenmiş DKG sınır hücrelerinde 1 μM MRS 2395 uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait orijinal kayıt örnekleri ve ortalama verilerden geliştirilmiş grafik sunulmuştur.



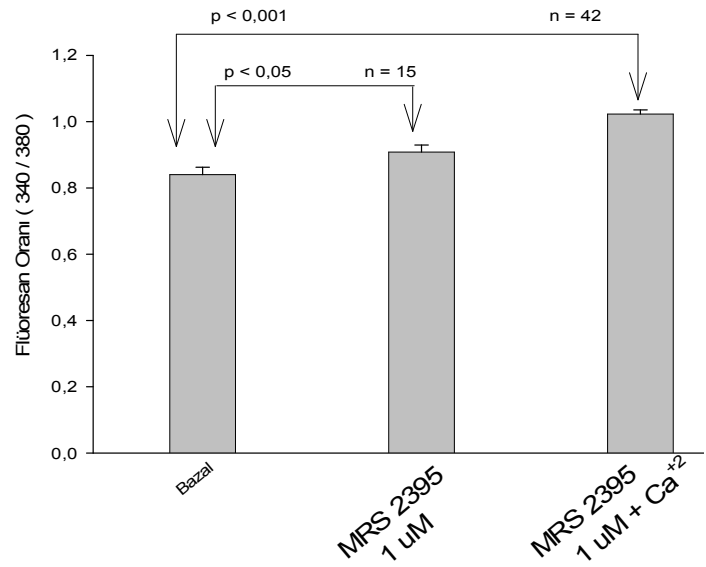
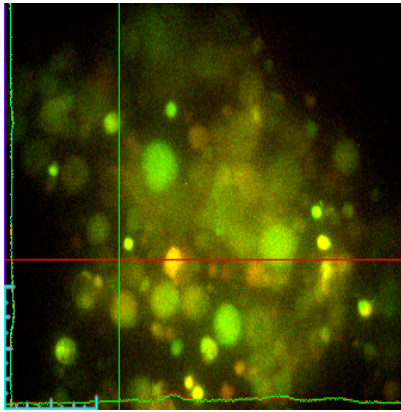
Şekil. 15. 10 μM MRS 2395'in sıçan DKG hücrelerinde $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeylerine etkisi. Şekilde fura-2-AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde 10 μM MRS 2395 uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait orijinal kayıt örnekleri ve ortalama verilerden geliştirilmiş grafik sunulmuştur.



Kontrol

1 μM MRS 2395

1 μM MRS 2395 + Ca⁺²

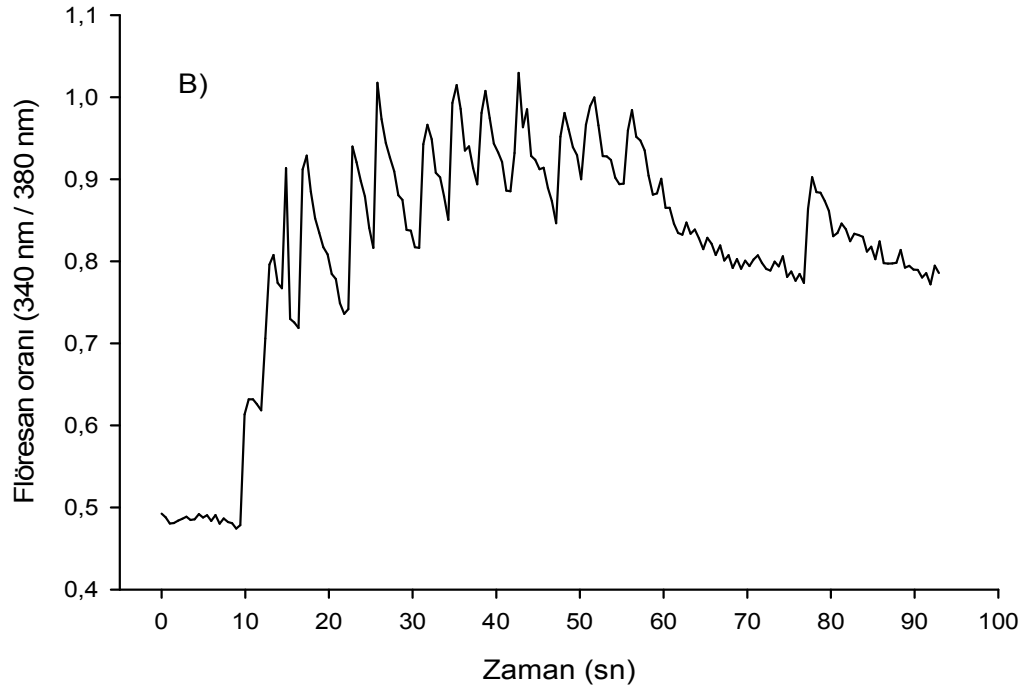
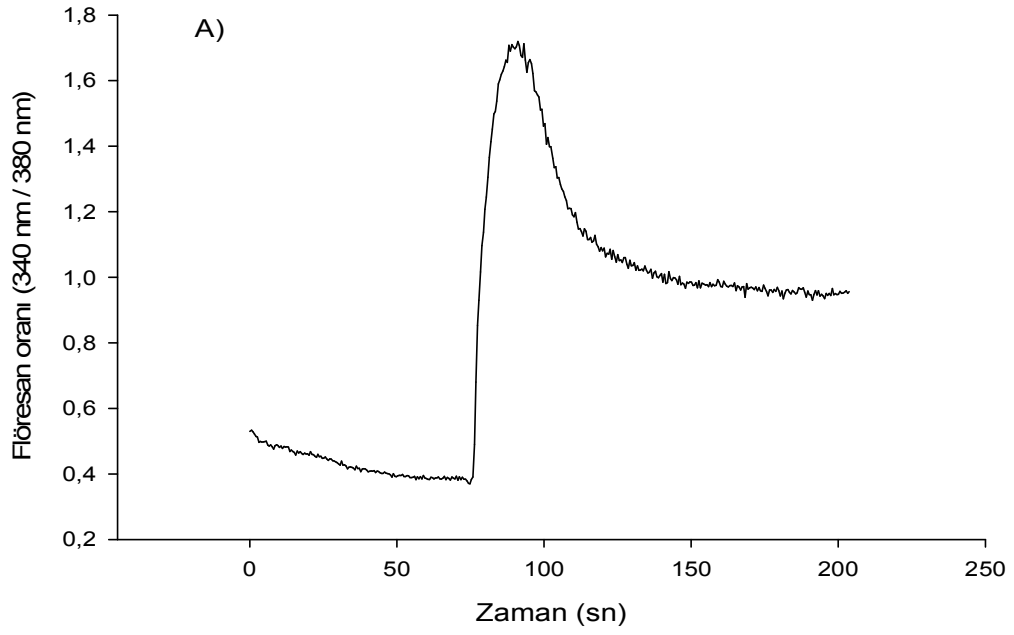


Geri dönüşüm

Ortalama veriler

Şekil 16. Ca⁺² free solüsyonu içeren lamellerde 1 μM MRS 2395'in sıçan DKG hücrelerinde [Ca⁺²]_i düzeylerine etkisi.

Şekilde fura-2-AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde 1 μM MRS 2395 uygulamasının meydana getirdiği flüoresan oranı değişikliğini gösteren tipik bir deney uygulamasına ait orijinal kayıt örnekleri ve ortalama verilerden geliştirilmiş grafik sunulmuştur.



Şekil 17. MRS 2395 sıçan DKG hücrelerinde meydana getirdiği farklı kalsiyum artış patternleri A) MRS 2395 tetiklediği uzun süreli kalsiyum artışı B) DKG nöronlarında MRS 2395 meydana getirdiği kalsiyum osilasyonları.

3.1.2. Normal ve Diyabetik Farelerde Ağrı Eşiğinin Tespit Edilmesi

Normal ve diyabetik farelerde ağrı eşiği *hot plate* testi ile incelendi. Fareler sıcak bir zemin üzerine bırakıldı ve ısı uyarana davranışsal cevap oluşturmaya kadar geçen süre ölçüldü. Bu ısı uyarana karşı oluşan davranışsal cevap, hayvanın ön ayaklarını yalaması, ayaklarını hızla karnına doğru çekmesi veya zıplaması, ağrı eşiği olarak kabul edildi.

İntak grup, çözücü verilen grup ve diyabet grubunda ağrı eşiği değerleri 0. dakikadan 240. dakikaya kadar 30 dakika aralıklarla ölçüldü. Bu gruplarda sırası ile ağrı eşiği değerleri ortalama 23.7 ± 0.8 , 23.4 ± 0.6 ve 20.5 ± 0.7 sn olarak ölçüldü. İntak grup ile çözücü grubu arasında ağrı eşiği değerleri arasında fark yokken diyabet oluşturulan farelerde yaklaşık %15 oranında ($p < 0.05$) ağrı eşiği değerlerinde azalma tespit edildi (Tablo 7).

Tablo 7. Normal (n=8), çözücü (n=8) ve diyabetik (n=10) farelerin hot-plate testinde ağrı eşiği değerleri.

	0	30	60	90	120	150	180	240
Kontrol	23.3 ± 0.6	24.1 ± 0.9	23.3 ± 1.2	23.2 ± 0.8	24.2 ± 0.6	22.9 ± 0.7	23.5 ± 0.8	23.2 ± 0.7
Çözücü	23.8 ± 0.5	23.1 ± 1	23.9 ± 0.4	23 ± 0.8	23.2 ± 0.9	23.7 ± 0.6	24.1 ± 0.4	23.8 ± 0.5
Diyabet	21 ± 0.5	21 ± 0.6	20.3 ± 0.4	21 ± 0.7	19.6 ± 1.1	20.3 ± 0.6	20.6 ± 0.4	20.4 ± 0.8

3.1.2. 1. Diyabetik Farelerde Klopidoğrel ve MRS 2395'in Ağrı Eşiği Üzerine Etkisi

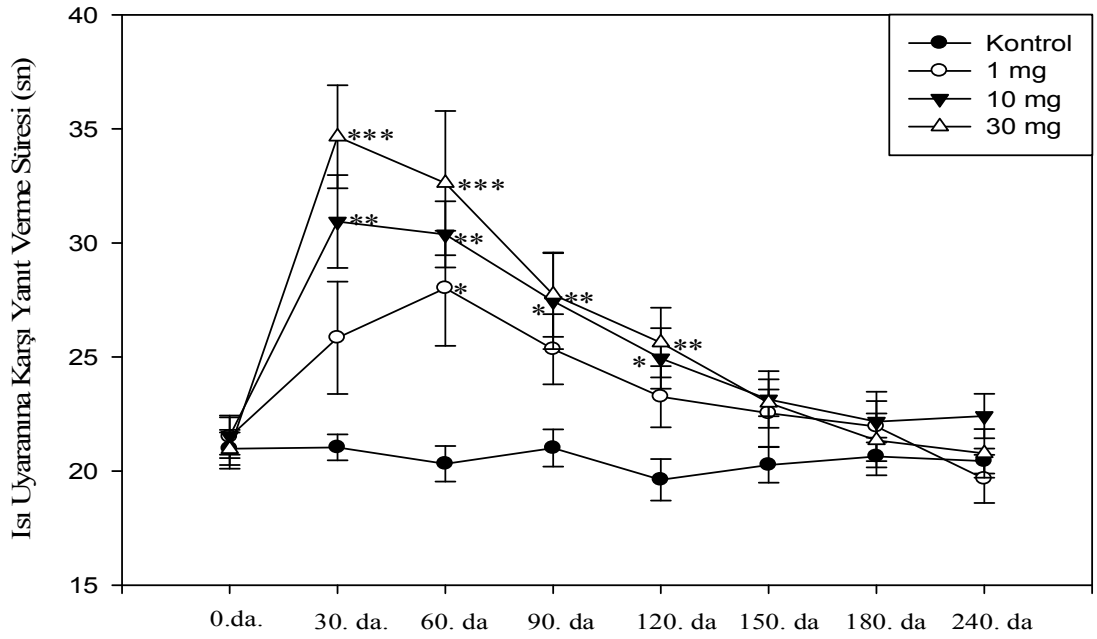
Diyabetik farelerde, klopidoğrel ağrı eşiği üzerine etkisi zaman ve doz bağımlı olarak incelendi. Öncelikle klopidoğrel uygulanmadan önce serum fizyolojik uygulanan diyabetik farelerin kontrol kayıtları alındı. Daha sonra klopidoğrel 3 farklı dozu 1, 10 ve 30 mg/kg olarak diyabetik farelere uygulandı ve 240 dakika boyunca 30 dakika aralıklarla ağrı eşiği ölçümleri alındı. 1, 10 ve 30 mg/kg dozlarda klopidoğrel uygulamasından önce ağrı eşiği değerleri ölçüldüğünde her bir grup için sırasıyla 21.5 ± 0.6 , 21.5 ± 0.8 ve 20.9 ± 0.8 sn idi. 30. dakikada ağrı eşiği sırasıyla

25.8±2.5, 30.9±2 (p<0.01) ve 34.6±2.2 (p<0.001) sn'ye yükseldi. 60. dakikada ağrı eşiği değerleri yine sırasıyla 28±2.5 (p<0.05), 30.3±1.4 (p<0.01) ve 32.6±3.1 (p<0.001) sn olarak ölçüldü. 90. dakikada ağrı eşikleri 25.3±1.5, 27.4±2.1 (p<0.05) ve 27.7±1.8 (p<0.01) sn'ye çıktı. 120. dakika ise 1 ve 10 mg/kg klopidoğrel uygulanan gruplarda ağrı eşikleri 24.9±1.3 (p<0.05), 25.6±1.5 (p<0.01) olarak ölçüldü. 150 ve sonraki ölçümlerde ağrı eşiği değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu (Tablo 8 ve Şekil 18).

MRS 2395'in diyabetik farelerde ağrı eşiği üzerine etkisi zaman ve doz bağımlı olarak incelendi. MRS 2395'in 3 farklı dozu 1, 10 ve 30 mg/kg olarak diyabetik farelere uygulandı ve 240 dakika boyunca 30 dakika aralıklarla ağrı eşiği ölçümleri alındı. 1, 10 ve 30 mg/kg dozlarda MRS 2395 uygulamasından önce ağrı eşiği değerleri ölçüldüğünde her bir grup için sırasıyla 21.8±0.2, 21.3±0.7 ve 20.6±0.9 sn idi. 30. dakikada ağrı eşiği sırasıyla 30±1.9 (p<0.01), 32.9±2 (p<0.001) ve 37.3±2.5 (p<0.001) sn'ye yükseldi. 60. dakikada yine sırasıyla 23.8±0.9, 30.2±1.9 (p<0.001) ve 33.7±2.3 (p<0.001) sn olarak ölçüldü. 90. dakikada ise ağrı eşiği değerleri sırasıyla 22.9±1, 26.4±0.7 (p<0.01) ve 31.9±1.9 (p<0.001) sn'ye çıktı. 120. dakikada ağrı eşikleri 21.5±0.7, 24.8±0.9 (p<0.01) ve 27.9±1.8 (p<0.001) sn'ye olarak ölçüldü. 150. dakika ve sonraki ölçümlerde ağrı eşiği değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu (Tablo 9 ve Şekil 19).

Tablo 8. Kontrol grubu ve klopidoğrel uygulanan diyabetik farelere ait ağrı eşiği değerleri (n=10 her bir uygulama gurubu için).

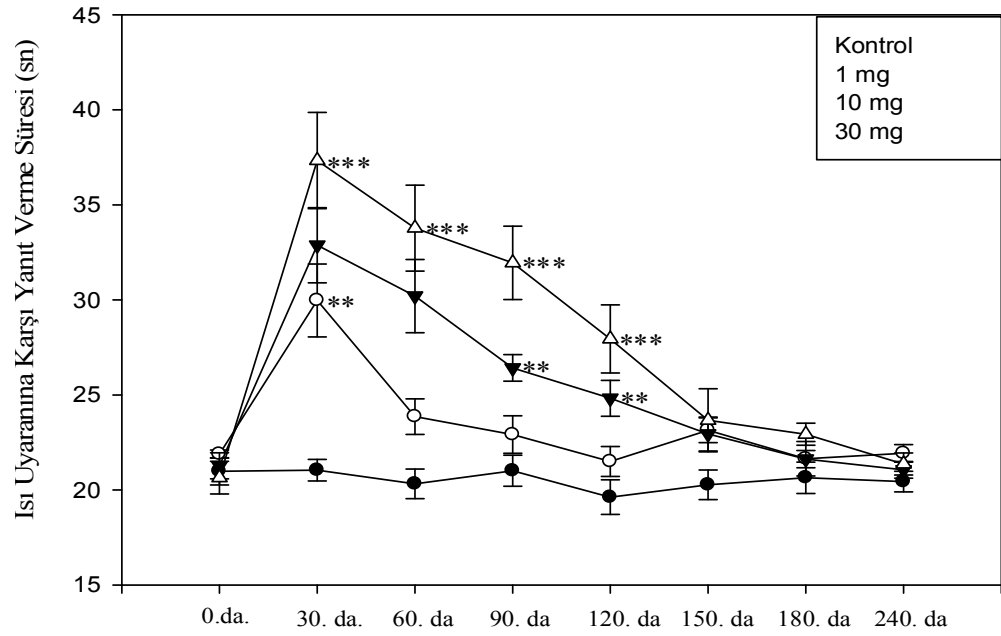
	0	30	60	90	120	150	180	240
Kontrol	21±0.5	21±0.6	20.3±0.4	21±0.7	19.6±1.1	20.3±0.6	20.6±0.4	20.4±0.8
1 mg/kg	21.2±0.6	25.8±2.5	28±2.5	25.3±1.5	23.3±1.3	22.5±1.5	22±1.5	19.7±1.1
Klopidoğrel								
10 mg/kg	21 ±0.8	30.9±2	30.4±1.5	27.5±2.1	24.9±1.3	23.1±1.2	22.2±0.9	22.4±1
Klopidoğrel								
30 mg/kg	21±0.9	34.7±2.3	32.6±3.2	27.7±1.9	25.6±1.5	25.2±1.5	21.3±1.2	20.8±1.1
Klopidoğrel								



Şekil 18. Klopidoğrelın (1,10 ve 30 mg/kg, i.p.) hot-plate testi uygulanan diyabetik farelerde ısı uyarısına karşı verdiği yanıtın ortalama $\pm$ SH değerleri (n=10, her bir uygulama grubu için, *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Tablo 9. Kontrol grubu ve MRS 2395 uygulanan diyabetik farelere ait ağrı eşiği değerleri (n=10 her bir uygulama grubu için).

	0	30	60	90	120	150	180	240
Kontrol	21 $\pm$ 0.5	21 $\pm$ 0.6	20.3 $\pm$ 0.4	21 $\pm$ 0.7	19.6 $\pm$ 1.1	20.3 $\pm$ 0.6	20.6 $\pm$ 0.4	20.4 $\pm$ 0.8
1 mg/kg MRS 2395	21.9 $\pm$ 0.2	30.0 $\pm$ 1.9	24.9 $\pm$ 1.7	25.8 $\pm$ 1.4	25.0 $\pm$ 1.1	23.9 $\pm$ 0.6	24.3 $\pm$ 0.6	22.5 $\pm$ 0.2
10 mg/kg MRS 2395	21.3 $\pm$ 0.7	32.9 $\pm$ 2	30.2 $\pm$ 1.9	25.6 $\pm$ 1.2	25.2 $\pm$ 1.0	22.9 $\pm$ 0.8	23.2 $\pm$ 0.4	21.1 $\pm$ 0.4
30 mg/kg MRS 2395	20.6 $\pm$ 0.9	37.3 $\pm$ 2.5	33.8 $\pm$ 2.3	31.9 $\pm$ 1.9	27.9 $\pm$ 1.8	23.7 $\pm$ 1.7	24.0 $\pm$ 0.9	21.4 $\pm$ 0.6



Şekil 19. MRS 2395'in (1, 10 ve 30 mg/kg, i.p.) hot-plate testi uygulanan diyabetik farelerde ısı uyarana karşı verdiği yanıtın ortalama $\pm$ SH değerleri (n=10, her bir uygulama grubu için, *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında klopidoğrel ve MRS 2395'in ağrı sinyalleri üzerine olan etkileri 1-3 günlük sıçanlara ait DKG hücre kültürlerinde flüoresan kalsiyum görüntüleme yöntemiyle ve diyabetik farelerde nosiseptif davranış testi (*hot plate* testi) kullanılarak incelendi.

4.1. Kalsiyum Görüntüleme Deneyi Bulguları

Son elektrofizyolojik, davranışsal ve biyokimyasal çalışmalar P2 reseptörlerinin ağrı sinyallerinin düzenlenmesinde önemli rollerinin olduğunu göstermektedir (239, 240). P2X reseptörlerinin periferik ve merkezi ağrı iletiminde hücre dışı ATP'nin hedefi olduğu açık bir şekilde gösterilmiştir. DKG nöronlarında ağrı iletimine spesifik olan ve kapsaisine duyarlı küçük çaplı afferent nöronlarda P2X₃ reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir (210). Ayrıca nosiseptif duyuşal nöronların sinir sonlanma bölgelerinde ve gövdelerinde P2X₃ reseptör immüno-reaktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (241). Yapılan bir çalışmada α,β -metilen-ATP küçük çaplı kapsaisin duyarlı duyuşal afferent nöronlarda depolarizasyona sebep olmuştur (211), ve ATP presinaptik P2X reseptörleri aracılığı ile duyuşal afferent nöronlardan glutamat salıverilmesini kolaylaştırmıştır (242). Çeşitli P2X reseptörlerinin postsinaptik dorsal boynuz nöronlarında ekspresyonunu gösterilmiştir (240). Elektrofizyolojik çalışmalara ait verilerde, P2X reseptör agonisti olan ATP ve α,β -metilen-ATP kapsaisin duyarlı küçük çaplı afferent nöronlarda (211) ve spinal dorsal boynuz nöronlarında içeri doğru akımları aktive ettiği gösterilmiştir (243). *In vivo* çalışmalarda periferik olarak uygulanan ATP ve α,β -metilen-ATP nosiseptif cevaplar oluşturmuş (244) ve formalinin indüklediği cevapları kolaylaştırmıştır (245). İntratekal olarak uygulanan α,β -metilen-ATP termal hiperaljeziyi (246) ve taktıl allodiniyi (247) indüklemiştir. Bu gözlemler ATP'nin periferik ve spinal ağrı iletimini P2X reseptörleri aracılığı ile kolaylaştırılmasında önemli rol oynadığını güçlü bir şekilde desteklemektedir.

P2X reseptörleri ile kıyaslandığında, geniş bir dağılıma sahip metabotropik P2Y reseptörlerinin normal ve patolojik ağrıdaki rolleri daha az incelenmiştir. P2X reseptörlerinde yapılan öncül çalışmalarla kıyaslandığında ağrıyla ilgili durumlarda spesifik P2Y reseptör antagonistlerinin eksikliği bu alanda şu ana kadar yapılan

çalışmaları kısıtlamıştır (248). Bununla birlikte P2Y reseptörlerinin trigeminal gangliyon, nodoz gangliyon ve DKG nöronlarında ekspresyonunun gösterilmesi bu reseptörlerin periferik somatosensoriyal iletimde rollerinin olabileceğini göstermektedir (225).

Ağrı sinyallerinin düzenlenmesinde P2Y reseptörü aracılığı ile meydana gelen olaylar birbirinden farklıdır. Çünkü P2Y reseptörlerinin hem analjezik hem de algojenik etkileri tanımlanmıştır. Örneğin P2Y₁ alt tipinin DKG nöronlarında P2X₃ reseptörlerini ve voltajla aktive olan kalsiyum kanallarını inhibe etmesi ADP'nin anti algojenik etkileri olduğunu desteklemektedir (249). Fakat DKG nöronlarında UTP ile P2Y₂ reseptörlerinin aktivasyonu kapsaisinin indüklediği akımları TRPV₁ aracılığı ile kolaylaştırır. Bu bulgu da UTP'nin algojenik bir uyarı oluşturabileceğini göstermektedir (214). İntratekal olarak uygulanan UTP ve UDP ise şaşırtıcı bir şekilde analjezik etki meydana getirmiştir (250). Bu etki muhtemelen glial hücrelerden sitokin salıverilmesinin inhibisyonu sonucu meydana gelmektedir. Bu bulgular P2Y reseptörlerinin in vivo ve in vitro şartlarda ağrı iletiminde farklı rolleri olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasının ilk bölümünde flüoresan kalsiyum görüntüleme yöntemi ile DKG nöronlarında hücre içi kalsiyum değişiklikleri incelendi. Bu çalışmada kullanılan P2Y₁₂ reseptörünün selektif antagonistleri olan klopidoğrel ve MRS 2395 doz bağımlı olarak hücre içi bazal serbest kalsiyum düzeylerinde belirgin artış meydana getirdi.

DKG nöronlarındaki P2Y₁ reseptörlerinin aktivasyonu N-tipi (Cav2.2) kalsiyum kanalları aracılığı ile oluşturulan akımları ve P2X₃ reseptörlerini modüle eder. Gerçekten, N-tipi (Cav2.2) kalsiyum kanallarının aktivasyonu DKG nöron kültürlerinde ATP ve hatta daha güçlü bir şekilde P2Y_{1,12,13} reseptör agonisti ADP tarafından inhibe edilmiştir. ATP'nin etkileri PPADS'ta olduğu gibi selektif P2Y₁ reseptör antagonisti olan MRS 2179 tarafından bloklanmıştır (214). ATP ve ADP'nin N tipi kalsiyum akımları üzerine bu inhibe edici etkilerinin olması ve bu etkilerin selektif P2Y₁ reseptör antagonisti tarafından bloklanması bulgusu bizim yaptığımız çalışmadaki hücre içi kalsiyum artışı bulgusunu desteklemektedir.

Yaptığımız çalışmada $[Ca^{2+}]_i$ miktarındaki artış kaynaklarını tespit etmek için deneylerimizi kalsiyum *free* solüsyonu içeren lamellerde de gerçekleştirdik.

Yaptığımız deneylerde hem klopidoğrelın hem de MRS 2395'in kalsiyum free solüsyonda DKG nöronlarında $[Ca^{2+}]_i$ miktarını artırdığını tespit ettik. Bunun yanı sıra kalsiyum free solüsyon içeren lamellere dışarıdan 2 mM Ca^{+2} eklediğimizde hem $[Ca^{2+}]_i$ miktarında hem de cevap veren hücre sayısında artış meydana geldiğini gördük. Bilindiği gibi tüm P2X reseptörleri non selektif katyon kanallarıdır ve Ca^{+2} , Na^{+} ve K^{+} gibi iyonlara hemen hemen eşit oranda geçirgendir (251). Yapılan bir çalışmada P2Y_{1,12,13} reseptör agonistlerinin primer DKG kültürlerinde P2X₃ reseptörleri tarafından tetiklenen akımları inhibe ettiği gösterilmiştir (249). Çalışmamızda kullandığımız selektif P2Y₁₂ reseptör antagonistleri muhtemelen P2X reseptörleri aracılığı veya daha farklı yollarla hücre dışı ortamdan hücre içine kalsiyum girişini tetikleyebilir.

DKG dahil MSS ve periferik sinirlerde, sarkoplazmik retikulumda bulunan hücre zarına yakın özelleşmiş bölgelerden kalsiyum saçılması ya da kıvılcımı (spark) olarak adlandırılan durum sonucu spontan olarak veya kalsiyum aktiveli kalsiyum salıverilme mekanizması ile lokal bir alana kalsiyum salıverilmektedir (252). Flüoresan kalsiyum görüntüleme deneylerinde hem klopidoğrel hem de MRS 2395 bazı hücrelerde kalsiyum sparkları oluşturdu. Oluşan bu sparkların sayısı bazı hücrelerde 12-15 civarındaydı. Sarkoplazmik retikulumun bu özelleşmiş bölgelerinden salıverilen lokal kalsiyum artışı nöronların gövdesinden veziküler egzozitozisin tetiklenmesi ve düzenlenmesinde rol oynamaktadır (253). Uyarılmış DKG nöronlarında meydana gelen bu somatik sekresyon muhtemelen kendisi dahil komşu nöronların da aktivitesini modüle ederek periferik ve MSS'de duyuşal ve nosiseptif girdilerin iletilmesinde veya düzenlenmesinde görev alabilir.

Genelde küçük çaplı DKG nöronlarında ve diğer duyuşal gangliyonlarda eksprese edilen P2X₃ reseptörlerinin tersine, P2Y reseptörleri küçük, orta ve büyük çaplı duyuşal nöronlarda eşit oranda eksprese edildiği gözükmektedir (254). Flüoresan kalsiyum görüntüleme deneylerinde hem klopidoğrel hem de MRS 2395 küçük, orta ve büyük çaplı DKG nöronlarının birçoğunda artış meydana getirdi. Bu bulgu P2Y₁₂ reseptörlerinin ağrıya spesifik küçük ve orta çaplı nöronlarda ve lokalizasyonla ilgili büyük çaplı nöronlarda mevcut olduğunu göstermektedir. Bu bulgu P2Y₁₂ reseptörleri hem ağrı hem de propriyoseptif sinyallerin düzenlenmesinde görevlerinin olabileceğini göstermektedir.

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 periferik bölgelerde nosiseptif cevabın başlatılmasında anahtar rol oynadığı kabul edilmektedir. Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının aktivasyonu aracılığı ile hücre dışından kalsiyum girişinin akut nosiseptif bilginin spinal düzeyde iletiminde rol aldığı gösterilmiştir. Ayrıca sıçan DKG hücrelerinde depolarize edici ard potansiyellerin AP esnasında Ca^{+2} tetiklemeli Ca^{+2} girişi ile bu nöronlarda aktive olması sonucunda meydana geldiği ve uyarılabilirliği artırdığı gösterilmiştir (131). Bazı DKG hücrelerinde AP esnasında Ca^{+2} girişinin ise Ca^{+2} bağımlı K^{+} kanallarının aktivasyonu ile hiperpolarize edici ard potansiyelleri aktive etmekte dolayısıyla uyarılabilirliği azaltmakta ve nöronal ateşlemeyi baskılamaktadır (131, 255).

4.2. Hot-Plate Testi Bulguları

Hot plate testi akut ağrı yanıtının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir testtir. Tez çalışmasının bu bölümünde klinikte aterotrombotik olayların azaltılması ve semptomatik aterosklerotik hastalık öyküsü olan hastalarda (geçirilmiş strok, geçirilmiş miyokard infarktüsü, periferik arter hastalığı gibi) vasküler iskemik olayların (miyokard infarktüsü, strok, vasküler ölüm) önlenmesinde yaygın kullanıma sahip antitrombotik bir ilaç olan klopidoğrel ile yeni keşfedilen ve klopidoğrel gibi $P2Y_{12}$ reseptörünün selektif antagonisti olup antitrombotik etkilere sahip MRS 2395'in (234) nöropatik ağrı oluşturulmuş farelerde hot plate testi kullanılarak ağrı üzerine etkileri incelendi.

Hot plate testi deneyine ait bulgular klopidoğrel ve MRS 2395'in nöropatik ağrı oluşturulmuş farelerde belirgin bir şekilde analjezik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. MRS 2395 ile ilgili sunulan bir ön çalışmada MRS 2395'in cerrahi olarak siyatik sinir ligasyonu yapılan sıçanlarda mekanik allodiniyi doz bağımlı olarak azalttığını bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada hot plate testi kullanılarak MRS 2395'in siyatik sinir ligasyonu yapılan sıçanlarda doz bağımlı olarak termal hipoaljezi meydana getirdiği tespit edilmiştir (256). Bu ön çalışmaya ait bulgular ile diyabet oluşturduğumuz farelerde gelişen nöropatik ağrı üzerine $P2Y_{12}$ reseptörünün

selektif antagonistleri klopidoğrel ve MRS 2395'in etkileri paraleldir.

Klopidoğrel'in etkileri diyabetik nöropati gelişmiş farelerde 240 dakika boyunca 30 dakika aralıklarla incelendi. 1mg/kg dozdaki klopidoğrel'in hipoaljezik etkisi 30. dakikadan itibaren yükselmeye başladı ve 60. dakikada bu artış pik yaptı. 60. dakikadaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı. 90. dakikadan itibaren azalmaya başladı ve 240 dakikanın sonunda başlangıç değerlerine geri döndü. 10 ve 30 mg/kg dozlardaki klopidoğrel ise 30. dakikadan itibaren istatistiksel olarak anlamlı hipoaljezik etkiler gösterdi ve bu etkileri 60. ve 90. ve 120. dakikaya kadar devam etti. 150. dakikadan itibaren ise etki azalarak deney sonlarında ağrı eşiği değerleri başlangıç seviyelerine geri döndü.

MRS 2395 ise 1mg/kg dozda 30. dakikada istatistiksel olarak hipoaljezik etkilerde anlamlı artış meydana getirdi ve bu etkisi 60. dakikadan itibaren azalmaya başlayarak başlangıç seviyelerine indi. 10 ve 30 mg/kg dozlardaki MRS 2395 ise 30. dakikadan itibaren 120. dakika da dahil olmak üzere ağrı eşiğinde istatistiksel olarak anlamlı artış meydana getirdi. 150. dakika ve sonraki etkilerde anlamlı bir etki yoktu ve 240 dakika sonraki değerler 0. dakikadaki ağrı eşiği değerlerine yakındı.

Hot plate testi ölçümlerinin tümünde MRS 2395, klopidoğrel ile kıyaslandığında tüm dozlardaki hipoaljezik etkilerinin klopidoğrelden daha fazla olduğu görüldü. İlginç bir şekilde flüoresan kalsiyum görüntüleme deneylerinde ise klopidoğrel (10, 100, 300 nM) MRS 2395'e (100 nM, 1 ve 10 μ M) göre daha düşük dozlarda $[Ca^{2+}]_i$ miktarlarında artış meydana getirmiştir. Bunun yanı sıra klopidoğrel MRS 2395'e göre aynı dozlarda $[Ca^{2+}]_i$ miktarında daha fazla artışa sebep olmuştur.

Bu çalışma ile ilk defa P2Y₁₂ reseptör antagonisti olan klopidoğrel ve MRS 2395'in flüoresan kalsiyum görüntüleme yöntemi ile DKG sinir hücre kültürlerinde hücre içi kalsiyum seviyelerinde artış meydana getirdiği ve bu artışın hem hücre dışı kaynaklardan hem de hücre içi depolardan kaynaklandığı tespit edildi. Ayrıca bu iki ajanının diyabetik farelerde belirgin hipoaljezik etkiler meydana getirdiği *hot plate* testi ile gösterildi.

5. KAYNAKLAR

1. Silbernagl S, Despopulos A, Hariri N (Çeviren) s. 55-56, İstanbul, Arkadaş Tıp Kitapları Cep Serisi No:29, 1989.
2. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Doğan A (Çeviren) s. 884-98, 10. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1999.
3. Bezanilla F. The action potential: from voltage-gated conductances to molecular structures. Biol Res 2006; 39: 425-35.
4. Pehlivan F. Biyofizik. 2. Baskı, Ankara: Feryal Matbaası, 2004: 78-79.
5. Schild JH, Kunze DL. Experimental and modeling study of Na⁺ current heterogeneity in rat nodose neurons and its impact on neuronal discharge. J Neurophysiol 1997; 78: 3198-209.
6. Marrion NV, Adams PR. Release of intracellular calcium and modulation of membrane currents by caffeine in bull-frog sympathetic neurones. J Physiol 1992; 445: 515-35.
7. Hille B. Ionic Channels of Excitable Membranes. 2. Baskı, Sinauer, Massachusetts; 1992.
8. Scott RH, Pearson HA, Dolphin AC. Aspects of vertebrate neuronal voltage-activated calcium currents and their regulation. Prog Neurobiol 1991; 36: 485-520.
9. Dixon DM, Valkanov M, Martin RJ. A patch-clamp study of the ionic selectivity of the large conductance, Ca-activated chloride channel in muscle vesicles prepared from *Ascaris suum*. J Membr Biol 1993; 131: 143-9.
10. Ashcroft FM. Ion Channels And Disease. 1. Baskı, San Diego, California: Academic Press, 2000: 66-68.
11. Pietrobon D, Hess P. Novel mechanism of voltage-dependent gating in L-type calcium channels. Nature 1990; 346: 651-5.
12. Eckert R, Chad JE. Inactivation of Ca channels. Prog Biophys Mol Biol 1984; 44: 215-67.
13. Kass RS, Sanguinetti MC. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. J Gen Physiol 1984; 84: 705-26.

14. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 1995; 269: 847-50.
15. Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 2002; 82: 503-68.
16. Jentsch TJ, Gunther W. Chloride channels: an emerging molecular picture. *Bioessays* 1997; 19: 117-26.
17. Jentsch TJ, Gunther W, Pusch M, Schwappach B. Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family. *J Physiol* 1995; 482: 19-25.
18. Rudomin P. Presynaptic inhibition of muscle spindle and tendon organ afferents in the mammalian spinal cord. *Trends Neurosci* 1990; 13: 499-505.
19. Welsh MJ, Ramsey BW. Research on cystic fibrosis: a journey from the Heart House. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 148-54.
20. Decker MW, Meyer MD. Therapeutic potential of neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists as novel analgesics. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 917-23.
21. DeBin JA, Strichartz GR. Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon* 1991; 29: 1403-8.
22. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 473-508.
23. Rudy B. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 1988; 25: 729-49.
24. Bezanilla F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 2000; 80: 555-92.
25. Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, et al. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 868: 233-85.
26. Pongs O, Leicher T, Berger M, Roeper J, Bähring R, Wray D, et al. Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel beta subunits. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 868: 344-55.
27. Bischoff U, Vogel W, Safronov BV. Na⁺-activated K⁺ channels in small dorsal root ganglion neurones of rat. *J Physiol* 1998; 510: 743-54.

28. Ji J, Tsuk S, Salapatek AM, Huang X, Chikvashvili D, Pasyk EA, et al. The 25-kDa synaptosome-associated protein (SNAP-25) binds and inhibits delayed rectifier potassium channels in secretory cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 20195-204.
29. Robertson B, Owen D, Stow J, Butler C, Newland C. Novel effects of dendrotoxin homologues on subtypes of mammalian Kv1 potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 1996; 383: 26-30.
30. Stuhmer W, Ruppersberg JP, Schroter KH, Sakmann B, Stocker M, Giese KP, et al. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J* 1989; 8: 3235-44.
31. Hanson DC, Nguyen A, Mather RJ, Rauer H, Koch K, Burgess LE, et al. UK-78,282, a novel piperidine compound that potently blocks the Kv1.3 voltage-gated potassium channel and inhibits human T cell activation. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 1707-16.
32. Hatano N, Ohya S, Muraki K, Giles W, Imaizumi Y. Dihydropyridine Ca²⁺ channel antagonists and agonists block Kv4.2, Kv4.3 and Kv1.4 K⁺ channels expressed in HEK293 cells. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 533-44.
33. Xu L, Enyeart JA, Enyeart JJ. Neuroprotective agent riluzole dramatically slows inactivation of Kv1.4 potassium channels by a voltage-dependent oxidative mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 227-37.
34. Schonherr R, Gessner G, Lober K, Heinemann SH. Functional distinction of human EAG1 and EAG2 potassium channels. *FEBS Lett* 2002; 514: 204-8.
35. Pardo-Lopez L, Zhang M, Liu J, Jiang M, Possani LD, Tseng GN. Mapping the binding site of a human ether-a-go-go-related gene-specific peptide toxin (ErgTx) to the channel's outer vestibule. *J Biol Chem* 2002; 277: 16403-11.
36. Spector PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC. Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K⁺ channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res* 1996; 78: 499-503.
37. Suessbrich H, Waldegger S, Lang F, Busch AE. Blockade of HERG channels expressed in *Xenopus* oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole. *FEBS Lett* 1996; 385: 77-80.
38. Bond CT, Maylie J, Adelman JP. SK channels in excitability, pacemaking and synaptic integration. *Curr Opin Neurobiol* 2005; 15: 305-11.

39. Fernandez-Fernandez JM, Nobles M, Currid A, Vazquez E, Valverde MA. Maxi K⁺ channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: 1705-14.
40. Luzhkov VB, Aqvist J. Ions and blockers in potassium channels: insights from free energy simulations. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1747: 109-20.
41. Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, Reber BF, Offord J, Charbonneau H, et al. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 1992; 256: 839-42.
42. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; 28: 365-8.
43. Isom LL. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* 2001; 7: 42-54.
44. Cestele S, Catterall WA. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 2000; 82: 883-92.
45. Amadio S, Tramini G, Martorana A, Viscomi MT, Sancesario G, Bernardi G, et al. Oligodendrocytes express P2Y₁₂ metabotropic receptor in adult rat brain. *Neuroscience* 2006; 141: 1171-80.
46. Ambache N. The use and limitations of atropine for pharmacological studies on autonomic effectors. *Pharmacol Rev* 1955; 7: 467-94.
47. Andersson KE, Hedlund P. Pharmacologic perspective on the physiology of the lower urinary tract. *Urology* 2002; 60: 13-20.
48. Antunes VR, Bonagamba LG, Machado BH. Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats. *Brain Res* 2005; 1032: 85-93.
49. Leipold E, Hansel A, Olivera BM, Terlau H, Heinemann SH. Molecular interaction of delta-conotoxins with voltage-gated sodium channels. *FEBS Lett* 2005; 579: 3881-4.
50. Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* 2002; 82: 735-67.
51. Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem* 1997; 272: 20975-8.

52. Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. *Trends Neurosci* 2006; 29: 578-86.
53. Krishtal O. The ASICs: signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci* 2003; 26: 477-83.
54. Akopian AN, Chen CC, Ding Y, Cesare P, Wood JN. A new member of the acid-sensing ion channel family. *Neuroreport* 2000; 11: 2217-22.
55. Evans CJ, Peto GC, al-Lehyani S, Darko JB. The use of associated particle timing based on the D + D reaction for elemental analysis of bulk samples such as the human body. *Appl Radiat Isot* 1997; 48: 257-66.
56. Sutherland SP, Benson CJ, Adelman JP, McCleskey EW. Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 711-6.
57. Diochot S, Salinas M, Baron A, Escoubas P, Lazdunski M. Peptides inhibitors of acid-sensing ion channels. *Toxicon* 2007; 49: 271-84.
58. Miller C. The charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides. *Neuron* 1995; 15: 5-10.
59. Mahaut-Smith MP, Schlichter LC. Ca²⁺(+)-activated K⁺ channels in human B lymphocytes and rat thymocytes. *J Physiol* 1989; 415: 69-83.
60. DeCoursey TE, Cherny VV. Temperature dependence of voltage-gated H⁺ currents in human neutrophils, rat alveolar epithelial cells, and mammalian phagocytes. *J Gen Physiol* 1998; 112: 503-22.
61. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 521-55.
62. Glauner KS, Mannuzzu LM, Gandhi CS, Isacoff EY. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature* 1999; 402: 813-7.
63. Lacinova L, Klugbauer N, Hofmann F. Low voltage activated calcium channels: from genes to function. *Gen Physiol Biophys* 2000; 19: 121-36.
64. Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999; 139: 33-87.

65. Ellis SB, Williams ME, Ways NR, Brenner R, Sharp AH, Leung AT, et al. Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 1988; 241: 1661-4.
66. Hobom M, Dai S, Marais E, Lacinova L, Hofmann F, Klugbauer N. Neuronal distribution and functional characterization of the calcium channel alpha2delta-2 subunit. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 1217-26.
67. Bosse E, Regulla S, Biel M, Ruth P, Meyer HE, Flockerzi V, et al. The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett* 1990; 267 : 153-6.
68. Chu PJ, Robertson HM, Best PM. Calcium channel gamma subunits provide insights into the evolution of this gene family. *Gene* 2001; 280: 37-48.
69. Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17: 399-418.
70. Hagiwara S. Ca-dependent action potential. *Membranes* 1975; 3: 359-81.
71. Curtis BM, Catterall WA. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 1984; 23: 2113-8.
72. Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, et al. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 1987; 328: 313-8.
73. Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, et al. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 1989; 340: 230-3.
74. Biel M, Ruth P, Bosse E, Hullin R, Stuhmer W, Flockerzi V, et al. Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett* 1990; 269: 409-12.
75. Seino S, Chen L, Seino M, Blondel O, Takeda J, Johnson JH, et al. Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 584-8.
76. Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, et al. Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23

- cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 1998; 19: 264-7.
77. Starr TV, Prystay W, Snutch TP. Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 5621-5.
 78. Dubel SJ, Starr TV, Hell J, Ahljianian MK, Enyeart JJ, Catterall WA, et al. Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 5058-62.
 79. Niidome T, Kim MS, Friedrich T, Mori Y. Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain. *FEBS Lett* 1992; 308: 7-13.
 80. Perez-Reyes E. Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 1998; 30: 313-8.
 81. Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, et al. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* 1998; 83: 103-9.
 82. Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, et al. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 1999; 19: 1912-21.
 83. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 2000; 25: 533-5.
 84. Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol* 1987; 394: 149-72.
 85. Lacinova L. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 2005; 24: 1-78.
 86. Kuniyasu A, Itagaki K, Shibano T, Iino M, Kraft G, Schwartz A, et al. Photochemical identification of transmembrane segment IVS6 as the binding region of semotiadil, a new modulator for the L-type voltage-dependent Ca²⁺ channel. *J Biol Chem* 1998; 273: 4635-41.
 87. Suh-Kim H, Wei X, Klos A, Pan S, Ruth P, Flockerzi V, et al. Reconstitution of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. Functional interaction among alpha 1, beta, gamma and alpha 2 delta subunits. *Receptors Channels* 1996; 4: 217-25.

88. Hescheler J, Pelzer D, Trube G, Trautwein W. Does the organic calcium channel blocker D600 act from inside or outside on the cardiac cell membrane? *Pflügers Arch* 1982; 393: 287-91.
89. Glossmann H. New therapeutic uses of calcium channel blockers. Introduction. *J Neural Transm Suppl* 1990; 31: 1-3.
90. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985; 316: 440-3.
91. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 411-25.
92. Kim D, Song I, Keum S, Lee T, Jeong MJ, Kim SS, et al. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking $\alpha 1G$ T-type Ca^{2+} channels. *Neuron* 2001; 31: 35-45.
93. Dogrul A, Gardell LR, Ossipov MH, Tulunay FC, Lai J, Porreca F. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 2003; 105: 159-68.
94. Ono K, Iijima T. Pathophysiological significance of T-type Ca^{2+} channels: properties and functional roles of T-type Ca^{2+} channels in cardiac pacemaking. *J Pharmacol Sci* 2005; 99: 197-204.
95. Hayashi K, Wakino S, Homma K, Sugano N, Saruta T. Pathophysiological significance of T-type Ca^{2+} channels: role of T-type Ca^{2+} channels in renal microcirculation. *J Pharmacol Sci* 2005; 99: 221-7.
96. Schrier AD, Wang H, Talley EM, Perez-Reyes E, Barrett PQ. $\alpha 1H$ T-type Ca^{2+} channel is the predominant subtype expressed in bovine and rat zona glomerulosa. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: 265-72.
97. Bhattacharjee A, Whitehurst RM, Jr., Zhang M, Wang L, Li M. T-type calcium channels facilitate insulin secretion by enhancing general excitability in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *Endocrinology* 1997; 138: 3735-40.
98. Heady TN, Gomora JC, Macdonald TL, Perez-Reyes E. Molecular pharmacology of T-type Ca^{2+} channels. *Jpn J Pharmacol* 2001; 85: 339-50.

99. Van der Vring JA, Cleophas TJ, Van der Wall EE, Niemeyer MG. T-channel-selective calcium channel blockade: a promising therapeutic possibility, only preliminarily tested so far: a review of published data. T-Channel Calcium Channel Blocker Study Group. *Am J Ther* 1999; 6: 229-33.
100. Fang X, McMullan S, Lawson SN, Djouhri L. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo. *J Physiol* 2005; 565: 927-43.
101. Fang X, Djouhri L, Black JA, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Lawson SN. The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 7425-33.
102. Gold MS, Shuster MJ, Levine JD. Characterization of six voltage-gated K⁺ currents in adult rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 1996; 75: 2629-46.
103. Rola R, Szulczyk PJ, Witkowski G. Voltage-dependent Ca²⁺ currents in rat cardiac dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 2003; 961: 171-8.
104. Caffrey JM, Eng DL, Black JA, Waxman SG, Kocsis JD. Three types of sodium channels in adult rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1992; 592: 283-97.
105. Wu ZZ, Pan HL. Tetrodotoxin-sensitive and -resistant Na⁺ channel currents in subsets of small sensory neurons of rats. *Brain Res* 2004; 1029: 251-8.
106. Rasband MN, Park EW, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Trimmer JS. Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13373-8.
107. Yusaf SP, Goodman J, Pinnock RD, Dixon AK, Lee K. Expression of voltage-gated calcium channel subunits in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 2001; 311: 137-41.
108. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. *Pain Suppl* 1986; 3: 1-226.
109. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; 413: 203-10.

110. Sen S, Martin DP, Bacon DR. Exploring origins: was John Bonica's model of modern-day pain management influenced by John Lundy's earlier work? *Reg Anesth Pain Med* 2007; 32: 258-62.
111. Turk DC, Okifuji A. Bonica's Management of Pain. Loeser JD (editor). Pain terms and taxonomies of pain. Philadelphia: Lippincott Williams, 1992: 342-48.
112. Tominaga M. Molecular mechanisms of trigeminal nociception and sensation of pungency. *Chem Senses* 2005; 30: 191-2.
113. Orstavik K, Weidner C, Schmidt R, Schmelz M, Hilliges M, Jorum E, et al. Pathological C-fibres in patients with a chronic painful condition. *Brain* 2003; 126: 567-78.
114. Gohar O. Contribution of ion channels in pain sensation. *Modulator* 2005; 19: 9-13.
115. Yücel A. Akut ağrı nörofizyolojisi. Hasta kontrollü analjezi (PCA) İstanbul: MER Matbaacılık& Yayıncılık; 1997: 5-19.
116. Ertekin C. Ağrının nöroanatomi ve nörofizyolojisi. Yegül I (editor). Ağrı ve tedavisi. İzmir: Yapım Matbaacılık, 1993: 1-18.
117. Morgan GE, Mikhail MG. Pain Management. *Clinical Anesthesiology*. 2. Baskı, New Jersey: Prentice-Hall International, 1996: 274-316.
118. Kayhan Z. Klinik Anestezi. 2. Baskı, İstanbul: Logos Yayıncılık, 1997: 86-89.
119. Baron R. Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. *Clin J Pain* 2000; 16: 12-20.
120. Nicholson B. Gabapentin use in neuropathic pain syndromes. *Acta Neurol Scand* 2000; 101: 359-71.
121. Serpell MG. Gabapentin in neuropathic pain syndromes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Pain* 2002; 99: 557-66.
122. Gottrup H, Kristensen AD, Bach FW, Jensen TS. Aftersensations in experimental and clinical hypersensitivity. *Pain* 2003; 103: 57-64.
123. Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 23-37.

124. Devor M, Janig W, Michaelis M. Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats. *J Neurophysiol* 1994; 71: 38-47.
125. Özcan M. Levetirasetamın Ağrı Üzerine Etkilerinin İn Vitro Elektrofizyolojik (Patch Kenetleme) Ve İn Vivo (Hot Plate Testi) Yöntemlerle İncelenmesi. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi; Biyofizik Bölümü, 2006.
126. Pleuvry BJ, Lauret GR. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. *Pharmacol Ther* 1996; 71: 313-24.
127. Malcangio M, Bowery NG. GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17: 457-62.
128. Park SY, Choi JY, Kim RU, Lee YS, Cho HJ, Kim DS. Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression by axotomy and neurotrophins in rat dorsal root ganglia. *Mol Cells* 2003; 16: 256-9.
129. Miyoshi HR. Bonica's management of pain. JD L (editor). Systemic nonopioid analgesics. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 1668-81.
130. Lee DS, Goodman S, Dean DM, Lenis J, Ma P, Gervais PB, et al. Randomized comparison of T-type versus L-type calcium-channel blockade on exercise duration in stable angina: results of the Posicor Reduction of Ischemia During Exercise (PRIDE) trial. *Am Heart J* 2002; 144: 60-7.
131. Ayar A, Scott RH. The actions of ryanodine on Ca²⁺-activated conductances in rat cultured DRG neurones; evidence for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 359: 81-91.
132. Burgess GM, Mullaney I, McNeill M, Dunn PM, Rang HP. Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. *J Neurosci* 1989; 9: 3314-25.
133. Reaven GM, Thompson LW, Nahum D, Haskins E. Relationship between hyperglycemia and cognitive function in older NIDDM patients. *Diabetes Care* 1990; 13: 16-21.
134. Wood JN, Bevan SJ, Coote PR, Dunn PM, Harmar A, Hogan P, et al. Novel cell lines display properties of nociceptive sensory neurons. *Proc Biol Sci* 1990; 241: 187-94.

135. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H (editor). 10. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 884-98.
136. Barrett AM, Lucero MA, Le T, Robinson RL, Dworkin RH, Chappell AS. Epidemiology, public health burden, and treatment of diabetic peripheral neuropathic pain: a review. *Pain Med* 2007; 8: 50-62.
137. Ertekin C. Diyabetik Nöropatiler, Santral ve Periferik EMG Anatomi-Fizyoloji-Klinik. Türkiye; 2006: 124-30.
138. Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1994; 37: 643-50.
139. Stewart R, Liolitsa D. Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. *Diabet Med* 1999; 16: 93-112.
140. Schmader KE. Epidemiology and impact on quality of life of postherpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy. *Clin J Pain* 2002; 18: 350-4.
141. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* 2005; 22: 359-70.
142. Breyer MD, Bottinger E, Brosius FC, 3rd, Coffman TM, Harris RC, Heilig CW, et al. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 27-45.
143. Scribner KA, Akana SF, Walker CD, Dallman MF. Streptozotocin-diabetic rats exhibit facilitated adrenocorticotropin responses to acute stress, but normal sensitivity to feedback by corticosteroids. *Endocrinology* 1993; 133: 2667-74.
144. Sima AA, Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia* 1999; 42: 773-88.
145. MacRury SM, Gordon D, Wilson R, Bradley H, Gemmell CG, Paterson JR, et al. A comparison of different methods of assessing free radical activity in type 2 diabetes and peripheral vascular disease. *Diabet Med* 1993; 10: 331-5.
146. Rauen U, Petrat F, Li T, De Groot H. Hypothermia injury/cold-induced apoptosis-evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂-/H₂O₂ formation. *FASEB J* 2000; 14: 1953-64.
147. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry. 3. Baskı, New York: Worth Publishers Inc 2000: 187-92.

148. Pamela CC, Richard AH. Lippincott's Illustrated Review Serisinden Biyokimya. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti; 1997: 88-95.
149. Inomata H, Ji JJ, Mimata T, Yamagata H. Concentration-related effects of extracellular application of ATP on the action potential and membrane currents of the guinea-pig vas deferens. *Eur J Pharmacol* 1991; 202: 245-52.
150. Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 1992; 359: 144-7.
151. Stone TW. Physiological roles for adenosine and adenosine 5'-triphosphate in the nervous system. *Neuroscience* 1981; 6: 523-55.
152. Drury AN, Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 1929; 68: 213-37.
153. Gillespie JH. The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol* 1934; 80: 345-59.
154. Buchthal F, Folkow B. Interaction between acetylcholine and adenosine triphosphate in normal, curarised and denervated muscle. *Acta Physiol Scand* 1948; 15: 150-60.
155. Buchthal F, Engbaek L. On the neuromuscular transmission in normal and myasthenic subjects. *Acta Psychiatr Neurol* 1948; 23: 3-11.
156. Emmelin N, Feldberg W. Systemic effects of adenosine triphosphate. *Br J Pharmacol Chemother* 1948; 3: 273-84.
157. Feldberg W, Sherwood SL. Behaviour of cats after intraventricular injections of eserine and DFP. *J Physiol* 1954; 125: 488-500.
158. Shneour EA, Hansen IM. Inhibition by nucleotides of mouse brain UDPgalactose 4-epimerase in vitro. *J Neurochem* 1971; 18: 1345-9.
159. Kuperman AS, Okamoto M, Beyer AM, Volpert WA. Procaine Action: Antagonism by Adenosine Triphosphate and Other Nucleotides. *Science* 1964; 144: 1222-3.
160. Holton P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 1959; 145: 494-504.
161. Dubyak GR, el-Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 1993; 265: 577-606.

162. Burnstock G. Introduction: ATP and its metabolites as potent extracellular agonists. Schwiebert EM (editor). *Current Topics in Membranes. Purinergic Receptors and Signalling*; 2003: 1-27.
163. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972; 24: 509-81.
164. Burnstock G. Purinergic receptors. *J Theor Biol* 1976; 62: 491-503.
165. Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 1985; 16: 433-40.
166. Londos C, Cooper DM, Wolff J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 2551-4.
167. Gordon JL. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 1986; 233: 309-19.
168. O'Connor SE, Dainty IA, Leff P. Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 137-41.
169. Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 1994; 64: 445-75.
170. Dubyak GR. Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 4: 295-300.
171. Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 1994; 371: 519-23.
172. Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch* 2006; 452: 552-62.
173. Delicado EG, Miras-Portugal MT, Carrasquero LM, Leon D, Perez-Sen R, Gualix J. Dinucleoside polyphosphates and their interaction with other nucleotide signaling pathways. *Pflugers Arch* 2006; 452: 563-72.
174. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 527-52.
175. Olah ME, Stiles GL. The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacol Ther* 2000; 85: 55-75.

176. Friel DD, Bean BP. Two ATP-activated conductances in bullfrog atrial cells. *J Gen Physiol* 1988; 91: 1-27.
177. Buell GN, Talabot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, Morris MA, et al. Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors Channels* 1998; 5: 347-54.
178. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002; 82: 1013-67.
179. Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, et al. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 1994; 371: 516-9.
180. Egan TM, Haines WR, Voigt MM. A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X2 receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. *J Neurosci* 1998; 18: 2350-9.
181. Ennion S, Hagan S, Evans RJ. The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors. *J Biol Chem* 2000; 275: 29361-7.
182. Nakazawa K, Inoue K, Ito K, Koizumi S. Inhibition by suramin and reactive blue 2 of GABA and glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995; 351: 202-8.
183. Nakazawa K, Liu M, Inoue K, Ohno Y. Potent inhibition by trivalent cations of ATP-gated channels. *Eur J Pharmacol* 1997; 325: 237-43.
184. Wildman SS, King BF, Burnstock G. Modulation of ATP-responses at recombinant rP2X4 receptors by extracellular pH and zinc. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 762-8.
185. Khakh BS, North RA. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 2006; 442: 527-32.
186. Virginio C, Robertson G, Surprenant A, North RA. Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors. *Mol Pharmacol* 1998; 53: 969-73.
187. Jacobson KA, Kim YC, Wildman SS, Mohanram A, Harden TK, Boyer JL, et al. A pyridoxine cyclic phosphate and its 6-azoaryl derivative selectively potentiate and antagonize activation of P2X1 receptors. *J Med Chem* 1998; 41: 2201-6.
188. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 413-92.

189. Jacobson KA, Jarvis MF, Williams M. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J Med Chem* 2002; 45: 4057-93.
190. Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, et al. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 52-5.
191. Erb L, Garrad R, Wang Y, Quinn T, Turner JT, Weisman GA. Site-directed mutagenesis of P2U purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J Biol Chem* 1995; 270: 4185-8.
192. White PJ, Webb TE, Boarder MR. Characterization of a Ca²⁺ response to both UTP and ATP at human P2Y₁₁ receptors: evidence for agonist-specific signaling. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1356-63.
193. Goossens A, Hakkinen ST, Laakso I, Oksman-Caldentey KM, Inze D. Secretion of secondary metabolites by ATP-binding cassette transporters in plant cell suspension cultures. *Plant Physiol* 2003; 131: 1161-4.
194. Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M, et al. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem* 2001; 276: 41479-85.
195. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 281-341.
196. Savi P, Herbert JM. Clopidogrel and ticlopidine: P2Y₁₂ adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31: 174-83.
197. Savi P, Labouret C, Delesque N, Guette F, Lupker J, Herbert JM. P2y(12), a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 379-83.
198. Ingall AH, Dixon J, Bailey A, Coombs ME, Cox D, McNally JI, et al. Antagonists of the platelet P2T receptor: a novel approach to antithrombotic therapy. *J Med Chem* 1999; 42: 213-20.

199. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409: 202-7.
200. Bianco F, Fumagalli M, Pravettoni E, D'Ambrosi N, Volonte C, Matteoli M, et al. Pathophysiological roles of extracellular nucleotides in glial cells: differential expression of purinergic receptors in resting and activated microglia. *Brain Res Brain Res Rev* 2005; 48: 144-56.
201. Simon J, Vigne P, Eklund KM, Michel AD, Carruthers AM, Humphrey PP, et al. Activity of adenosine diphosphates and triphosphates on a P2Y(T) -type receptor in brain capillary endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 173-82.
202. Wihlborg AK, Wang L, Braun OO, Eyjolfsson A, Gustafsson R, Gudbjartsson T, et al. ADP receptor P2Y₁₂ is expressed in vascular smooth muscle cells and stimulates contraction in human blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1810-5.
203. Ennion SJ, Powell AD, Seward EP. Identification of the P2Y₁₂ receptor in nucleotide inhibition of exocytosis from bovine chromaffin cells. *Mol Pharmacol* 2004; 66: 601-11.
204. Andre P, Delaney SM, LaRocca T, Vincent D, DeGuzman F, Jurek M, et al. P2Y₁₂ regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest* 2003; 112: 398-406.
205. Cattaneo M. The P2 receptors and congenital platelet function defects. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31: 168-73.
206. Vasiljev KS, Uri A, Laitinen JT. 2-Alkylthio-substituted platelet P2Y₁₂ receptor antagonists reveal pharmacological identity between the rat brain Gi-linked ADP receptors and P2Y₁₂. *Neuropharmacology* 2003; 45: 145-54.
207. Sugidachi A, Asai F, Ogawa T, Inoue T, Koike H. The in vivo pharmacological profile of CS-747, a novel antiplatelet agent with platelet ADP receptor antagonist properties. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 1439-46.
208. Burnstock G. Purinergic P2 receptors as targets for novel analgesics. *Pharmacol Ther* 2006; 110: 433-54.
209. Burnstock G. A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain. *Lancet* 1996; 347: 1604-5.

210. Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 1995; 377: 428-31.
211. Ueno S, Tsuda M, Iwanaga T, Inoue K. Cell type-specific ATP-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 429-36.
212. Tsuda M, Koizumi S, Inoue K. Role of endogenous ATP at the incision area in a rat model of postoperative pain. *Neuroreport* 2001; 12: 1701-4.
213. North RA. P2X3 receptors and peripheral pain mechanisms. *J Physiol* 2004; 554: 301-8.
214. Gerevich Z, Illes P. P2Y receptors and pain transmission. *Purinergic Signal* 2004; 1: 3-10.
215. Chizh BA, Illes P. P2X receptors and nociception. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 553-68.
216. Jarvis MF, Burgard EC, McGaraughty S, Honore P, Lynch K, Brennan TJ, et al. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 17179-84.
217. Hamilton SG, Wade A, McMahon SB. The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behaviour induced by ATP analogues in the rat. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 326-32.
218. Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci* 2005; 28: 101-7.
219. Inoue K. The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacol Ther* 2006; 109: 210-26.
220. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, et al. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 2007; 446: 1091-5.
221. Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 2003; 424: 778-83.
222. Tokimasa T, Akasu T. ATP regulates muscarine-sensitive potassium current in dissociated bull-frog primary afferent neurones. *J Physiol* 1990; 426: 241-64.

223. Selyanko AA, Delmas P, Hadley JK, Tatulian L, Wood IC, Mistry M, et al. Dominant-negative subunits reveal potassium channel families that contribute to M-like potassium currents. *J Neurosci* 2002; 22: 212.
224. Rivera-Arconada I, Martinez-Gomez J, Lopez-Garcia JA. M-current modulators alter rat spinal nociceptive transmission: an electrophysiological study in vitro. *Neuropharmacology* 2004; 46: 598-606.
225. Moriyama T, Iida T, Kobayashi K, Higashi T, Fukuoka T, Tsumura H, et al. Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J Neurosci* 2003; 23: 6058-62.
226. Keast JR, Stephensen TM. Glutamate and aspartate immunoreactivity in dorsal root ganglion cells supplying visceral and somatic targets and evidence for peripheral axonal transport. *J Comp Neurol* 2000; 424: 577-87.
227. Sotgiu ML, Biella G, Firmi L, Pasqualucci V. Topical axonal transport blocker vincristine prevents nerve injury-induced spinal neuron sensitization in rats. *J Neurotrauma* 1998; 15: 1077-82.
228. Norenberg W, Illes P. Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362: 324-39.
229. Donnelly-Roberts D, McGaraughty S, Shieh CC, Honore P, Jarvis MF. Painful purinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324: 409-15.
230. Schror K. Antiplatelet drugs. A comparative review. *Drugs* 1995; 50: 7-28.
231. Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, et al. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 1288-95.
232. Herbert JM, Tissinier A, Defreyn G, Maffrand JP. Inhibitory effect of clopidogrel on platelet adhesion and intimal proliferation after arterial injury in rabbits. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1171-9.
233. Bennett CL, Connors JM, Carwile JM, Moake JL, Bell WR, Tarantolo SR, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *N Engl J Med* 2000; 342: 1773-7.

234. Xu B, Stephens A, Kirschenheuter G, Greslin AF, Cheng X, Sennelo J, et al. Acyclic analogues of adenosine bisphosphates as P2Y receptor antagonists: phosphate substitution leads to multiple pathways of inhibition of platelet aggregation. *J Med Chem* 2002; 45: 5694-709.
235. Forda S, Kelly JS. The possible modulation of the development of rat dorsal root ganglion cells by the presence of 5-HT-containing neurones of the brainstem in dissociated cell culture. *Brain Res* 1985; 354: 55-65.
236. Levi-Montalcini R, Dal Toso R, della Valle F, Skaper SD, Leon A. Update of the NGF saga. *J Neurol Sci* 1995; 130: 119-27.
237. Ozcan M, Ayar A, Canpolat S, Kutlu S. Antinociceptive efficacy of levetiracetam in a mice model for painful diabetic neuropathy. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008; 52: 926-30.
238. Wang Z, Dohle C, Friemann J, Green BS, Gleichmann H. Prevention of high- and low-dose STZ-induced diabetes with D-glucose and 5-thio-D-glucose. *Diabetes* 1993; 42: 420-8.
239. Burnstock G, Williams M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 862-9.
240. Burnstock G. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 182-8.
241. Cook SP, Vulchanova L, Hargreaves KM, Elde R, McCleskey EW. Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature* 1997; 387: 505-8.
242. McDermott RH, Butler M. Uptake of glutamate, not glutamine synthetase, regulates adaptation of mammalian cells to glutamine-free medium. *J Cell Sci* 1993; 104: 51-8.
243. Bardoni R, Goldstein PA, Lee CJ, Gu JG, MacDermott AB. ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci* 1997; 17: 5297-304.
244. Dowd E, McQueen DS, Chessell IP, Humphrey PP. P2X receptor-mediated excitation of nociceptive afferents in the normal and arthritic rat knee joint. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 341-6.

245. Sawynok J, Reid A. Peripheral adenosine 5'-triphosphate enhances nociception in the formalin test via activation of a purinergic p2X receptor. *Eur J Pharmacol* 1997; 330: 115-21.
246. Driessen B, Reimann W, Selve N, Friderichs E, Bultmann R. Antinociceptive effect of intrathecally administered P2-purinoceptor antagonists in rats. *Brain Res* 1994; 666: 182-8.
247. Fukuhara N, Imai Y, Sakakibara A, Morita K, Kitayama S, Tanne K, et al. Regulation of the development of allodynia by intrathecally administered P2 purinoceptor agonists and antagonists in mice. *Neurosci Lett* 2000; 292: 25-8.
248. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007; 87: 659-797.
249. Gerevich Z, Muller C, Illes P. Metabotropic P2Y1 receptors inhibit P2X3 receptor-channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur J Pharmacol* 2005; 521: 34-8.
250. Okada M, Nakagawa T, Minami M, Satoh M. Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303: 66-73.
251. Evans AR, Nicol GD, Vasko MR. Differential regulation of evoked peptide release by voltage-sensitive calcium channels in rat sensory neurons. *Brain Res* 1996; 712: 265-73.
252. Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 1993; 262: 740-4.
253. Bao L, Jin SX, Zhang C, Wang LH, Xu ZZ, Zhang FX, et al. Activation of delta opioid receptors induces receptor insertion and neuropeptide secretion. *Neuron* 2003; 37: 121-33.
254. Ruan HZ, Burnstock G. Localisation of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. *Histochem Cell Biol* 2003; 120: 415-26.
255. Ayar A, Storer C, Tatham EL, Scott RH. Ryanodine, caffeine and intracellular photorelease of DM-nitrophen and diazo-2 modulates excitability of rat cultured sensory neurones. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 315.

256. M      B, Ando RD, Sperl  gh B. Effects of P2 receptor ligands in animal models of neuropathic, thermal and inflammatory pain. 12th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, Budapest, Hungary, January 22-24, 2009.

6. ÖZGEÇMİŞ

01.04.1980 tarihinde Adana’da doğdum. İlkokulu Elazığ’da, orta ve lise eğitimimi Adana’da tamamladım. 2005 yılında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldum. 2005 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalında uzmanlık eğitimime başladım ve halen eğitime devam etmekteyim. Evli ve bir çocuk babasıyım.