



**p-KUMARİK ASİT'in OLASI ANALJEZİK ETKİLERİNİN *İN VİTRO* PATCH  
CLAMP YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Şenay CAKOVA**

**Eskişehir 2024**

**p-KUMARİK ASİT'in OLASI ANALJEZİK ETKİLERİNİN *İN VİTRO* PATCH  
CLAMP YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Şenay CAKOVA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Farmakoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Feyza ALYU ALTINOK**

**Eskişehir**

**Anadolu Üniversitesi**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Ekim 2024**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Şenay CAKOVA'nun "p-Kumarik Asid'in Olası Analjezik Etkilerinin *in vitro* Patch Clamp Yöntemi ile Değerlendirilmesi" başlıklı tezi .../.../2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakoloji Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Dr. Öğr. Üyesi. Feyza ALYU ALTINOK	.....
Üye	: -	.....
Üye	: -	.....

Prof. Dr. Saime ÖNCE  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

### p-KUMARİK ASİT'in OLASI ANALJEZİK ETKİLERİNİN *İN VİTRO* PATCH CLAMP YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Şenay CAKOVA

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ekim, 2024

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Feyza ALYU ALTINOK

Ağrı hayatta sık yaşanıp farklı nedenlerden ortaya çıkan ve hayat kalitesini düşüren bir semptom türüdür. Çeşitli tedavi yöntemleri mevcuttur fakat doğal kaynaklı ve yan etkileri daha az olan yeni farmakoterapi yöntemleri bulmak için araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bu tezde de p-kumarik asidin bilinen antienflamatuvar, antioksidan gibi etkilerinin oluşturduğu etki profiline, olası analjezik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmanın rapor edilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda primer dorsal kök ganglion hücreleri üzerinde yama kenetleme yönteminin tüm hücre konfigürasyonu ile deneyler gerçekleştirilerek p-kumarik asidin  $K^+$  akımları üzerindeki olası etkileri değerlendirilmiştir. Nöronların uyarıldığı depolarize voltaj aralığında ve gecikmeli doğrultucu  $K^+$  akımında 100  $\mu$ M p-kumarik asit uygulaması sonucu inhibisyon gözlenmiştir. Bu bulgular, nöronun uyarılabilirliği üzerinde düzenleyici etkilere işaret etmektedir. Ağrı iletiminde temel taşlardan biri olan DRG'ler üzerinde gözlenen bu durum, olası analjezik etkiyi ön plana çıkartmaktadır. Bu çalışmanın sonucu, p-kumarik asit ve türevlerinin ağrı çalışmalarında değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Ağrı, Dorsal kök ganglionları, Yama kenetleme tekniği, p-kumarik asit.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE POSSIBLE ANALGESIC EFFECTS OF P-KUMARIC ACID USING THE *IN VITRO* PATCH CLAMP METHOD

Şenay ÇAKOVA

Department of Pharmacology

Anadolu University, Graduate School, October, 2024

Supervisor: Asst. Prof. Feyza ALYU ALTINOK

Pain is a type of symptom that is experienced frequently in life, occurs for different reasons and reduces the quality of life. Various treatment methods are available, but research continues intensively to find new pharmacotherapy methods that are natural in origin and have fewer side effects. In this thesis, it is aimed to report a study evaluating the effect profile of p-coumaric acid's known anti-inflammatory and antioxidant effects and its possible analgesic effects. In this direction, experiments were carried out with the whole cell configuration of the patch clamp method on primary dorsal root ganglion cells and the possible effects of p-coumaric acid on K<sup>+</sup> currents were evaluated. Inhibition with 100 µM p-coumaric acid was observed in the depolarizing voltage range at which neurons were stimulated and in the delayed rectifier K<sup>+</sup> current. These findings indicate regulatory effects on neuron excitability. This situation, observed on DRGs, one of the cornerstones of pain transmission, highlights the possible analgesic effect. The result of this study reveals the need to evaluate p-coumaric acid and its derivatives in pain studies.

**Keywords:** Pain, Dorsal Root Ganglion, Patch Clamp technique, p-Coumaric acid.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tezimin hazırlanmasında öneri ve yapıcı eleştirileri ile beni destekleyen, her zaman yanımda olan, desteğini hep hissettiğim, iyiki beraber çalışıyoruz dediğim, araştırmamın tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Feyza ALYU ALTINOK'a, Bölümümüz Öğretim Üyelerine, Değerli Hocalarıma, özellikle çalışma arkadaşlarım Abderaouf BOUBEKKA'ya, emeği geçmiş tüm teknik ve idari personele katkılarından dolayı teşekkür ederim. Aynı zamanda yüksek lisans çalışmalarımı sürdürebilmemde beni destekleyen, her koşulda yanımda olan eşime, aileme, özellikle de tezin son döneminde her anın heyecanını paylaştığım kardeşime teşekkürü borç bilirim.

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait özgün bir çalışma olduğunu çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Şenay CAKOVA

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI .....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. LİTERATÜR.....	2
2.1. Ağrı .....	2
2.2. Hiperaleji ve Allodini .....	3
2.3. Ağrının iletilmesinde sinapsların rolü .....	4
2.3.1. Dorsal kök ganglionları .....	4
2.4. Yama Kenetleme Tekniği ve Güncel Yaklaşımlar .....	8
2.4.1. Yama kenetleme uygulamaları .....	13
2.5. P-Kumarik Asid.....	15
3. METODOLOJİ.....	18
3.1. Deney Hayvanları.....	18
3.2. Çözeltilerin Hazırlanması.....	19
3.3. Kullanılan Cihazların Listesi .....	19
3.4. Primer DRG Hücre Kültürü .....	20
3.5. Yama Klemp Kayıtları.....	25

3.6. İstatistiksel Analiz .....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Kontrol ve Test Kayıtlarının Örnekleri .....	29
4.2. p-Kumarik Asit Uygulaması Sonrası Akım-Voltaj Grafiği.....	32
6. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	35
KAYNAKÇA.....	41
EKLER .....	46
ÖZGEÇMİŞ .....	47



## TABLÖLAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Tablo 2.1.</b> Ağrının sınıflandırılması.....	2
<b>Tablo 3.1.</b> Cihazların listesi .....	19



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 2.1. Hiperaleji ve alodini tanımlanması.....	3
Şekil 2.2. Omurilik ve sinir köklerinin anatomik yapısı .....	6
Şekil 2.3. Omurga, sinir kökleri ve omurilik arasındaki bağlantı (önden görünüm).	6
Şekil 2.4. Sinir kökleri ve omurilik ile omurlar arasındaki ilişki (enine kesit) .....	7
Şekil 2.5. Anadolu Üniversitesi bünyesinde kurulan patch clamp laboratuvarı.....	10
Şekil 2.6. Kayıt alınacak hücrede giga seal oluşturulması. ....	11
Şekil 2.7. Yama kenetleme seti .....	11
Şekil 2.8. Faraday kafesi.....	12
Şekil 2.9. Pipet yapıcı mikropipet çekici (mikropipet puller) .....	12
Şekil 2.10. Yama kenetleme uygulamaları .....	15
Şekil 2.11. p-Kumarik asid'in kimyasal formülü. ....	15
Şekil 2.12. p -CouA asidinin farmakolojik aktiviteleri .....	16
Şekil 3.1. Deneyleerde kullanılan erkek Sprague Dawley rat örneği.....	18
Şekil 3.2. Omurganın DRG'leri açığa çıkarmak amacıyla kesilmesi.....	21
Şekil 3.3. Omurilik dokusunun uzaklaştırılması .....	22
Şekil 3.4. Omurgadan çıkarılan DRGlerin uzantılarının kesilmesi .....	23
Şekil 3.5. Sentrifüj cihazında ependorf içerisinde DRG .....	24
Şekil 3.6. DRG hücrelerinin sonuçtaki süspansiyonunun mikroskop resmi .....	25
Şekil 3.7. Yama kenetleme kaydı sırasında hücrenin mikroskop altında görünümü	26
Şekil 3.8. Yama kenetleme düzeneği.....	27
Şekil 4.1. Primer DRG nöronlarında K <sup>+</sup> akımı ölçümleri ilişkili 100 µM p-kumarik asit uygulaması yapılan hücrelerden uygulama öncesi alınan kontrol kayıtlarından elde edilen örnek sonuç .....	29
Şekil 4.2. Primer DRG nöronlarında K <sup>+</sup> akımı ölçümleri ilişkili 100 µM p-kumarik asit uygulamasının etkilerini gösteren kayıtlarından elde edilen örnek sonuç .....	30

<b>Şekil 4.3.</b> Primer DRG nöronlarında K <sup>+</sup> akımı ölçümleri ilişkili 10 µM p-kumarik asit uygulaması yapılan hücrelerden uygulama öncesi alınan kontrol kayıtlarından elde edilen örnek sonuç. ....	31
<b>Şekil 4.4.</b> Primer DRG nöronlarında K <sup>+</sup> akımı ölçümleri ilişkili 10 µM p-kumarik asit uygulamasının etkilerini gösteren kayıtlarından elde edilen örnek sonuçlar.....	32
<b>Şekil 4.5.</b> K <sup>+</sup> akımı üzerine 100 µM p-kumarik asidin etkilerinin akım voltaj eğrisi üzerinde gösterilmesi. p-kumarik asit uygulaması öncesi (kontrol) ve sonrası (p-kumarik asit). ....	33
<b>Şekil 4.6.</b> K <sup>+</sup> akımı üzerine 10 µM p-kumarik asidin etkilerinin akım voltaj eğrisi üzerinde gösterilmesi. p-kumarik asit uygulaması öncesi (kontrol) ve sonrası (p-kumarik asit). ....	34

## KISALTMALAR DİZİNİ

AP	: Aksiyon Potansiyeli
APC	: Automatic PatchCl
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DRG	: Dorsal Root Ganglia (Arka kök ganglion)
FBS	: Fetal Bovin Serum
GLUT	: Glikoz taşıyıcı protein
IASP	: International Association for the Study of Pain
nA	: Nano amper
pA	: Piko Amper
PBS	: Phosphate Buffered Saline
pF	: Piko Farad
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
SSS	: Santral Sinir Sistem
WDR	: Wide Dynamic Range
$\mu$ F	: Mikro Farad
$\mu$ M	: Mikromol

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pek çok araştırma grubu, tedavisi zor hastalıklara çözüm olabilecek ilaçları üretirken, insana, çevreye ve diğer tüm canlılara zarar ve yan etkileri düşük olduğu bilinen doğal ve organik maddeleri kullanmaya çalışmaktadır (Bharti vd., 2021). Flavonoidler, sinamik asit türevleri ve kumarinler, bitkisel ürünlerin antioksidan özelliklerine katkıda bulunan fenolik maddelerin örnekleridir (Kolaç vd., 2017). Biyoaktif fitokimyasal fenolik bileşikler aromatik halkaları ve hidroksil gruplarından dolayı çevrede bulunan proteinler, karbonhidratlar ve lipidlerin yanı sıra hücre duvarları gibi yapısal elementlerle hidrojen ve kovalent bağlantılar oluşturabilir. Bu bileşiğin sağlık açısından çok sayıda faydası olduğu iyi bilinmektedir (Karabulut ve Yemiş, 2019). Literatürde rapor edilmiş bir çalışmada p-kumarik asidin romatoid artrit enflamasyon üzerinde antienflamatuvar etkileri araştırılmış ve gözlenmiştir (Zhu vd., 2018). Diğer bir çalışmada sıçanlarda siyatik sinir kaynaklı nöropatik ağrının kronik konstriksiyon hasarında p-kumarik asidin etkisi değerlendirilmiş ve sonuç olarak p-kumarik asidin nöropatik ağrı semptomlarının tedavisinde faydalı olabileceğini düşünülmüştür (Bharti vd., 2021). Fenolik bileşiklerin en önemli özelliklerinden birini, vücutta oksidasyon veya lipit peroksidasyonu meydana geldiğinde serbest radikallerin ürettiği zarara karşı koymalarına olanak tanıyan güçlü antioksidan etkileri oluşturmaktadır (Rudrapal vd., 2022). Farmakolojik etki profilinde umut vaat eden sonuçlar ortaya koyan bu biyoaktif molekülün etkilerinin ve bu etkilerin mekanizmalarının araştırılması, tedavi yaklaşımları veya yeni ilaç keşifleri açısından büyük öneme sahiptir.

DRG nöronları ağrı iletiminin temel taşlarından biridir (Ahimsadasan, Reddy ve Kumar, 2018; Bhandari, Sharma ve Kuhad, 2022). Primer DRG nöron kültürü üzerinde yama kenetleme (patch clamp) tekniği ile yapılan çalışmalar, ağrı araştırmalarında önem taşımaktadır (Lin ve Chen, 2018). Bu çalışma kapsamında p-kumarik asit uygulamasının primer dorsal kök gangliyon (DRG) nöronları üzerindeki elektrofizyolojik etkilerinin araştırılması hedeflenmektedir.

## 2. LİTERATÜR

### 2.1. Ağrı

Ağrı genellikle hastaların tıbbi bakıma başvurduğu ilk şikayettir ve birinci basamak sağlık hizmeti sağlayıcısı için hem teşhis hem de tedavi açısından zorluk teşkil eder. Ağrının değerlendirilmesi, yalnızca hoş olmayan bir duyuma neden olan anormal duyuşal uyarının sonucu değildir; daha ziyade, bu rahatsızlığa verilen duygusal tepkiyle ilişkili somatik rahatsızlığın tanınmasının bir birleşimidir. Ağrının algılanması, sıkıntının ve sakatlığın boyutu önceki deneyimlere, kültürel geçmişe, durumsal faktörlere ve eşlik eden psikiyatrik hastalığa bağlı olarak değişebileceğini açıklanmıştır (Wang ve Mullally, 2020). Uluslararası Ağrı Araştırmaları Birliği (IASP) ağrıyı, vücudun herhangi bir bölgesinden kaynaklanabilen hoş olmayan, duyuşal ve duygusal bir duyum olarak tanımlamaktadır. Gözlenen bu durum bireyin geçmiş deneyimlerinden etkilenir, bir organizmadan kaynaklanabilmektedir veya kaynaklanmayabilir. Ağrının bir diğer adı da vücuttaki doku hasarının bilinçsizce farkına varılmasıdır (Aydın, 2002). Ağrının, insanların yaşamlarına müdahale eden vücudun korunma amaçlı uyarı sinyali olduğunun ve ağrı üretme potansiyeli olan uyarıların, nosiseptör olarak bilinen bazı reseptörleri aktive etmesiyle başladığının altı çizilmektedir (Saygın, Nazıroğlu ve Çalışkan, 2009). Ağrı çeşitli şekillerde sınıflandırılmıştır (Aydın, 2002) (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1.** Ağrının sınıflandırılması (Aydın, 2002; Saygın, Nazıroğlu ve Çalışkan, 2009).

Ağrının meydana gelme süresine göre sınıflama	1. Akut olan ağrı 2. Kronik ağrı
Mekanizmalarına göre ağrı sınıflaması	1. Deafferantasyon ağrısı 2. Nosiseptif ağrı 3. Reaktif ağrı 4. Psikosomatik ağrı 5. Nöropatik ağrı
Kaynaklandığı vücut bölgesine göre ağrı sınıflaması	1. Vıseral ağrı 2. Somatik ağrı 3. Periferal ağrı 4. Sempatik ağrı

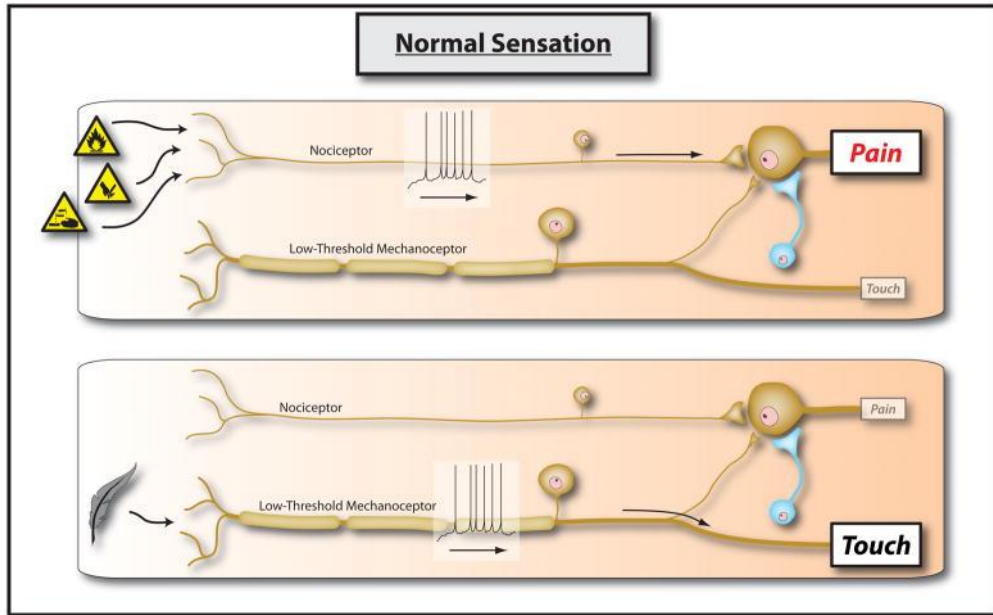
Vücudun ağrıyı algıladığı 4 aşama vardır:

1. Transdüksiyon: Uyarı, sinirlerin duyu terminallerinde elektriksel aktiviteye dönüştürülür.
2. Transmisyon: Duyu sinirleri kullanılarak uyarılar, duyuşal sinir sistemi yoluyla üst merkeze gider.

3. Modülasyon: Nöral değişkenler nosiseptif bilginin iletimini değiştirir.
4. Persepsiyon: Ağrı algısının, uyarının alındığı son aşama olan bu aşamada gerçekleştiği açıklanmıştır. Bireyin psikolojisi ile öznel duygusal deneyimi arasındaki etkileşimden kaynaklandığı öne sürülmüştür (Aydın, 2002).

## 2.2. Hiperalezi ve Alloğini

Rahatsız edici uyarıların neden olduğu normalden daha yüksek bir ağrı tepkisi, hiperalezi olarak bilinmektedir. "Alloğini" terimi, inflamatuvar olmayan bir uyarıya tepki olarak ağrı deneyimini ifade etmektedir (Şekil 2.1). Hasar bölgesinde salınan kimyasalların, duyuşal sinir uçlarındaki reseptörlerin doğrudan uyarılmasına neden olduğu ve bunun da inflamatuvar ağrıya neden olduğu kanıtlanmıştır. Hasar görmüş hücrelerden  $K^+$  salınımının sinir terminallerinde doğrudan depolarizasyona neden olarak nosiseptörlerin duyarlılığını arttırdığı vurgulanmıştır (sensitizasyon = duyarlılaştırma). Hasarlı hücrelerden P maddesi ve bradikinin salınımı da uçların hassasiyetini arttırmaktadır. Kronik ağrı, sinir terminallerinin kimyasal araçlar tarafından hassaslaştırılmasına ek olarak periferik sinir sistemi (PSS) ve merkezi sinir sistemindeki (SSS) değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Doku hasarı sırasında salınan sinir büyüme faktörü, sinir uçlarından alınmakta ve gen ekspresyonunu teşvik ettiği gösterilen dorsal kök ganglion hücre gövdesine retrograd olarak taşınmaktadır (Yağcı ve Saygın, 2019).



Şekil 2.1. Hiperalezi ve alloğini tanımlanması (Woolf, 2011.)

### 2.3. Ağrının iletilmesinde sinapsların rolü

Sırt boynuzunda üç farklı türde ikinci derece nöron bulunmaktadır: projeksiyon, uyarıcı ve inhibitör. Anterolateral afferent sistemden, projeksiyon nöronları (merkezi iletim hücreleri olarak da bilinir), ardından gelen sinyalleri ve uyarıları daha yüksek merkezlere göndermektedir. İki grup projeksiyon nöronu mevcuttur. İlk nöron grubu, yalnızca A $\delta$  ve C lifleri tarafından uyarılan projeksiyon nöronlarıdır; lamina I'de yoğun olarak dağılmış nosiseptif spesifik nöronlardır. Geniş Dinamik Aralığa (WDR) sahip nöronlar ikinci grubu oluşturmaktadır. Lamina I ve V, WDR nöronları içerir. Bunlar, nosiseptörlerin yanı sıra düşük eşikli mekanoreseptörler tarafından lifler tarafından uyarılan nöronlardır. Afferent A ve C lifleri, WDR nöronlarına hem nosiseptif hem de nosiseptif olmayan somatosensoryel uyarıların girdilerini sağlamaktadır. Bu sinyaller WDR hücreleri tarafından merkezi sinir sisteminin üst kısmına gönderilmektedir. Spinal WDR nöronu ağrı koşulları altında aşırı uyarılabilirlik gösterdiğinden, bu nedenle ağrının yoğunluğunu belirlemek için uygun olduğu belirtilmiştir. Nosiseptif işlemede ve sinir hasarından sonra artan spontan ateşleme ve periferik uyarılara karşı gelişmiş yanıt sergilemektedirler. WDR nöronları hem nosiseptif hem de nosiseptif olmayan somatosensoryel uyarıların afferent A ve C liflerinden girdiler almaktadır. WDR hücreleri bu sinyalleri merkezi sinir sisteminin üst bölgelerine iletmektedir. Spinal WDR nöronu, ağrıya tepki olarak aşırı uyarılma sergilediği için ağrı yoğunluğunu değerlendirmek için faydalı bulunmaktadır. Nosiseptif işlemede ve sinir kaybını takiben, periferik uyarılara karşı artan yanıt ve artan spontan ateşleme göstermektedir (Yang vd., 2015). Uyarıcı nöronlar olarak bilinen nöronlar, omurga reflekslerini veya projeksiyon nöronlarını aktive eden motor nöronlara ağırlı girdiler göndermekten sorumludur. Nosiseptif uyarıların inhibitör nöronlar tarafından kontrol edildiği ileri sürülmüştür (Aydın, 2002; Kim vd., 2017; Velioğlu, 2017).

#### 2.3.1. Dorsal kök ganglionları

Dorsal sinir kökleri, PSS'den SSS'ye duyuşal sinir sinyalleri taşır. Anatomik olarak, spinal sinirlerin dorsal kökünden bir DRG ortaya çıkar (Şekil 2.2). Bir yanıt için periferdeki çeşitli reseptörlerden (ağrı ve sıcaklık) duyuşal mesajları merkezi sinir sistemine taşırlar. DRG'nin kronik ağrıdaki rolünün iyi bilindiğini vurgulanmıştır (Ahimsadasan, Reddy ve Kumar, 2018). DRG'lerin, ağrı iletiminin yanı sıra duyuşal

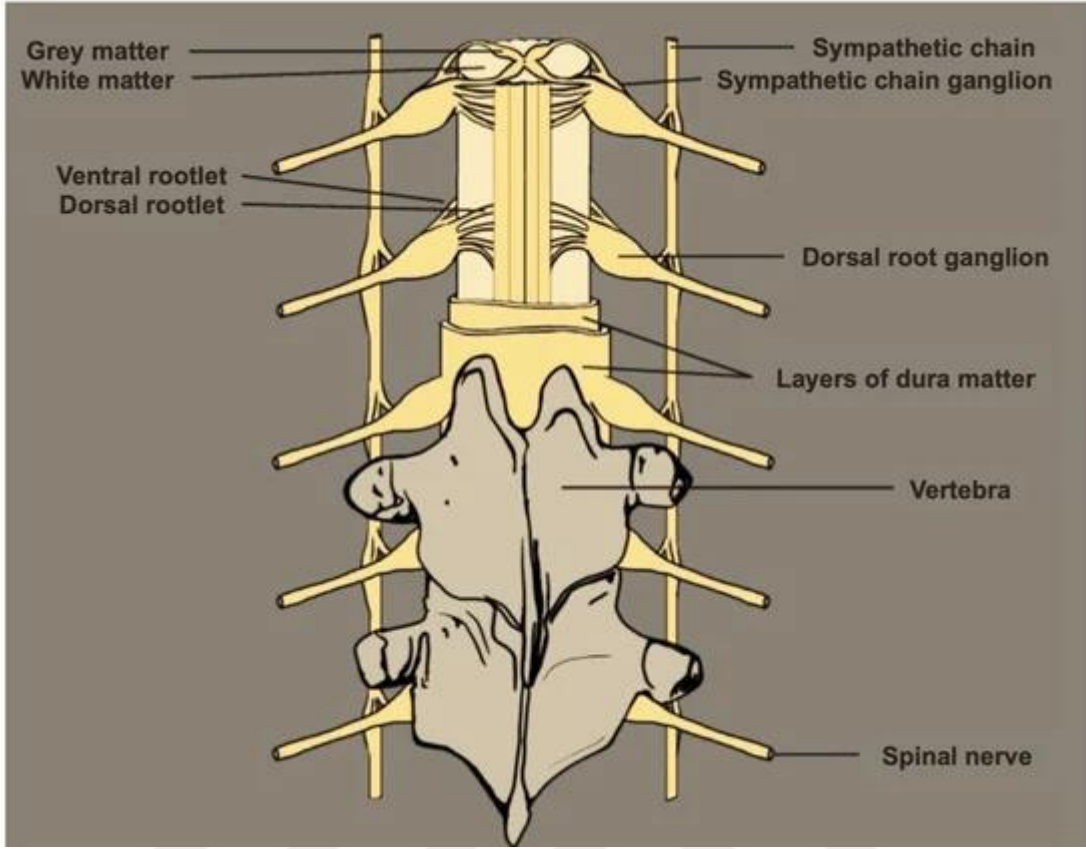
sinyalleme ve modülasyonda en belirleyici yapılardan biri olduğu vurgulanmıştır (Bhandari, Sharma ve Kuhad, 2022).

Dorsal kök ganglionlarının kimliği ve ilgisi, duyu nöronların hücre gövdelerini barındıran ilkel yapılar olarak görülmekten, iç ve dış çevremizle ilgili duyu bilgilerin iletimi için gerekli olan yüksek düzeyde organize edilmiş sinyal aktarma ve modülasyon komplekslerine doğru gelişmiştir. Her bir DRG nöronunun benzersiz psödonipolar yapısı, iki ayrı dala ayrılan bir aksona sahiptir ve bu da vücuttaki en uzun hücre uzantılarından bazıları olabilen proksimal bir süreç ve bir distal süreçle sonuçlanır. DRG'lerin bir diğer benzersiz özelliği de kan-beyin bariyerinin dışında fakat kısmen meninkslerle kaplı vertebral kolonun içinde yer almalarıdır (Haberberger vd., 2023).

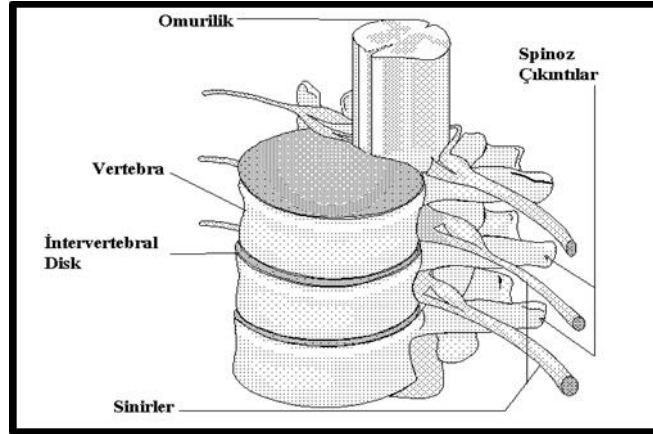
Ganglion, glial hücrelerden ve nöronal hücre gövdesini çevreleyen bağ dokusu kılıfından oluşan bir yapıdır. Ganglion, kapsülden giren ince bağ dokusu bölmeleriyle bölmelere ayrılmaktadır. Ganglion hücreleri ganglionu oluşturan hücrelerdir. Ganglion hücrelerini uydu hücreleri olarak bilinen tek sıra düz hücreler çevreler. Bir ganglionda birkaç hücre olabileceği gibi elli ile yüz bin arasında da hücre bulunabilmektedir. Gangliyonların hem miyelinli hem de miyelinsiz sinir liflerinden oluşan nöronlar ve bunların arasında oluşan bağ dokusundan oluştuğu belirtilmiştir (Erkoçak, 1984; Gardner ve Hiatt, 1997).

Gangliyonlara birçok isim verilmektedir. Dorsal kök ganglionu medulla spinalisin dorsal kökünün üzerinde yer alan nöronlardan oluşur (Şekil 2.2, 2.3 ve 2.4). Kranial sinirler boyunca gangliyonlar bulunmaktadır (Gardner ve Hiatt, 1997):

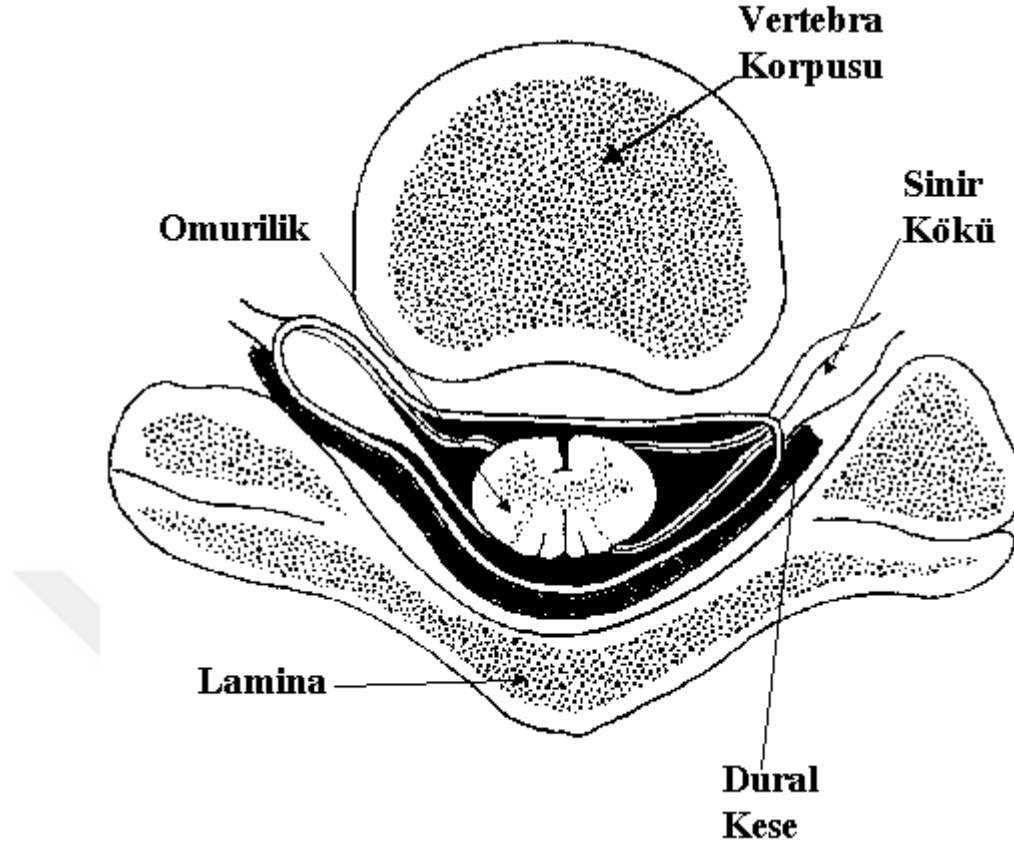
- 1- Duyu Gangliyonları (Kraniospinal gangliyonlar): Bu gangliyonlar kranial sinir gangliyonları ve spinal gangliyonlar (arka kök gangliyonları) olmak üzere iki gruba ayrılır.
- 2- Otonomik Gangliyonlar: Bu gangliyonlar iki çeşittir: parasempatik ve sempatik. İki tür sempatik ganglion bulunmaktadır: paravertebral ve prevertebral. Beyin stimülasyonunun gangliyonlara iletilmesi için bir merkez görevi görmektedir. Gangliyonlarda bir sinir girmekte ve bir sinir ayrılmaktadır. Ganglion, sinir girişinin hangi yöne yönlendirildiğine bağlı olarak ya duyu ya da otonom niteliktedir.



Şekil 2.2. Omurilik ve sinir köklerinin anatomik yapısı (Abd-Elsayed vd., 2024).



Şekil 2.3. Omurga, sinir kökleri ve omurilik arasındaki bağlantı (önden görünüm) (Ahmadzada, 2022).



**Şekil 2.4.** Sinir kökleri ve omurilik ile omurlar arasındaki ilişki (enine kesit) (Ahmadzada, 2022).

DRG'nin sinir hasarı, inflamasyon ve kronik ağrı gelişiminde önemli klinik önemi vardır. DRG içindeki hücresel ortamın karmaşıklığına dair anlayışımız son elli yılda genişlediğini ve DRG, kronik ağrı durumlarının gelişiminde anahtar bir bileşen ve yeni tedaviler için potansiyel bir hedef olarak giderek daha fazla araştırılıyor olduğu açıklanmaktadır. Bu nedenle, DRG'nin ve bileşenlerinin hücresel düzeydeki üst yapısı hakkında kapsamlı bilgi, yapı-işlev ilişkilerinin daha iyi anlaşılması için esastır. Bu bilgi, bu yeni ortaya çıkan tedavilerin birçoğunun öngörülen potansiyellerine ulaşması için hayati önem taşımaktadır. Bugüne kadar üretilen ultrastrüktürel veriler büyük ölçüde DRG içinde yer alan duyu nöronlarının araştırılmasına odaklanmıştır. Daha yeni çalışmalar, DRG nöron fonksiyonunu modüle etme kapasitesine sahip olan DRG içindeki nöronal olmayan hücreleri içeren işlevsel olarak önemli etkileşimleri anlamaya doğru yönelmiştir (Haberberger vd., 2023).

#### 2.4. Yama Kenetleme Tekniği ve Güncel Yaklaşımlar

Kırk yıl önce, yeni bir elektrofizyolojik tekniğin (patch clamp / yama klemp) tanıtılması, hücreyel fizyoloji ve biyofizik alanlarında devrim yaratmış ve ilk kez hücre plazmasının iyon geçirgen bir kanalı olan tek bir proteinin davranışını tanımlama olasılığını sağlamıştır. Yeni yaklaşım aslında başlangıçta öngörülenden çok daha güçlü ve çok yönlü olarak benimsenmiş ve hücrelerin (sadece sinirler ve kaslar gibi klasik "elektriksel olarak uyarılabilir" olanlar değil) elektriği nasıl kullandıklarına dair bilgimizi kökten değiştiren birkaç farklı yöntemle dönüşmesi mümkün olmuştur (Lovisolo, 2022).

Yama klemp elektrofizyolojisi, sinir biliminde bireysel nöron davranışını anlamak için kullanılan yaygın bir tekniktir ve çoğu elektrofizyoloji yöntemiyle karşılaştırıldığında üstün uzaysal-zamansal çözünürlükle akım ve voltaj değişikliklerinin kaydedilmesine olanak tanır. Yama klemp deneyleri yüksek doğrulukta elektrofizyoloji verileri üretirken, teknik ise zahmetli ve emek yoğundur. Tipik yama klemp prosedüründeki önemli aşamaları otomatikleştiren yama klemp sistemlerinin ortaya çıkmasına rağmen, tam otomasyon hala zor bir süreç olarak nitelendirilmektedir. Mikropipetlerin, robotik manipülatörlerdeki bir nöronun çapını kolayca aşabilen konumlandırma hataları nedeniyle otomatik deneyler sırasında hedef hücreyi kaçılabileceği belirtilmiştir (Gonzalez vd., 2021).

Yama klemp zayıf akımı pikoamper (pA) seviyesinde ölçebilen bir tekniktir. Membran potansiyeli ve iyon kanalı akımlarının kaydedilmesi gibi temel tıbbi araştırmalarda hücreyel elektrofizyolojik kayıt için yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğru ölçüm sonuçları elde etmek için pipetin hem direncinin hem de kapasidansının telafi (kompanse) edilmesi gerekir. Kapasidans kompanzasyonları yavaş ve hızlı kapasidans kompanzasyonlarından oluşur. Yavaş telafi, hücre zarının lipit çift katmanı tarafından belirlenir ve büyüklüğu, hücre boyutuna bağlı olarak genellikle birkaç pikofaraddan (pF) birkaç mikrofarağ'a (µF) kadar değişir. Hızlı kapasidans, çoğunlukla birkaç pF arasında değişen, cam pipetin, tellerin ve çözeltilinin dağıtılmış kapasidansı tarafından oluşturulur. Pipet çözeltideki hücreleri emdikten sonra cam pipetin ve telin konumları belirlenmiş olup, yavaş ve hızlı kapasidans için sadece bir kez kompanzasyon alınması kayıt ihtiyacını karşılamaktadır. Bununla birlikte, çalışmanın sıcaklık karakteristikleri ile ilgilenmesi gerektiğinde, kapasidansın sıcaklık karakteristikleri üzerinde de bir tanıma yapılması gerekmektedir. Yama klemp ile hücre zarı üzerindeki fototermal etkiyi incelediğimizde, hızlı kapasidans deşarjının zaman sabitinin banyo çözeltilisinin

sıcaklığının artmasıyla değiştiği bulunmuştur. Bu olguya dayanarak sıcaklığa bağlı parametreleri hesaplamak için eşdeğer bir devre önerilmiştir. Yama klemp tekniğine dayalı hücresel elektrofizyoloji ile ilgili hassas sıcaklık karakteristiği çalışmalarındaki güncel gelişimler, tekniğin ilerlediğinin bir rneği olarak karşımıza çıkmaktadır (Kong vd., 2021).

Otomatik yama klemp (automated patch clamp = APC) sistemleri, iyon kanalı bileşiklerinin yüksek verimli elektrofizyolojiye dayalı taranmasına izin vererek ilaç keşif programlarının vazgeçilmez araçları haline gelmiştir. Mikroakışkan bazlı APC sistemlerinin son zamanlardaki gelişimi ve piyasaya sürülmesi, ligand kapılı iyon kanallarının agonistler, antagonistler veya pozitif allosterik modülatörler gibi farmakolojik reaktiflerle etkileşimlerinin, bunlarla karşılaştırılabilir güvenilir farmakolojik sonuçlarla incelenmesini mümkün kılmıştır. APC sistemleri, yüksek üretim kapasidesini korurken, altın standart manuel yama klemp tekniğini kullanmaktadır. Birçok ligand kapılı iyon kanalı, ligandların tekrar tekrar dahil edilmesi üzerine hızlı duyarsızlaşma sergilemektedir; farmakolojik etkileşimin yokluğunda kanal aktivitesindeki bu kaybın, yüksek başarı oranı, düşük sonuç ve güvenilir farmakolojik sonuçlara sahip doğru, kesin ve sağlam analizlerin geliştirilmesi açısından zorluk teşkil ettiği açıklanmıştır (Yehia ve Wei, 2020).

Üniversitemiz bünyesinde kurulmuş olan yama klemp laboratuvarı, eczacılık fakülteleri arasında Türkiye’de ilklerden olma özelliği taşımaktadır (şekil 2.4).



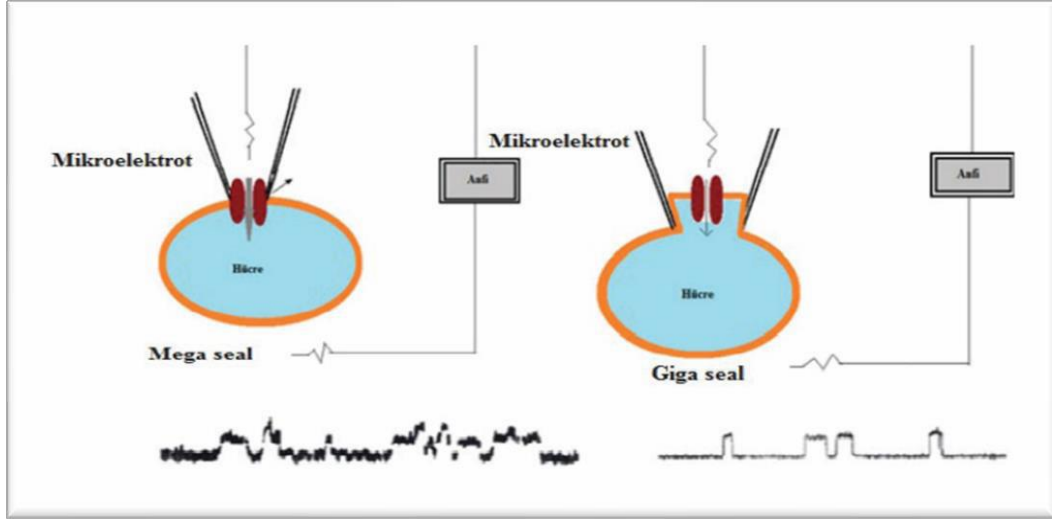
*Şekil 2.5. Anadolu Üniversitesi bünyesinde kurulan patch clamp laboratuvarı*

Tipik olarak hücre zarı kanallarından geçen iyon akımları yama kenetleme tekniği kullanılarak incelenir (Savrun, 2017). Bu yöntemin esasen 3 kuralı vardır:

1. Pozitif akıma sahip hücreler depolarize, negatif akıma sahip hücreler ise hiperpolarize olur.
2. Hücreler akım gönderdiğinde hiperpolarizasyon ve depolarizasyon süresince zaman geçer, bu noktada hücrelerin kapasitansının ayarlanması önemli bir gerekliliktir.
3. Hücre zarı potansiyeli, hücre içine iyon difüzyonu olmadığında sabit kalır.

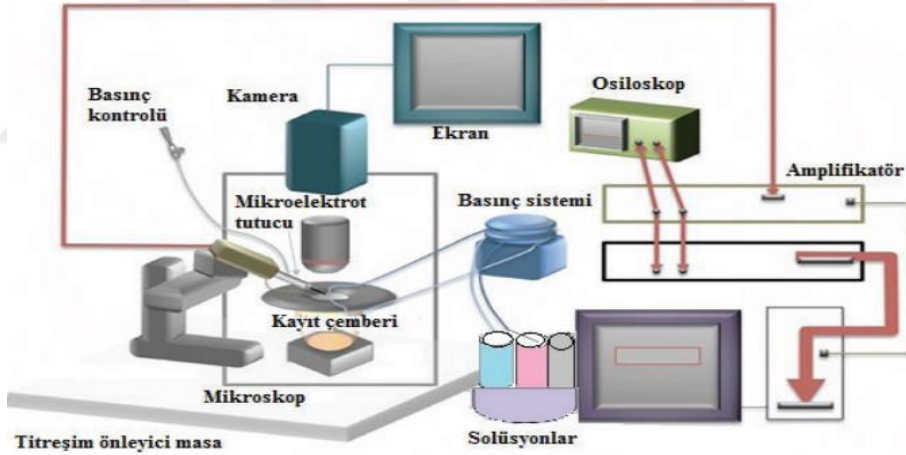
Yama kenetleme modeli Hodgkin-Huxley modeli değerlendirilerek açıklanabilir. Membran geçirgenliği,  $K^+$  ve  $Na^+$  iyonları kullanılarak niceliksel olarak ölçülebilir. Zaman ve membran potansiyeli iletkenliği belirler. Bu, uyarıcı hücre aksiyon potansiyellerini (AP) araştırmak için yararlı bir araç olarak görülmektedir (Düzgün Ergün ve Dursun, 2018).

Yama kenetleme yönteminde, iyon kanalından geçen akımın kaydedilmesi, özel olarak yapılmış bir mikroelettrot ağzının hücre zarının bir bölümüne takılması ve zar potansiyelinin sabit bir değerde ölçülmesiyle bu kayıtların incelenmesi amaçlanmaktadır. Pipetin diğer ucunu vakumlamak için bir emme yaklaşımı kullanılarak, kesilmiş bir cam pipet, ısıtma işlemi sırasında hücre zarı ile yakın temasa getirilir. Kontak kısmı elektriksel dirence sahiptir (Gigaseal) (Şekil 2.5) (Ergün ve Dursun, 2018).



Şekil 2.6. Kayıt alınacak hücrede giga seal oluşturulması (Ergün ve Dursun, 2018).

Aşağıdaki bileşenler yama kenetleme sistemini oluşturmaktadır (Ergün ve Dursun, 2018) (Şekil 2.6):



Şekil 2.7. Yama kenetleme seti (Ergün ve Dursun, 2018).

1. Hücreden elde edilen biyopotansiyel kayıtları güçlendiren ve netleştiren Amplifikatör (Patch Clamp Amplifiers).
2. Kayıtları çıkarmak için grafik uygulamasını kullanan bilgisayar
3. Hızlı hareketlerin yanı sıra pipet tutucunun doğru, kademeli hareketlerine olanak tanıyan mikromanipülatörler.
4. Pipetin küçük hareketinin hücre zarını parçalamasını önlemek için gigaseal oluştuğunda titreşimleri durduran bir antivibratör masası.
5. Topraklama sisteminin bir parçası olan faraday kafesi (Şekil 2.7)



Şekil 2.8. Faraday kafesi

6. Çeşitli sıvılardaki ilaçları ve nörotransmitter bileşiklerini yama kenetleme çemberi içindeki hücrelere iletmek için hücre dışı yöntemler kullanan perfüzyon sistemleri
7. Hücreleri gözlemlemek ve pipet ucu ve hücre zarı yama kenetleme deneyini gerçekleştirmek için bir mikroskop
8. Pipet yapımında kullanılan, hız ve sıcaklık ayarı ile pipetin direncinin modifikasyonuna imkân sağlayan mikropipet çekici cihaz (micropipet puller) (Şekil 2.8)
9. Çalışmanın ana konusuna göre değişik tipleri bulunan cam pipetler



Şekil 2.9. Pipet yapıcı mikropipet çekici (mikropipet puller)

Zamanla yama kenetleme sistemleri önemli değişikliklere uğramıştır. Mesela HEKA'nın ürettiği EPC7 tipi amplifikatör, on yıl öncesine kadar bazı laboratuvarlarda kullanılıyorken, EPC10 modeli artık kullanımda bulunmaktadır. Bu aparat, kaydettiği biyoelektrik potansiyeli daha yorumlayıcı bir formata dönüştürmektedir. Üç elektrotlu kurulum ve yama ampermetre uygulamalarının özel bir koruma gerektirmesi durumunda bunlar karşılanmaktadır (Düzgün Ergün ve Dursun, 2018).

Yama klamp metodu ile birçok diğer araştırma tekniği kombine edilerek detaylı raporlar literatüre sunulmaktadır. Bunlara örnek olarak optogenetik, immünofloresan, RNA dizileme yöntemleri gibi yöntemlerin yama klemp metodu ile birlikte çalışılması verilmektedir (Hu, Gan ve Jonas, 2014; Fuzik vd., 2016; Stuber vd., 2011).

Yama kenetleme uygulamasının elektrofizyolojiye yeni bir soluk getirdiği söylenmektedir. Bu teknik, hücre zarlarında bulunan kanalların bileşimini, bunların açılma ve kapanma mekanizmalarını, kimyasal ve nörotransmitter tepkilerini araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yama kenetleme uygulamaları, yakın zamanda tanımlanan çok sayıda iyon kanalının incelenmesi için hala geçerliliği yüksek olan bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (Düzgün Ergün ve Dursun, 2018).

#### **2.4.1. Yama kenetleme uygulamaları**

Araştırmanın amacına ve incelenecek kimyasalın, kanal engelleyicinin veya nörotransmitter materyalin türüne bağlı olarak 4 farklı türde yama kenetleme uygulaması bulunmaktadır. Bunlar; içi dışarıda (inside-out), hücre üzerinde (cell attached-on cell), dışı dışarıda (outside-out) ve tüm hücre kaydı (whole-cell recording) uygulamalarıdır (Şekil 2.9).

Hücre üzerinde (cell attached-on cell) uygulaması tam bir yama kenetleme uygulamasıdır. Bu uygulamanın ilk aşamasında mikropipet çekici ile ısıtma işlemi yapılarak yaklaşık 1–5 mikrometre yarıçapında bir pipet ucu oluşturulduktan sonra mikroskop çemberindeki hücreye temas edilir. Hücre zarı ile pipet arasında pipetin küt ucundan emici pompa ile vakum oluşturularak gigaohm düzeyinde bir akım oluşturulur, gigaseal elde edilir. Elektrotla temas eden pipet ucundaki hücre zarı kısmı zarın diğer kısımlarından izole edilmiştir fakat hücre içi ortamdan (ikincil haberciler, nörotransmitterler vb.) etkilenir. Zar potansiyeli direk olarak hesaplamadan ziyade, hücrenin bağımsız bir voltaj menteşe yöntemi ile ölçülür. Bu uygulamalar, ikincil haberciler ve diğer düzenleyiciler tarafından hücre zarı kanallarının açılması-kapanması

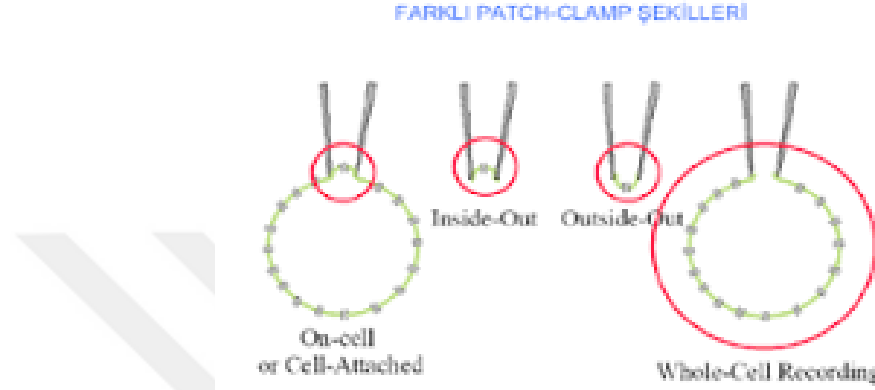
ve voltaj değişiklikleri inceleneceği zaman tercih edilir (Saygın, Nazıroğlu ve alışkan, 2009).

Tüm hücre kayıt modunda (whole-cell recording) ek hücre işleme gerçekleştirilmektedir. Pipet ucu kullanılarak membrana kaynak vakum pompası ile sabit vakum uygulanarak membran yırtılır. Sonuç olarak hücre sitoplazma voltajındaki değişiklikler doğrudan pipet elektrotu tarafından ölçülür. Pipetteki çözelti hücre sitoplazmasına girer, hücre sitoplazma sıvısı pipete girer ve pipet ucu zarının yırtılması sonucu her ikisi de bir denge kurar. Bu uygulama, nöronların hücre zarı kısımlarına kolayca girilmesini sağlar. Hücre zarı tahribatının bir sonucu olarak onlarla gerçek iletişim kaybolduğundan, hücre içi ikincil haberciler orada olmadığında ne olduğuna bakmak mümkündür. Ayrıca bu düzenleme, aktivatör veya inaktivatör materyallerin hücreye verilmesini basitleştirerek hücre zarı reaksiyonlarının doğru bir şekilde değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (Saygın, Nazıroğlu ve alışkan, 2009). Mevcut tez çalışması kapsamında bu konfigürasyon kullanılmıştır.

Dış-dışarı (outside-out) konfigürasyonda kayıt yaparken, tüm hücre kayıt aşamasında hücre zarı yırtılır. Pipetin içi hücre içi solüsyonla, dairesel kısmı ise harici solüsyonla doldurulur. Bu, bu yöntemi içten dışa kayıttan ayırır. Yama şekillendirmede hücre dışı tarafı banyo çözeltisine bakacak şekilde tek iyon kanalları kullanılır. Hücre dışı bileşenlerin (nörotransmitter kimyasallar gibi) araştırılması gerektiğinde bu tasarım ideal bir seçim gibi görünmektedir (Saygın, Nazıroğlu ve alışkan, 2009).

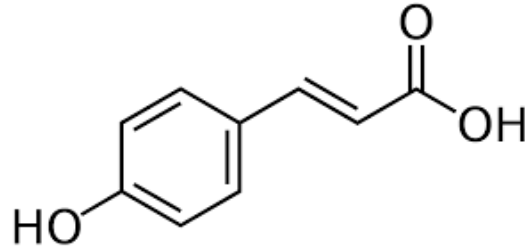
İçi dışarıda (inside-out) tekniği kullanılarak, hücre zarı tüm hücre kayıt süresi boyunca yırtılırsa, manipölatörün hızlı bir şekilde geri çekilmesi ve mikro ayardan makro ayara geçilmesiyle bu durum yine de kaydedilebilir. Bu durumda iyon kanalları sonuç olarak hücre zarından izole edilir. Ancak bu durumda pipet ucunun hücre zarının tampondan kaçmasını önlemek için dikkatli olunmalıdır. Henüz bilinmeyen nedenlerden dolayı pipetin ucundaki hücre zarı parçacığı kendi kendini tersine çevirmektedir. Pipet ucundaki hücre zarı, içi dışarıda kayıt sisteminde, pozisyon değiştirir, bu nedenle dışarı içeri gelir ve içerisi dışarı çıkar. Buna karşın, dışı dışarıda kayıt sisteminde hücre zarının içi ve dışı pozisyon değiştirmez. Bu, bu tür yama kenetleme uygulaması için iç-dış adının kökenidir. Sonuç olarak, pipetin içinde hücre içi çözeltisi bulunur, dış çözeltisi ise kayıt odacığının içinde yer alır. Hücre içi uyarıcılarla tetiklenen iyon kanallarının araştırılması için içi dışarıda yöntemindeki yaklaşım faydalı bulunmaktadır. Ayrıca, içi dışarıda yöntemi tek kanal (single channel) araştırmasının uygulanmasını keşfetmek için

kullanılabilmektedir. Bu uygulama, TRPM2 kanallarının N-terminal ucu gibi bir hücre kanalını açan unsurların zar üzerinde olduğunu ve pipet ucundaki kanallar farklı maddelere maruz bırakıldığında açılıp kapanabiliyorsa, kanalların aktivasyonu için hücre içi organellerin gerekli olmadığını açıkça göstermektedir (Saygın, Nazıroğlu ve Çalışkan, 2009).



Şekil 2.10. Yama kenetleme uygulamaları (Saygın, Nazıroğlu ve Çalışkan, 2009)

## 2.5. P-Kumarik Asid



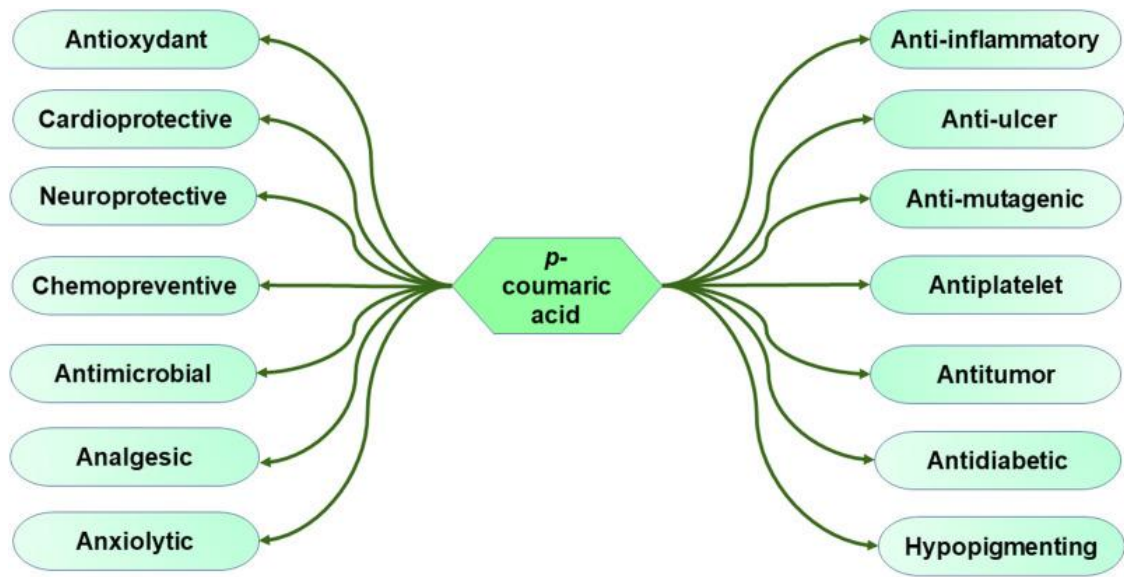
Şekil 2.11. p-Kumarik asid'in kimyasal formülü (Onat vd., 2021).

Fenolik bileşiklerin geniş ve yüksek etki profili olan ve bitkilerde yaygın olarak bulunan sekonder metabolitlerinden oldukları bildirilmiştir (Yang vd., 2001). p-Kumarik asit, hidroksisinnamik asit (4-hidroksisinnamik asit) ailesinde doğal metabolitlerinden en çok p-CouA izomeri bulunup  $C_9H_8O_3$  moleküler formülüne sahip, sarımsı yeşil kristalli bir tozdur (Janicke, Önning ve Oredsson, 2005; Ferreira vd., 2018). Bitkilerde p-kumarik asit serbest veya konjuge formda bulunmaktadır ve diğer fenolik bileşiklerin öncüsü niteliğindedir (Pei vd., 2016).

p-Kumarik asit yenilebilir bitkilerde, mantarlarda, sebzelerde (örneğin domates, havuç, sarımsak, soğan ve patates), meyvelerde (örneğin üzüm, elma ve armut), tahıllarda

(örneğin buğday, yulaf, pirinç) ve içeceklerde (örneğin çay, kahve ve şaraplar) yaygın olarak bulunmaktadır (Jaganathan, 2013; Hu vd., 2020).

p-Kumarik asit, farmakolojik ve biyolojik özelliklerinden dolayı araştırma potansiyeli olarak büyük ilgi görmektedir (Şekil 2.11). Kardiyoprotektif, antioksidan, nöroprotektif, antiülser, antiplatelet, antimikrobiyal, kemoprotektif ve antikanser aktiviteleri gösterilmiştir (Godarzi, vd., 2020). p-Kumarik asidin insan sağlığı açısından daha az toksisiteye sahip potansiyel bir antikanser ajanı olduğu gösterilmiştir (Tehami vd., 2023).



Şekil 2.12. p -CouA asidinin farmakolojik aktiviteleri (Tehami vd., 2023).

Biyoyararlanım, polifenoller gibi diyetle alınan nutrasötiklerin biyoverimliliğinin anahtarıdır (Dima vd., 2020). Hidroksisinnamik asitler söz konusu olduğunda, p-kumarik asidin fizyolojik önemi, bağırsaktan emilme ve hedef dokularla daha fazla etkileşim için kullanılabilirliğinde yatmaktadır (Konishi, Kobayashi ve Shimizu, 2023). İlginç bir şekilde, p-kumarik asidin transepitelyal taşınma hızı, gallik asidinkinden yaklaşık 100 kat daha yüksek bulunmuştur (Konishi, Kobayashi ve Shimizu, 2023). *In vivo* çalışmalar p-kumarik asidin mide, jejunum, ileum ve kolon yoluyla absorbe edilebildiğini göstermiştir (Konishi, Zhao ve Shimizu, 2006). Üstelik p-kumarik asidin, kafeik, ferulik, rosmarinik ve klorojenik asitlerden çok daha fazla biyoyararlılığa sahip olduğu bildirilmiştir (Kishida ve Matsumoto, 2019).

Pragasam ve Rasool tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada (2013), p-kumarik asidin, akut gut artriti için deneysel bir model olan, sıçanlarda monosodyum ürat

kristalinin neden olduğu inflamasyon üzerindeki etkisini değerlendirmek için pençe ödemi, lizozomal enzimlerin seviyeleri/aktiviteleri, lipid peroksidasyonu, enzimik antioksidanlar ve ayak bileği eklemlerinin histopatolojik incelemesi, kontrol ve monosodyum ürat kristalinin neden olduğu iltihaplı sıçanlarda değerlendirilmiştir. Ayrıca, analjezik etkileri taramak için asetik asit kaynaklı kıvrınma testi ve kuyruk daldırma testi kullanarak, antipiretik etkileri test etmek için maya kaynaklı pireksi kullanılmış ve ülserojenik etkileri değerlendirmek için mide ülseri modeli kullanılmıştır. Sonuç olarak monosodyum ürat kristali ile indüklenen sıçanlarda pençe ödeminde, lizozomal enzim aktivitesinde ve lipid peroksidasyon düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenirken, enzimatik antioksidanların aktivitelerinin kontrol sıçanlarına göre azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, p-kumarik asit (100 mg/kg dozunda) ile tedavinin etkililiğinin, ayak bileği eklemlerinin histopatolojisi ile kanıtlandığı gibi, değişen fiziksel ve biyokimyasal parametreleri önemli ölçüde normale yakın seviyelere geri döndürmesi ile ortaya konmuştur. Ek olarak, p-kumarik asit mide mukozası üzerinde herhangi bir olumsuz etki yaratmayan güçlü analjezik ve antipiretik etkiler de sergilemiştir (Pragasam ve Rasool, 2013).

Diğer bir çalışmada ise Chi vd., (2005), alfa-truksilik asit ve 4,4'-dihidroksi-alfa-truksilik asidin anti-inflamatuar aktivitelerinin yanı sıra bunların monomer bileşenleri sinnamik asit ve p-kumarik asidin etkilerini formalin testinde değerlendirmişlerdir. Alfa-truksilik asit ve bunun türevi 4,4'-dihidroksi-alfa-truksilik asit, inflamatuvar ağrı tepkisine karşı önemli bir aktivite sergilerken, bunların monomer bileşenleri sinnamik asit ve p-kumarik asit, farelerde formalinin neden olduğu nörojenik veya inflamatuvar ağrı tepkilerine karşı herhangi bir aktivite göstermemiştir. Bu sonuçlar, dimerik yapının anti-inflamatuar aktivitenin ekspresyonunda önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir (Chi vd., 2005).

### 3. METODOLOJİ

#### 3.1. DeneY Hayvanları

8-12 aylık ve 200-300 gram ağırlığındaki erkek Sprague Dawley sıçanlar, primer DRG nöronu eldesi gangliyon diseksiyonu için kullanılmıştır. Anadolu Üniversitesi'ndeki DeneY Hayvanları Araştırma ve Uygulama Birimi'nden temin edilen deneY hayvanları ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Tüm hayvan deneY protokolü ve bakım prosedürleri, Avrupa Parlamentosu ve Konseyi'nin 2010/63/AB sayılı Direktifi'ne uygun olarak gerçekleştirilmiş ve Anadolu Üniversitesi Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No: 2024-05) (EK-1).



Şekil 3.1. DeneYlerde kullanılan erkek Sprague Dawley rat örneği

Sıçanlar, denemelerden önce, sıcaklığı 18 ila 25°C arasında olan, 12 saat gündüz/gece aydınlatması olan, iyi havalandırılan odalarda tutulmaktır. Besleme için normal yem peletleri kullanılmıştır ve tüm süre zarfında istedikleri kadar yiyecek ve içecek ulaşımı sağlanmıştır. Deneysel prosedürler, Anadolu Üniversitesi Farmakoloji Anabilim dalı laboratuvarında ve Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (AÜBİBAM) bünyesindeki yama klemp laboratuvarında, sıcaklık ve nemi sabit bir ortamda yapılmıştır.

### 3.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Yama klemp metodunda kullanılmak üzere, intrasellüler ve ekstrasellüler çözeltilerin içerikleri şu şekildedir: İntrasellüler çözelti (mM cinsinden): 130 KCl; 10 NaCl; 10 HEPES; 4 Mg-ATP, 5 EGTA; 10 D-Glukoz. pH 1 mM KOH ile 7.3-7.4 değerine sabitlenmiştir. Ekstrasellüler çözelti (mM cinsinden): 140 NaCl; 5 KCl; 1.2 MgCl<sub>2</sub>; 2 CaCl<sub>2</sub>; 10 D-Glukoz; 10 mM HEPES. pH 1 mM NaOH ile 7.3-7.4 değerine sabitlenmiştir.

Test maddesi olan p-kumarik asit %3'ten daha düşük konsantrasyonda DMSO içeren ekstrasellüler çözelti içerisinde çözülerek stok solüsyonundan alınmak üzere 100 µM dozunda, yama klemp düzeneğinde hücrelerin bulunduğu petri kabına uygulanmıştır.

### 3.3. Kullanılan Cihazların Listesi

Deneyler süresince kullanılan cihazların listesi Tablo 3.1'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Cihazların listesi

Cihazın İsmi	Marka ve Model Bilgisi
Analitik laboratuvar tartısı	Ohaus, No: E 12140 (Greifensee, ZRH, İsviçre)
Anti-vibrasyon masa	Kinetic Systems, Inc , Model: 9100 S (Boston, MA, ABD)
Faraday kafesi	KS kinetic systems, Vibraplane (Boston, MA, ABD)
Mikropipet çekici	Sutter Instrument, Model: P-97 (Novato, CA, ABD)
İnvert mikroskop	Sutter Instrument, Model: Sutter BOB™ (Novato, CA, ABD)
Multi-mikromanipülator sistem	Sutter Instrument, Model: MPC-385 (Novato, CA, ABD)
Manyetik karıştırıcı	Benchmark, H3760-HSE (Sayreville NJ, ABD)
Motorize mikromanipülator	Sutter Instrument, Model: MP-285 (Novato, CA, ABD)
Mini sıcak banyo	Benchmark, BSH200 (Sayreville NJ, ABD)
pH metre	Adwa, AD8000 (Szeged, Macaristan)
Patch amplifikatör	Sutter Instrument, Model: IPA (Novato, CA, ABD)
Sentrifüj cihazı	Hangzhou Ruicheng instrument, MC600 (Hangzhou, Çin)
Vorteks	Scientific Industries, G560E (New York, ABD)

### 3.4. Primer DRG Hücre Kültürü

Deney hayvanlarının anestezisi için 1 ml/kg ketamin ve ksilazin karışımı 1.8/1 oranında intraperitoneal enjeksiyon kullanılmıştır (Duque vd., 2016) ve anestezinin etkisinin tam olarak oluşması için 10 dakika süre verilmiştir. Anestezinin tamamen gerçekleştirildiği hayvanlarda, dekapitasyon gerçekleştirilmiş ve ardından sırt bölgesinin kesilmesiyle omurga ortaya çıkarılmıştır. Ardından omurga çıkarılıp buzlu fosfat tamponu (phosphate buffered saline = PBS) dolu 50 ml'lik bir falcon tüpüne konulmuş ve DRG'lerin (dorsal kök gangliyonları) toplanmasına başlamadan önce bir süre beklenilmiştir. Kontaminasyonu önlemek ve teriliteyi sağlamak, omurganın transfer edilmesi ve DRG'lerin diğer dokulardan ayrıştırılması bir laminar akış kabinde gerçekleştirilmiştir. Omurga, 4°C'de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) çözeltisiyle dolu bir petri kabına konulmuş ve ardından iris makası kullanılarak omurga ortasından simetrik iki parçaya kesilmiştir (Şekil 3.2).



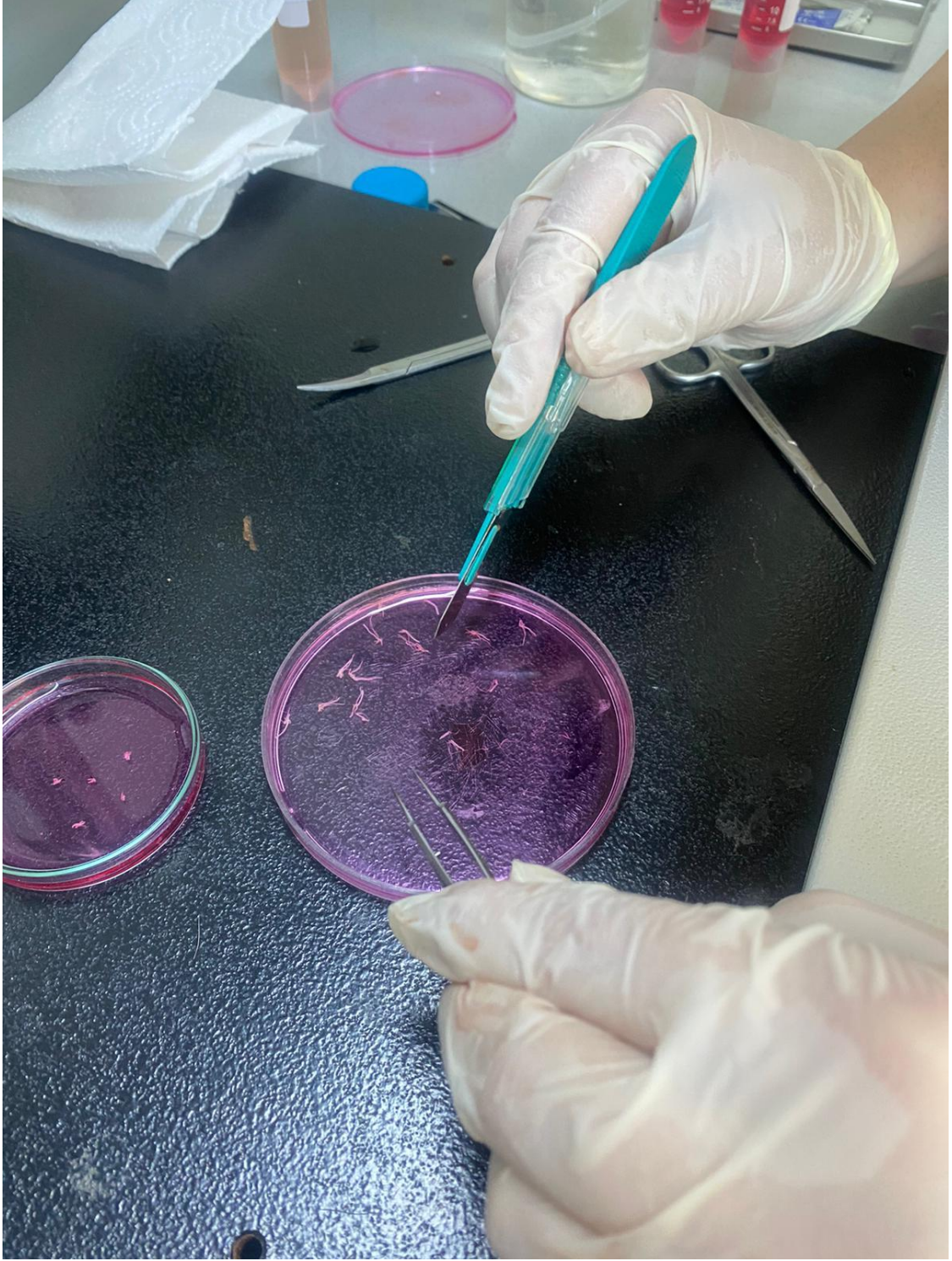
**Şekil 3.2.** Omurganın DRG'leri açığa çıkarmak amacıyla kesilmesi

Daha sonra omurilik dikkatlice çıkarıldıktan sonra (Şekil 3.3) DRG'ler, ince uçlu pens kullanılarak toplanmış ve toplanan gangliyonlar DMEM-Penisilin-Streptomisin içeren cam bir petri kabına konulmuştur.



*Şekil 3.3. Omurilik dokusunun uzaklaştırılması*

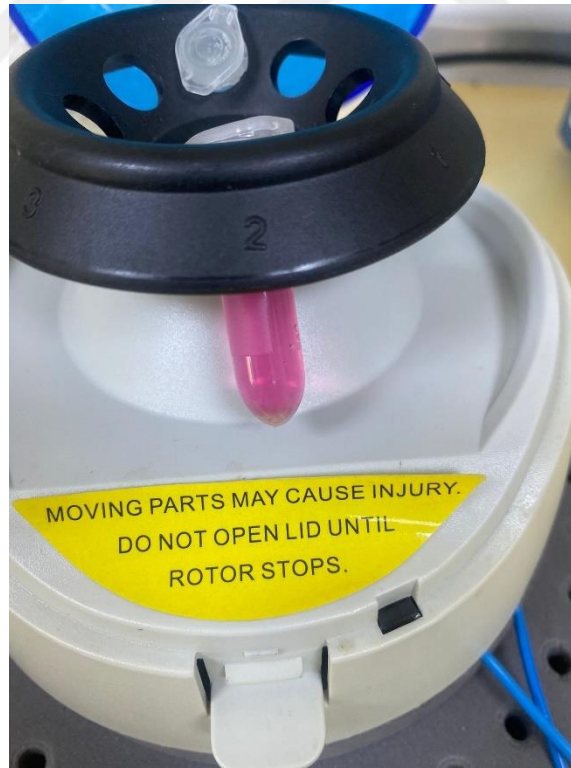
Besi yeri ortamında doku kaynaklı farklı hücre türlerinin birikimini önlemek için, elde edilen DRG'ler projeksiyonlardan olabildiğince temizlenmiş ve cerrahi lanset ve iris makası kullanılarak ayrılmıştır (De Luca, Faroni ve Reid, 2015; Lin ve Chen, 2018; Sleight, West ve Schiavo, 2020) (Şekil 3.4).



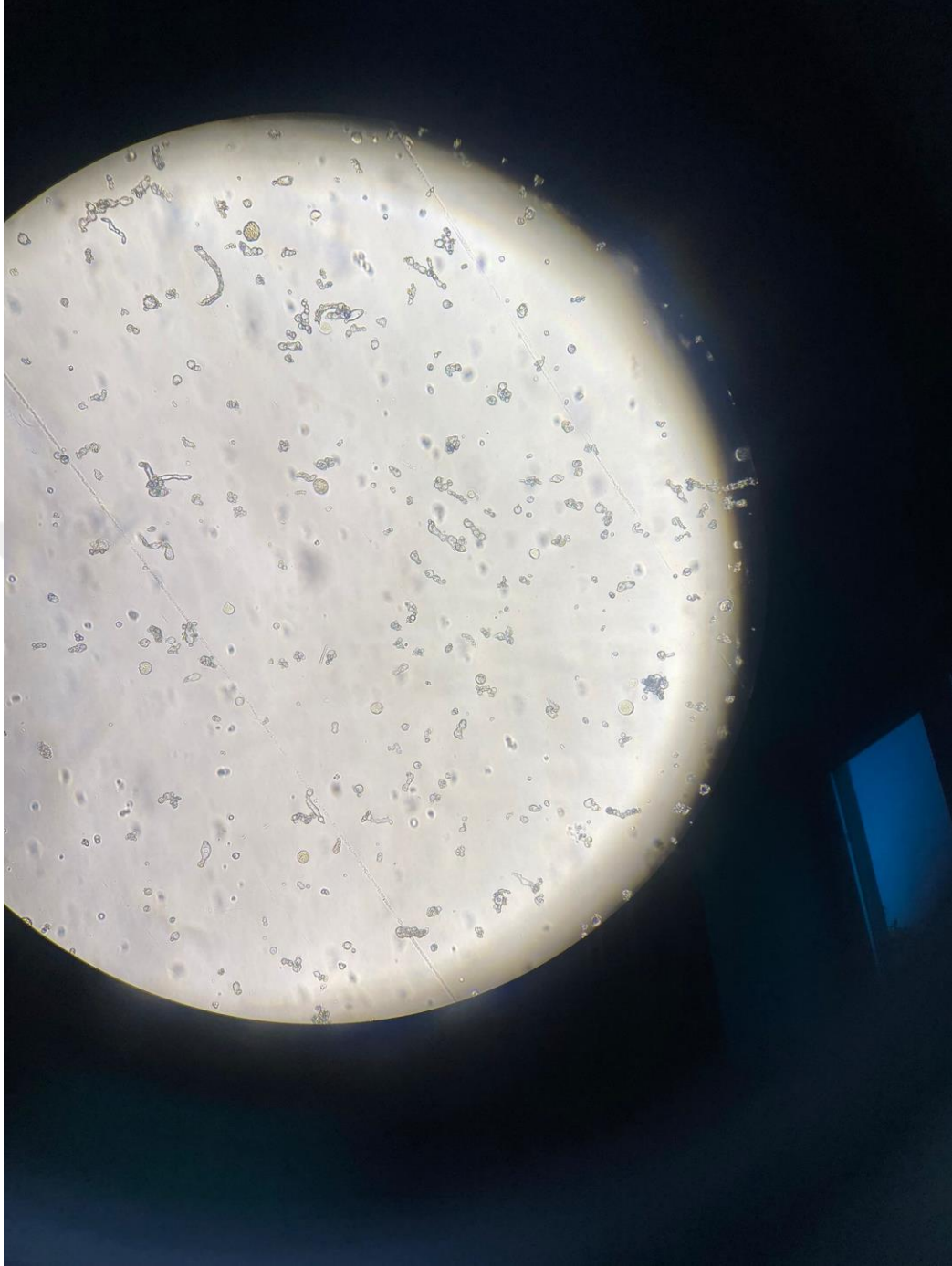
**Şekil 3.4.** Omurgadan çıkarılan DRGlerin uzantılarının kesilmesi

Enzimatik sindirim, temizlenmiş gangliyonların 2 mg tip IV kollajenaz içeren 1 ml DMEM-Penisilin-Streptomisin çözeltisine transfer edilmesi ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'de 45 dakika inkübe edilmesiyle başlatılmıştır, eppendorf tüpü açık bırakılmıştır. Gangliyonların yeniden süspansiyon edilmesi her 10 dakikada bir gerçekleştirilmiştir. İlk

inkübasyon dönemi sonunda, süpernatant atılmış ve 3 yıkama döngüsü PBS ile gerçekleştirilmiştir (süpernatant atılmış, 1 ml PBS eklenmiş, 30 saniye santrifüj edilmiştir), ardından yıkanan gangliyonlar 1 ml DMEM-penisilin-streptomisin ve 100 µl %0.25 tripsin içeren çözeltiliye konulup 3 dakikada bir DRG'lerin yeniden süspanse edilmesiyle birlikte 6 dakika inkübe edilmiştir. DMEM ile başka 3 yıkama döngüsü gerçekleştirilmiştir (süpernatant atılmış, 1 ml DMEM eklenmiş, 45-60 saniye santrifüj edilmiştir (Şekil 3.5). Daha sonra 1 ml DMEM, tripsinle sindirilmiş DRG'lere Eppendorf tüpünde eklenmiş ve toplamda 2 ml DMEM içeren gangliyon çözeltilisini elde etmek için 1 ml DMEM içeren 15 ml'lik bir falcon tüpüne transfer edilmiştir. Mekanik sindirim, sarı pipet ucu ile (200 µL'lik) dakikada 10-20 kez olmak üzere 15 dakika gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DRG hücre süspansiyonu, DMEM-Penisilin-Streptomisin + FBS çözeltilisine 1 ml hücre için 12.5 ml olarak transfer edilmiştir (De Luca, Faroni ve Reid, 2015; Lin ve Chen, 2018; Heinrich, Hübner ve Kurth, 2016). Elektrofizyolojik kayıtlar yapılmadan önce hücrelere 2 ila 3 saatlik bir dinlenme süresi verilmiş, sonrasında mikroskop altında gözlenmiştir (Şekil 3.6).



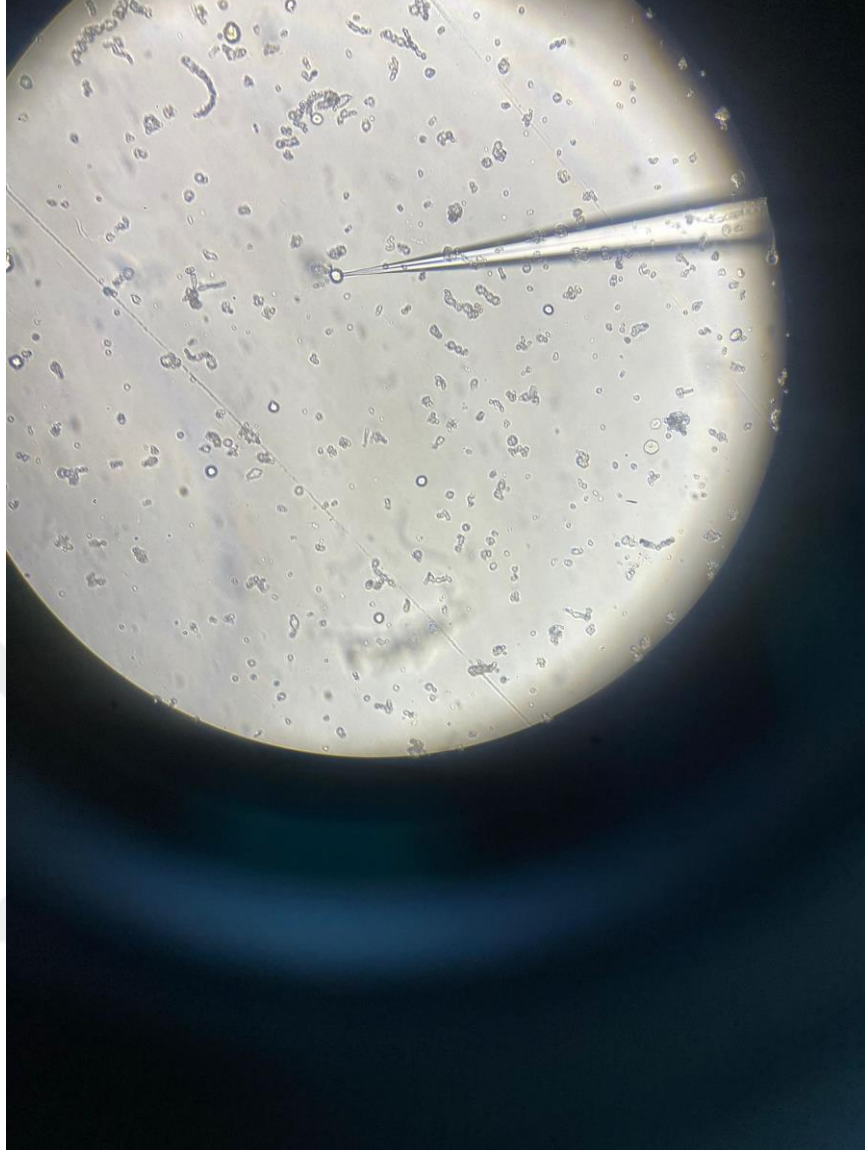
Şekil 3.5. Santrifüj cihazında ependorf içerisinde DRG



*Şekil 3.6. DRG hücrelerinin sonuçtaki süspansiyonunun mikroskop resmi*

### **3.5. Yama Klemp Kayıtları**

Yama klemp ölçümleri, hücrelerin 2 saat kadar dinlenmesinden sonra primer disosiyasyon DRG hücre kültürü üzerinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7). Elektrofizyolojik deneyler, yama kenetleme tekniğinin tüm hücre tekniği kullanılarak oda sıcaklığında (18-20 °C) gerçekleştirilmiştir. Test maddelerinin uygulanması, kayıtlı hücreden 50-100 µm uzaklıktaki ekstraselüler çözeltiliye yapılmıştır.



**Şekil 3.7.** Yama kenetleme kaydı sırasında hücrenin mikroskop altında görünümü

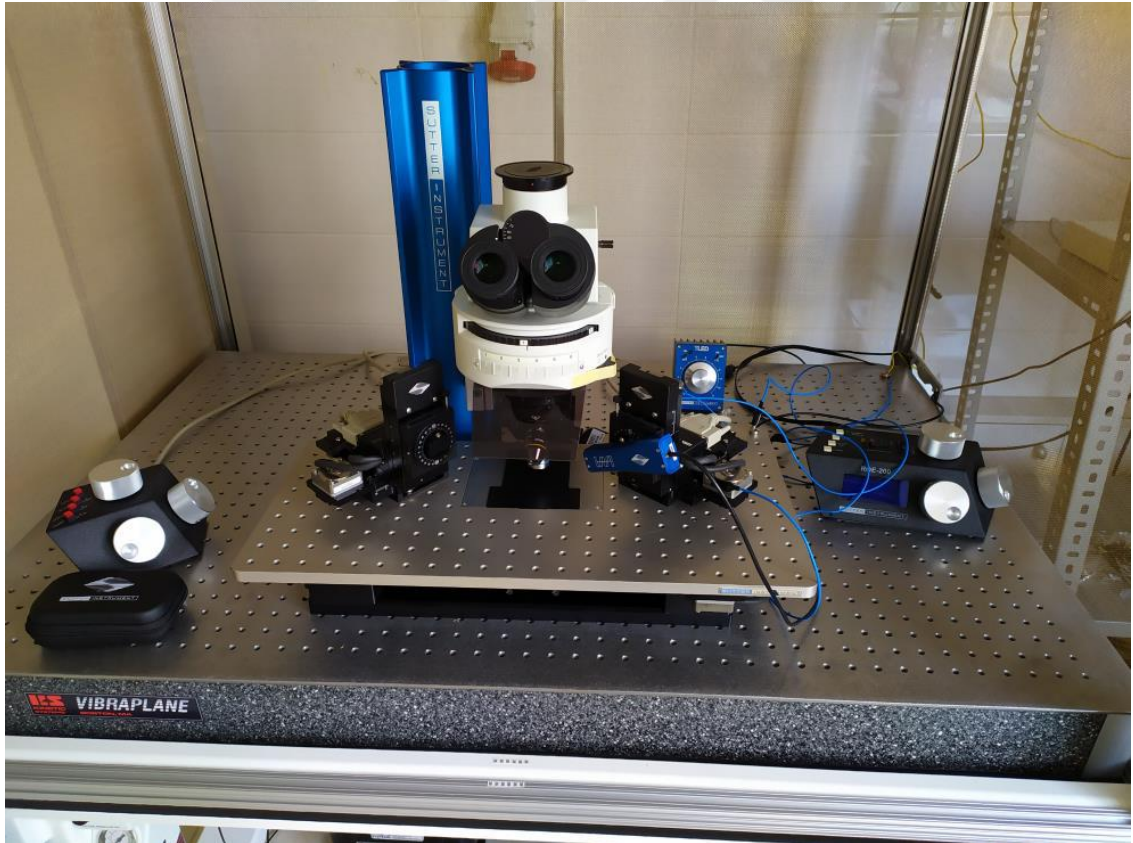
Voltaj-klemp kayıtları, akut olarak disosiyeye edilmiş DRG hücrelerinden iyon akımlarını kaydetmek için tüm hücre konfigürasyonunda gerçekleştirilmiştir. G $\Omega$ -seallar, Thin Wall Borosilikat cam pipetler kullanılarak oluşturulmuş (Sutter Instrument BF150-110-10) ve intraselüler çözeltiyle doldurulmuş olup, bu pipetler P-97 Mikropipet Çekici (Sutter Instrument) ile çekilmiş ve nihai pipet direnci 2-5 M $\Omega$  olmuştur. Tüm hücre konfigürasyonuna geçiş, ağızla veya 1 ml şırınga kullanılarak negatif basınç uygulanarak yapılmış, tüm hücreye geçiş, seri direncin yaklaşık 10 M $\Omega$ 'ya büyük bir düşüşü ve Cm artışı ile işaretlenmiştir. Kayıtlar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Kayıt protokolü şu şekildedir: Membran potansiyeli -60 mV'ye klemp edildikten sonra 0 mV'ye 300 ms'lik depolarize edici darbeler kullanılmıştır. Akım-voltaj ilişkileri

(IV eğrisi), -60 mV'den +80 mV'ye kadar 10 mV artışlarla depolarize edici basamaklar kullanılarak elde edilmiştir. Test kimyasalı, 0 mV'ye birden fazla depolarize edici basamağa yanıt olarak stabil bir dışa akım elde edildikten sonra uygulanmıştır (Molleman, 2003; Ozcan ve Ayar, 2012).

Akımlar, Entegre Patch Amplifikatörünün (IPA) headstage versiyonu ve Windows® 10'a kurulu SutterPatch® Veri Toplama ve Analiz Yazılımı (SutterPatch 2.0.4) kullanılarak voltaj-klomp modunda kaydedilmiştir. Veriler, IPA'nın yerleşik filtresi kullanılarak 5 kHz'de filtrelenmiş ve 25 kHz'de örneklenmiştir. Elektrot kompanzasyonu ve seri direnç kompanzasyonu, yazılımın otomatik kompanzasyon seçeneği kullanılarak otomatik olarak uygulanmıştır. Veriler, SutterPatch Veri Toplama ve Analiz Yazılımı ile OriginPro yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

Deneylerde kullanılan elektrofizyolojik teçhizatın resmi Şekil 3.8'de gösterilmektedir.



Şekil 3.8. Yama kenetleme düzeneği

### 3.6. İstatistiksel Analiz

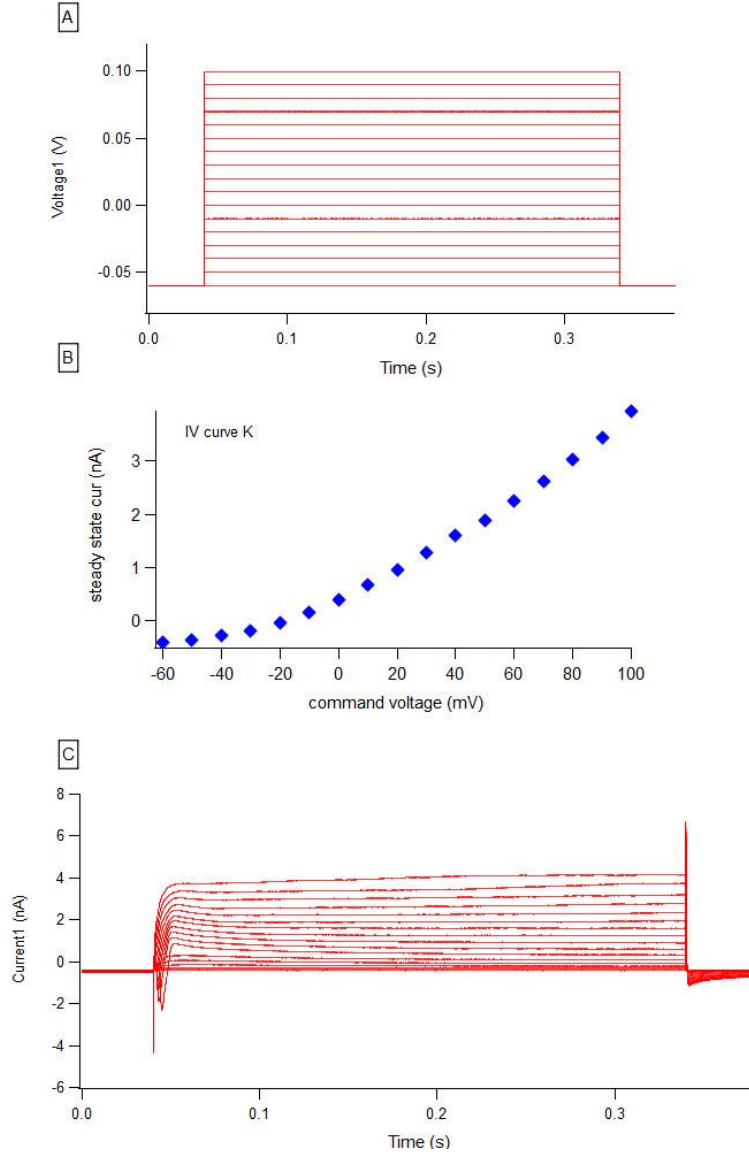
İstatistiksel analizler, GraphPad Prism 9 ve Origin 2022 programları kullanılarak yapılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde eşleştirilmiş student-t testi kullanılmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M. olarak verilmiştir.  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edilmiştir.



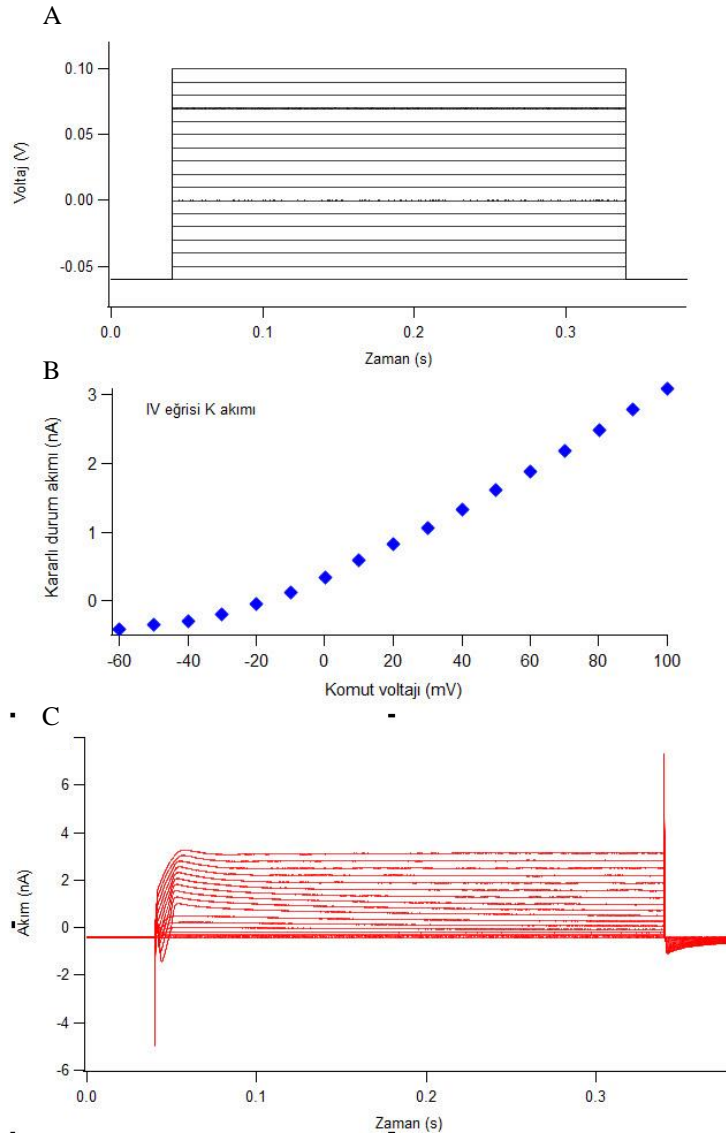
## 4. BULGULAR

### 4.1. Kontrol ve Test Kayıtlarının Örnekleri

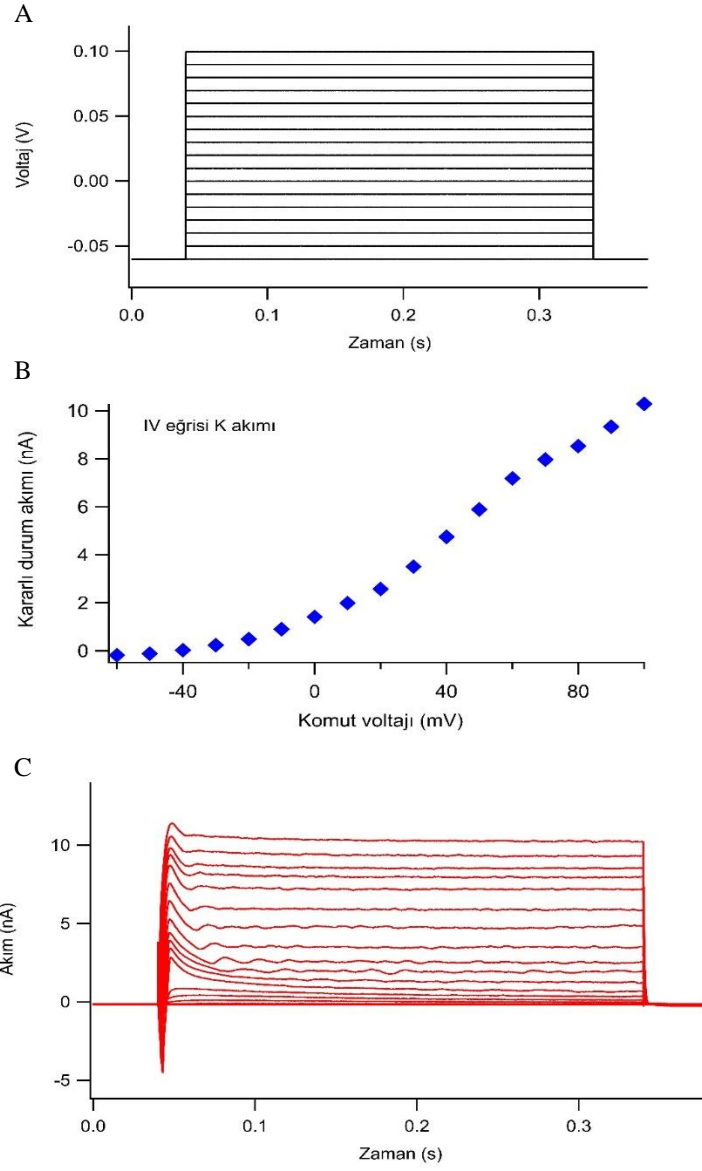
Şekil 4.1 ve Şekil 4.3'te kontrol, Şekil 4.2 ve Şekil 4.4'te p-kumarik asidin test edildiği deneklerden örnek kayıtların görselleri bulunmaktadır. Voltaj değerleri volt (V), akım değerleri nano amper (nA) cinsinden verilmiştir.



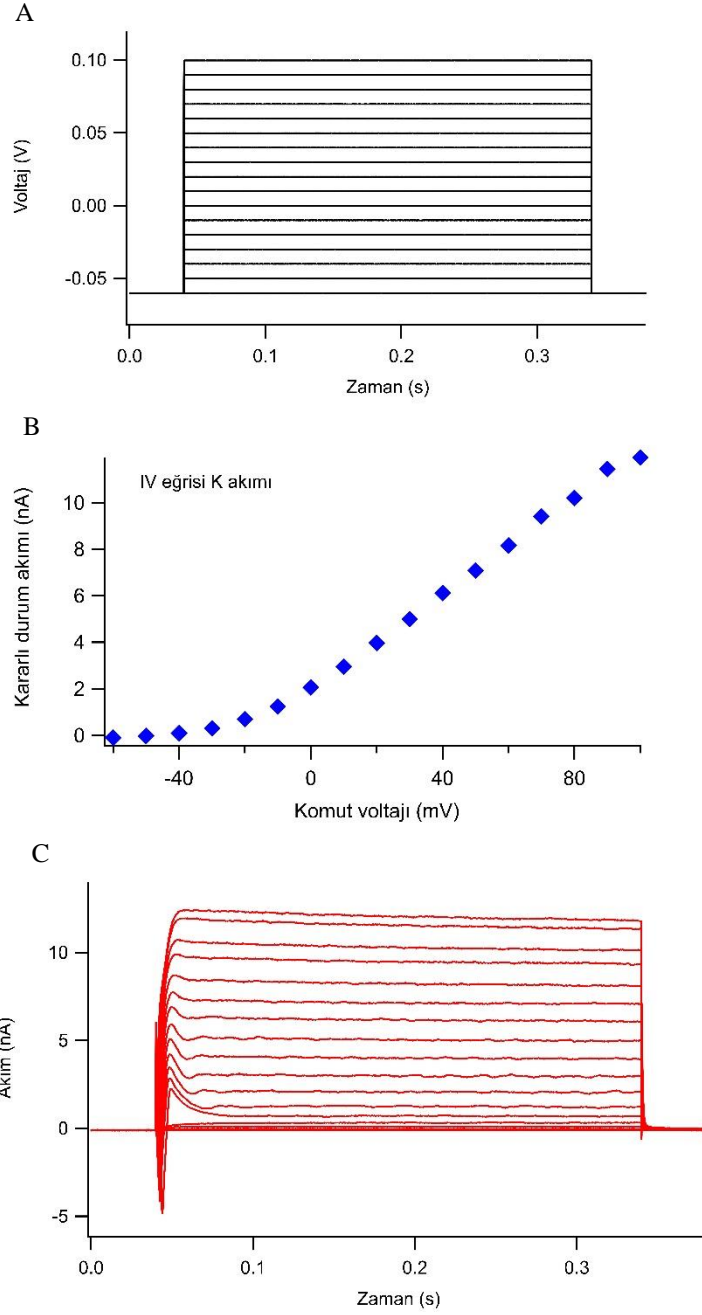
**Şekil 4.1.** Primer DRG nöronlarında  $K^+$  akımı ölçümleri ilişkili  $100 \mu M$  p-kumarik asit uygulaması yapılan hücrelerden uygulama öncesi alınan kontrol kayıtlarından elde edilen örnek sonuç: (A) uygulanan protokol, (B) protokol uygulaması sonrası komut voltajlarına kararlı durum akım cevapları, (C) protokol uygulaması kapsamında akım grafiği.



**Şekil 4.2.** Primer DRG nöronlarında  $K^+$  akımı ölçümleri ilişkili  $100 \mu M$  p-kumarik asit uygulamasının etkilerini gösteren kayıtlarından elde edilen örnek sonuç: (A) uygulanan protokol, (B) protokol uygulaması sonrası komut voltajlarına kararlı durum akım cevapları, (C) protokol uygulaması kapsamında akım grafiği



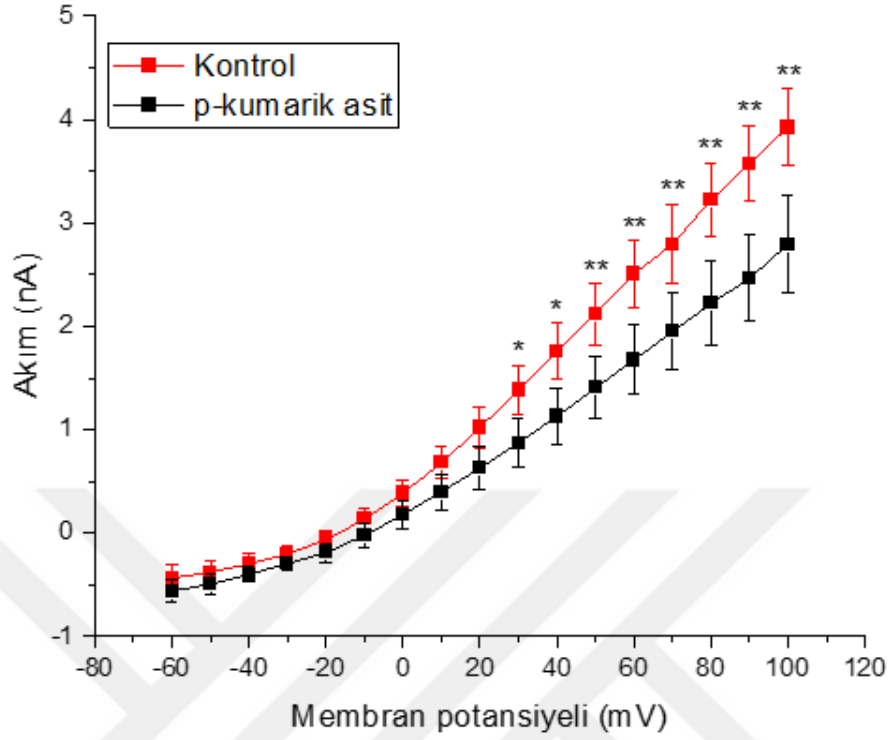
**Şekil 4.3.** Primer DRG nöronlarında  $K^+$  akımı ölçümleri ilişkili  $10 \mu M$  p-kumarik asit uygulaması yapılan hücrelerden uygulama öncesi alınan kontrol kayıtlarından elde edilen örnek sonuç: (A) uygulanan protokol, (B) protokol uygulaması sonrası komut voltajlarına kararlı durum akım cevapları, (C) protokol uygulaması kapsamında akım grafiği.



**Şekil 4.4.** Primer DRG nöronlarında  $K^+$  akımı ölçümleri ilişkili  $10 \mu M$  p-kumarik asit uygulamasının etkilerini gösteren kayıtlardan elde edilen örnek sonuçlar: (A) uygulanan protokol, (B) protokol uygulaması sonrası komut voltajlarına kararlı durum akım cevapları, (C) protokol uygulaması kapsamında akım grafiği

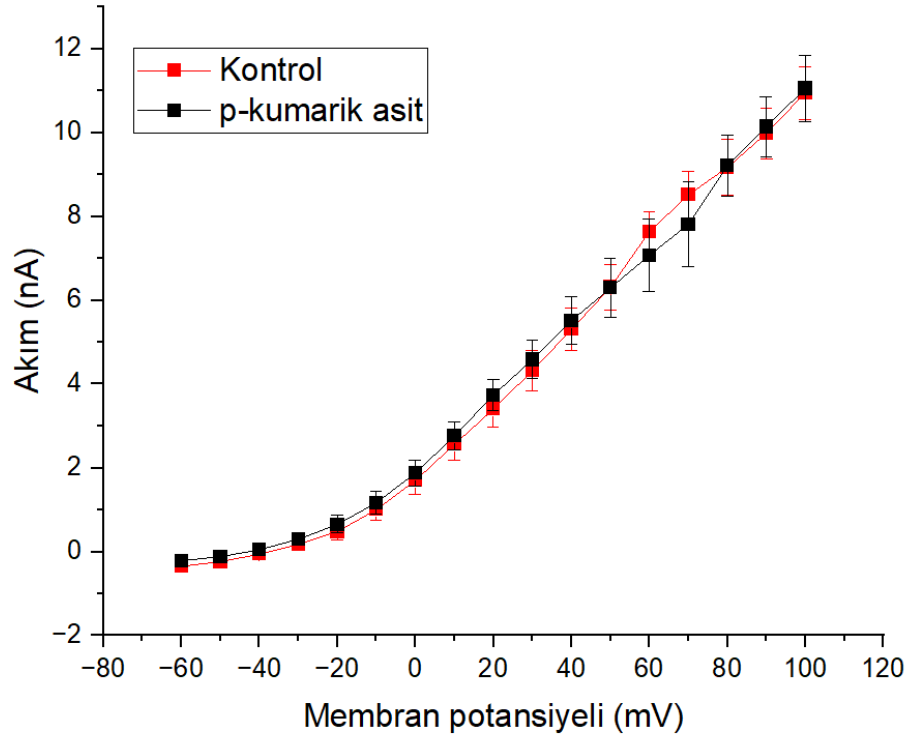
#### 4.2. p-Kumarik Asit Uygulaması Sonrası Akım-Voltaj Grafiği

p-Kumarik asit uygulamasının tüm hücre konfigürasyonunda voltaj klamp modunda  $K^+$  akımı üzerine etkileri Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.



**Şekil 4.5.**  $K^+$  akımı üzerine  $100 \mu M$  p-kumarik asidin etkilerinin akım voltaj eğrisi üzerinde gösterilmesi. p-kumarik asit uygulaması öncesi (kontrol) ve sonrası (p-kumarik asit).  $p^* < 0.05$ ,  $p^{**} < 0.01$ , istatistiksel analiz eşleştirilmiş student's t-testi ve ortalama  $\pm$  S.E.M. değerleri kullanılarak uygulanmıştır ( $n = 5$ ).

$100 \mu M$  p-kumarik asit uygulamasının hücrenin uyarıldığı depolarize voltaj aralığında oluşturduğu inhibisyon Şekil 4.5'te gözlenmektedir. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 kapsamında (B) ve (C) bölümleri incelendiğinde, gecikmeli doğrultucu akımda inhibisyon gözlenmektedir.  $10 \mu M$  p-kumarik asit uygulamasında ise aynı hücrelerden alınan kontrol kayıtlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.**  $K^+$  akımı üzerine  $10 \mu M$  p-kumarik asidin etkilerinin akım voltaj eğrisi üzerinde gösterilmesi. p-kumarik asit uygulaması öncesi (kontrol) ve sonrası (p-kumarik asit). İstatiksel analiz eşleştirilmiş student's t-testi ve ortalama  $\pm$  S.E.M. değerleri kullanılarak uygulanmıştır ( $n = 6$ ).

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkisel kökenli bileşikler, farmakolojik araştırmaların en önemli odak noktalarından biri haline gelmiştir. Bu tür bileşikler, biyolojik sistemlerde gösterdikleri etkiler nedeniyle, alternatif tedavi yaklaşımları geliştirilmesi açısından büyük bir potansiyele sahiptir. Özellikle doğal kaynaklı biyoaktif moleküllerin keşfi ve bu moleküllerin farmakolojik etkilerinin aydınlatılması, bilim dünyasında önemli bir yere sahiptir. Bu bağlamda p-kumarik asit, sahip olduğu çeşitli farmakolojik etkiler nedeniyle dikkat çeken bir moleküldür (Tehami vd., 2023). Literatürde antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar gibi etkileri gösterilmiş olan bu molekülün, ağrı gibi kompleks biyolojik süreçler üzerindeki potansiyel etkileri ise henüz yeterince araştırılmamıştır. Bu eksikliğin giderilmesi, ileri araştırmalarla desteklenmesi ve p-kumarik asidin klinik kullanımlarının araştırılması, bu molekülün farmakolojik bir ajan olarak değerlendirilmesinde önemli bir adım olacaktır.

p-Kumarik asidin anti-inflamatuvar ve analjezik etkileri üzerine yapılan araştırmalar, bu bileşiğin potansiyel terapötik faydalarını ortaya koymaktadır. Hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerle, p-kumarik asidin farelerde formalin testi ve asetik asit ile indüklenen kıvrınma gibi ağrı modellerinde ağrı tepkilerini belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir (Guilherme ve ark., 2022). Analjezik etkinliğinin, özellikle inflamatuvar mediatörlerle etkileşime girerek ağrı yollarını düzenleyebileceği öne sürülmektedir. Elde edilen veriler, p-kumarik asidin nosiseptif yollar üzerinde periferel modülasyon yoluyla analjezik etki gösterebileceğini işaret etmektedir. DRG'lerin ağrı iletimini periferden santrale sağladığı göz önünde bulundurulduğunda, p-kumarik asidin etkinliğinin DRG nöronları üzerinde değerlendirilmesi daha çok anlam kazanmaktadır. Primer DRG nöron kültür ile elektrofizyolojik açıdan nöronların uyarılabilirliği üzerine etkilerin araştırılması ise, prelinik alanda önemli sonuçlar ortaya koyar niteliktedir.

p-Kumarik asidin anti-inflamatuvar özellikleri, lipopolisakkaritler ve D-galaktozamin ile indüklenen akut karaciğer hasarı modellerinde de dikkat çekmiştir (Mehdi ve ark., 2022). p-Kumarik asidin uygulanması, TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar belirteçlerde anlamlı bir azalma sağlarken, karaciğer fonksiyon parametrelerinde iyileşme gözlemlenmiştir. Bu bulgular, inflamasyonu azaltarak karaciğer hasarına bağlı ağrıyı hafifletme potansiyeline işaret etmektedir.

Ayrıca, iskemi-reperfüzyon hasarına karşı p-kumarik asidin etkileri incelenmiş ve bu bileşiğin malondialdehit seviyelerini düşürdüğü, antioksidan enzim aktivitesini

artırdığı saptanmıştır (Godarsi ve ark., 2020). Oksidatif stresin ve inflamasyonun azalması, p-kumarik asidin iskemik koşullara bağlı ağrının hafifletilmesinde dolaylı bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

p-Kumarik asit, Parkinson hastalığı bağlamında önemli nöroprotektif özellikler gösteren bir fenolik asit olarak dikkat çekmektedir. Özellikle, 5-S-sisteinil-dopamin ile indüklenen nörotoksositeye karşı *in vitro* ortamda sağladığı koruyucu etki, bu bileşiğin nörolojik sağlık üzerindeki potansiyelini ortaya koymaktadır. Literatürden elde edilen bulgular p-kumarik asidin, flavonoidlerle benzer şekilde nöroprotektif etkilere sahip olabileceğini ve bu durumun Parkinson hastalığının ilerlemesini etkileyebileceğini göstermektedir (Vauzour ve ark., 2010). Dolayısıyla, p-kumarik asidin nörolojik hasarı azaltma yeteneği, ağrı iletimini içeren süreçler dahil sinir sistemi ilişkili bozukluklara yönelik yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından önemli bir araştırma alanı sunmaktadır. P-Kumarik asidin etkilerinin ileri çalışmalar ile nöropatik ağrı durumlarında incelenmesi, literatüre etkili raporlar sunulmasını sağlayacaktır.

Literatürde önceki çalışmalarda p-kumarik asit, *in vivo* ortamda immünomodülatör ve anti-inflamatuar özellikleri açısından değerlendirilmiştir (Pragasam ve ark., 2013). p-Kumarik asidin immünomodülatör etkisi, sıçanlarda hücre aracılı bağışıklık yanıtlarını (gecikmiş tip aşırı duyarlılık tepkimesi), serum immüoglobulin seviyelerini ve makrofaj fagositik indeksini değerlendirerek incelenmiştir. Aynı zamanda, p-kumarik asidin anti-inflamatuar etkileri, adjuvanla indüklenen artritli sıçanların sinovyal dokusundaki tümör nekroz faktörü (TNF- $\alpha$ ) ekspresyonunu immünofloresans konfokal mikroskopisi ile ve serumda dolaşan immün kompleksleri inceleyerek araştırılmıştır. p-Kumarik asit, adjuvanla indüklenen artritli sıçanlarda inflammatuar medyatör TNF- $\alpha$  ekspresyonunu ve dolaşan immün kompleksleri azaltarak belirgin anti-inflamatuar etkiler göstermiştir. Sonuçlar, p-kumarik asidin romatoid artrit gibi otoimmün inflammatuar hastalıkların tedavisinde potansiyel bir immünosüpresif ajan olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Anti-inflamatuar etkinliği ile dikkat çeken bu molekülün inflamasyon kaynaklı ağrı durumlarında değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

p-Kumarik asidin adjuvanla indüklenen artrit sıçan modelindeki temel mekanizmasınının aratırıldığı bir çalışmada, artritli sıçanlarda pençe ödemi, vücut ağırlığı kaybı ve serum ile ayak bileği eklemesindeki inflammatuar sitokin ve kemokin seviyelerini (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve MCP-1) belirgin bir şekilde baskıladığı tespit edilmiştir. Ayrıca,

p-kumarik asit osteoklastojenik faktörlerin (RANKL ve TRAP), pro-inflamatuar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-17) ve inflamatuvar enzimlerin (iNOS ve COX-2) ekspresyonunu da azaltmıştır. Ayrıca, p-kumarik asit ile tedavi edilen artritli sıçanlarda transkripsiyon faktörlerinin (NF- $\kappa$ B-p65, p-NF- $\kappa$ B-p65, NFATc-1 ve c-Fos) ve MAP kinazlarının (JNK, p-JNK ve ERK1/2) ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. p-Kumarik asidin kemik yıkımını ve kırıkta bozulmasını inhibe ettiği, aynı zamanda kemik mineral yoğunluğunun arttırdığı rapor edilmiştir (Neog ve ark., 2017). Bir araya getirildiğinde, bu bulgular p-kumarik asidin umut verici bir anti-artritik etki gösterdiğini ve romatoid artrit tedavisinde alternatif bir ilaç olarak yararlı olabileceğini önermektedir.

p-Kumarik asidin antidiabetik ve antihiperlipidemik mekanizmaları, yetişkin erkek albinoların Wistar sıçanları üzerinde karbonhidrat, lipid ve lipoprotein tepkimeleri üzerindeki etkileri aracılığıyla değerlendirilmiştir (Amalan ve ark., 2016). Bahsi geçen çalışmada sıçanlara deneysel diyabet mellitusun indüksiyonu için intraperitoneal olarak 30 gün boyunca streptozotocin (STZ, 40 mg/kg b.w.) enjekte edilmiştir. Diyabetik sıçanlar, p-kumarik asit (100 mg/kg b.w.) ile oral olarak tedavi edilmiştir. p-Kumarik asidin diyabetik sıçanlar üzerindeki potansiyel koruyucu etkisi, çeşitli biyokimyasal parametreler ve pankreastaki glukoz taşıyıcılarının (GLUT2 mRNA ekspresyonu gibi) değerlendirilmesi ile incelenmiştir. p-Kumarik asidin uygulanması, kan glukoz seviyelerini belirgin bir şekilde düşürürken, glukoneogenezi etkileyen enzimler (glukoz-6-fosfataz ve fruktoz-1,6-bisfosfataz) üzerinde de azalmaya yol açmakta, bunun yanı sıra heksokinaz, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz ve GSH aktivitelerini artırarak insülin seviyelerini yükseltmektedir. p-Kumarik asit, hem plazmada hem de karaciğer ve böbrek gibi dokularda toplam kolesterol ve trigliserid seviyelerini düşürmektedir. Ayrıca, p-kumarik asit LDL-C ve VLDL-C seviyelerini azaltırken, HDL-C seviyelerini önemli ölçüde artırmaktadır. p-Kumarik asit tedavi gruplarında pankreasta GLUT 2 mRNA ekspresyonunun belirgin bir şekilde azaldığı kaydedilmiştir. Bir araya getirildiğinde, bu sonuçlar p-kumarik asidin pankreasta GLUT 2 aktivasyonu aracılığıyla glukoz ve lipid metabolizmasını modüle ettiğini ve metabolik bozuklukların iyileştirilmesi veya tedavi edilmesinde potansiyel faydalı etkileri olduğunu önermektedir. Bahsi geçen bulgular ışığında p-kumarik asit, diyabetik nöropatik ağrıda da umut vaadeden bir molekül olarak karşımıza çıkmaktadır.

Sonuç olarak, p-kumarik asidin analjezik, nöroprotektif ve anti-inflamatuvar özellikleri dahil olmak üzere pek çok farmakolojik olası etkileri üzerine yapılan bu

araştırmalar, bu molekülün ağrı yönetiminde önemli bir terapötik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bu etkilerin altında yatan mekanizmaların daha kapsamlı bir şekilde aydınlatılması, p-kumarik asidin klinik uygulamalarda etkin kullanımının yolunu açabilir.

Bu tez çalışması kapsamında, primer DRG nöron kültürleri üzerinde p-kumarik asidin olası etkileri araştırılmıştır. DRG nöronları, ağrı sinyallerinin iletiminde kilit rol oynayan nöronlardır ve bu hücreler üzerindeki farmakolojik etkilerin incelenmesi, ağrı tedavilerine yönelik yeni yaklaşımlar geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Peeraer vd., 2011). Çalışmamızda, patch clamp yöntemi kullanılarak  $K^+$  akımları üzerinde p-kumarik asidin, DRG nöronları üzerine etkileri değerlendirilmiştir.  $K^+$  akımları, nöronların aksiyon potansiyeli oluşturma sürecinde düzenleyici bir rol oynar ve nöronal uyarılabilirliği büyük ölçüde etkiler.  $K^+$  akımlarını hedef alan farmakolojik yaklaşımlar, literatürde de desteklenen bir yöntemdir (Du ve Gamper, 2013).

Çalışmamızda, p-kumarik asidin 100  $\mu M$  dozda uygulandığı DRG nöronlarında, membran potansiyeli ile gecikmeli doğrultucu  $K^+$  akım amplitüdüleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafiksel analizde (Şekil 4.5 ve 4.6),  $K^+$  akım yoğunluklarında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu azalma, p-kumarik asidin gecikmeli doğrultucu  $K^+$  akımları üzerinde potansiyel bir düzenleyici etkisi olduğunu göstermektedir. 10  $\mu M$  dozda ise bu etki gözlemlenmemiştir. Yama kelepçe tekniği ile yapılan ölçümlerde, test edilen bileşiklerin doz aralığının 1-100  $\mu M$  arasında olması, biyolojik etkilerin fizyolojik dozlarda incelenmesi açısından önemlidir. Daha düşük dozlarda anlamlı bir etki gözlenmediği için bu aralığın dışına çıkılmamıştır.

Teorik olarak,  $K^+$  akımlarının inhibisyonu, aksiyon potansiyelinin çeşitli fazlarında uzamaya neden olabilir ve bu durum, aksiyon potansiyelinin oluşma ihtimalini azaltıcı bir etki yaratabilir (Du ve Gamper, 2013). Literatürde bu görüşü destekleyen raporlar mevcuttur. Aksiyon potansiyeli iletimi, sinir liflerinde ifade edilen voltaj bağımlı  $Na^+$  ve  $K^+$  kanallarının aktivasyonu ile üretilmektedir. Bu nedenle, bir sinir lifinin belirli bir noktasına uygulanan membran depolarizasyonunu indükleyen bir uyarı, bir  $Na^+$  kanalını açarak, hücre zarındaki konsantrasyon ve potansiyel gradyanına bağılı olarak hücre içine  $Na^+$  iyonunun girmesine neden olur. Bu durum, kendini yenileyen bir şekilde aksiyon potansiyeli üretimi ile sonuçlanır ve bu da, yanındaki noktada diğer  $Na^+$  kanallarının açılmasına neden olan dışı doğru bir akım, yani membran depolarizasyonu oluşturur. Böyle bir aksiyon potansiyeli üretimi, ardışık  $Na^+$  kanalının inaktivasyonu ve

$K^+$  kanalının açılması ile baskılanır. Bu durumda  $K^+$  kanalının inhibisyonu ile aksiyon potansiyeli oluşumunun sonlanması uzatılmış olur ve yeni aksiyon potansiyeli oluşumu sekteye uğrar. Bir sinir lifleri demetinden kaydedilen bileşik aksiyon potansiyeli, analjeziklerin sinir aksiyon potansiyeli iletimini etkileyip etkilemediğini anlamak için bir kılavuz niteliğindedir. Bileşik aksiyon potansiyelinin yarı zirve süresi, zirve amplitüdünde herhangi bir değişiklik olmaksızın voltaj bağımlı gecikmeli doğrultucu  $K^+$  kanalı inhibitörü olan tetraetilamonyum ile artırılmıştır; bu durum  $K^+$  kanallarının birleşik aksiyon potansiyeli üretiminde yer aldığını göstermektedir. Bu sonuç, birleşik aksiyon potansiyeli zirve amplitüplerinde hem  $Na^+$  kanallarının hem de  $K^+$  kanallarının rol oynaması gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir. Opioidler, voltaj bağımlı  $Na^+$  ve  $K^+$  kanalları dahil olmak üzere membran proteinleri üzerinde etki gösterir. Morfin, kurbağa siyatik sinirindeki tek miyelinli liflerden kaydedilen zirve  $Na^+$  kanal akımlarını ve durağan durum  $K^+$  kanal akımlarını inhibe ederek AP'lerin uzamasına neden olmuştur. Morfinin hücre içine uygulanması, kalamar dev aksonlarındaki voltaj bağımlı  $Na^+$  ve  $K^+$  kanal akım amplitüplerinin azalmasına yol açmıştır. Lokal anestezipler, hem voltaj bağımlı  $Na^+$  hem de  $K^+$  kanallarını inhibe eder. Bu inhibisyon nedeniyle, lokal anesteziplerin, hayvanlar ve insanlar üzerindeki sinir aksiyon potansiyeli iletimini baskılamak amacıyla nöropatik ağrıyı hafifletmek için kullanıldığı görülmektedir; bununla birlikte, analjeziye nörotransmitter reseptörleri, toll-like reseptörleri ve TRP kanallarının modülasyonu gibi diğer etkilerin de dahil olabileceği mümkündür. *Xenopus laevis* kurbağasında siyatik sinir liflerindeki voltaj bağımlı  $K^+$  kanalları bupivakain ile de baskılanmıştır. Kokain de merkezi salyangoz nöronlarındaki gecikmeli doğrultucu  $K^+$  kanallarını inhibe etmiştir. Voltaj bağımlı  $K^+$  kanal akım amplitüpleri lokal anesteziplerle tetrakain ile azalmaktadır.  $\alpha 2$ -adrenoreseptör agonistleri tarafından indüklenen birleşik aksiyon potansiyeli inhibisyonunun, aksiyon potansiyeli üretiminde yer alan voltaj bağımlı  $Na^+$  ve  $K^+$  kanallarının baskılanması yoluyla aracılık edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, nöroblastoma hibritom hücre hattında gecikmeli doğrultucu  $K^+$  kanal akımlarının zirve amplitüplerinin, sempatolitik analjezik ilaç olan dexmedetomidin tarafından azaltıldığı gösterilmiştir (Kumamoto, 2022).

Orta ila orta şiddetli ağrıyı tedavi etmek için kullanılan bir opioid ağrı kesici olan tramadol ile gerçekleştirilen bir çalışmada, tramadol kaynaklı birleşik aksiyon potansiyeli inhibisyonunun, bu ilacın aksiyon potansiyeli oluşumunda rol oynayan voltaj bağımlı  $Na^+$  ve  $K^+$  kanallarını baskılaması yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Tramadol, DRG

nöroblastoma hibritom hücre hattında  $\text{Na}^+$  kanallarının akım amplitüdlerini konsantrasyon bağımlı olarak baskılamıştır. Benzer bir azalma, Nav1.2 kanallarını ifade eden sıçan HEK293 hücrelerinde de gözlemlenmiştir. Bu değerler, kurbağa siyatik sinirinde kompleks aksiyon potansiyellerinin inhibisyonu için belirlenen  $\text{IC}_{50}$  değeri olan 2.3 mM'den daha düşük bulunmuştur. Tramadol ayrıca fare nöroblastomu ve sıçan gliyomasının hibrit hücre hattı hücrelerinde bulunan gecikmeli doğrultucu  $\text{K}^+$  kanallarının (Kv3.1a tipi) akım amplitüdünü de azaltmıştır. Bu aktivitenin  $\text{IC}_{50}$  değeri 0.025 mM olarak belirlenmiş olup, literatürde daha önce belirtilen 2.3 mM değerinden oldukça küçüktür. Tramadolun kompleks aksiyon potansiyellerini baskılama yollarından birinin  $\text{K}^+$  akımındaki azaltıcı etkisi olduğu ileri sürülmüştür (Kumamoto, 2022).

Çalışmamızda gözlemlenen  $\text{K}^+$  akımındaki azalma, p-kumarik asitin farmakolojik etki profili çerçevesinde, nöronal uyarılabilirliği azaltabilecek bir mekanizmaya işaret etmektedir. p-Kumarik asidin DRG nöronlarında  $\text{K}^+$  akım yoğunluklarını azaltarak ağrı ile ilişkili süreçler üzerindeki potansiyel etkilerinin araştırılması, ağrı tedavisinde yeni hedeflerin belirlenmesi açısından önemli bulgular sunmaktadır.

Bu tez çalışmasının sonuçları, p-kumarik asidin ağrı ile ilişkili nöronal uyarılabilirlik üzerinde düzenleyici bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Ancak bu etkinin hangi  $\text{K}^+$  kanal alt tipleri aracılığı ile gerçekleştiği henüz net olarak bilinmemektedir. Gelecekte yapılacak çalışmalar, bu etkilerin kanal blokörleri ile daha detaylı incelenmesi ve kullanılan farmakolojik ajanların spesifik reseptör ya da kanallara etkilerinin araştırılması yönünde planlanmıştır. Özellikle PCR yöntemi ile desteklenebilecek bu çalışmalar,  $\text{K}^+$  kanalları dışında  $\text{Ca}^{+2}$  kanallarının da incelenmesini içerebilir. Ayrıca, mevcut ağrı tedavilerinin etkinliğini artırmak amacıyla  $\text{K}^+$  kanal disfonksiyonunu hedef alan farmakolojik müdahalelerin araştırılması, bu molekülün klinik potansiyelini daha iyi anlamamıza katkı sağlayacaktır.

## KAYNAKÇA

- Abd-Elseyed, A., Vardhan, S., Aggarwal, A., Vardhan, M. and Diwan, S. A. (2024). Mechanisms of action of dorsal root ganglion stimulation. *Uluslararası J. Mol. Bilim*, 25(7), 3591.
- Ahimsadasan, N., Reddy, V., MZ, K. S. and Kumar, A. (2018). *Nöroanatomi, dorsal kök ganglionu*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Ahmadzada, T. (2022). *Diyabetik nöropati modelinde levetirasetamın etkilerinin Patch clamp yöntemi ile incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Amalan, V., Vijayakumar, N., Indumathi, D., and Ramakrishnan, A. (2016). Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of p-coumaric acid in diabetic rats, role of pancreatic GLUT 2: In vivo approach. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 230-236.
- Aydın, O. N. (2002). Ağrı ve ağrı mekanizmalarına güncel bakış. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 3(2), 37-48.
- Bhandari, R., Sharma, A. and Kuhad, A. (2022). Novel nanotechnological approaches for targeting dorsal root ganglion (DRG) in mitigating diabetic neuropathic pain (DNP). *Frontiers in Endocrinology*, 12, Article 790747.
- Bharti, A., Kaur, J., Kumar, A., Singh, S. and Kumar, D. (2021). Efficacy of p-coumaric acid in chronic constriction injury induced neuropathic pain in rats. *Indian Drugs*, 58(9), 52–58.
- Chi, Y.-M., Nakamura, M., Yoshizawa, T., Zhao, X.-Y., Yan, W.-M., Hashimoto, F., Kinjo, J., Nohara, T. and Sakurada, S. (2005). Anti-inflammatory activities of .alpha.-truxillic acid derivatives and their monomer components. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(9), 1776–1778.
- Cummins, T. R., Rush, A. M., Estacion, M., Dib-Hajj, S. D. and Waxman, S. G. (2009). Voltage clamp and current clamp recordings from mammalian DRG neurons. *Nat. Protoc.*, 4(8), 1103–1112.
- De Luca, A. C., Faroni, A. and Reid, A. J. (2015). Dorsal root ganglia neurons and differentiated adipose-derived stem cells: An in vitro co-culture model to study peripheral nerve regeneration. *Journal of Visualized Experiments*, 96(96), 525–543.
- Dima, C., Assadpour, E., Dima, S. and Jafari, S. M. (2020). Bioavailability and bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by in vitro methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 2862–2884.
- Du, X. and Gamper, N. (2013). Potassium channels in peripheral pain pathways: expression, function and therapeutic potential. *Current neuropharmacology*, 11(6), 621-640.

- Duque, A.P. do N., Pinto, N. de C.C., Mendes, R. de F., da Silva, J.M., Aragão, D.M. de O., Castañon, M.C.M.N., and Scio, E. (2016). In vivo wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68 (1), 128–138.
- Düzgün Ergün, D. ve Dursun, Ş. (2018). Patch Clamp yönteminin biyofiziksel prensibi ve tıpta kullanımı. *Tıp Fakültesi Klinikleri*, 1(1), 93-108.
- Erkoçak, A. (1984). *Özel histoloji* (5. basım). İzmir: Ankara Üniversitesi Basım Evi, 247-250.
- Ferreira, P. S., Victorelli, F. D., Fonseca-Santos, B. and Chorilli, M. (2018). A review of analytical methods for p-coumaric acid in plant-based products, beverages, and biological matrices. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 49(1), 21–31.
- Fuzik, J., Zeisel, A., Máté, Z., Calvigioni, D., Yanagawa, Y., Szabó, G., Linnarsson, S. and Harkany, T. (2016). Integration of electrophysiological recordings with single-cell RNA-seq data identifies neuronal subtypes. *Nature biotechnology*, 34(2), 175-183.
- Gardner, L. P. and Hiatt, J. L. (1997). *Color textbook of histology* (2nd ed.). Philadelphia: W.B. Saunders Company, 207-210.
- Guilherme, V. A., Cunha, V. R., de Paula, E., de Araujo, D. R., and Constantino, V. R. (2022). Anti-inflammatory and analgesic evaluation of a phytochemical intercalated into layered double hydroxide. *Pharmaceutics*, 14(5), 934.
- Godarzi, S. M., Gorji, A. V., Gholizadeh, B., Mard, S. A., and Mansouri, E. (2020). Antioxidant effect of p-coumaric acid on interleukin 1- $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in rats with renal ischemic reperfusion. *Nefrologia*, 40(3), 311-319.
- Gonzalez, M. M., Lewallen, C. F., Yip, M. C. and Forest, C. R. (2021). Machine learning-based pipette positional correction for automatic patch clamp in vitro. *Eneuro*, 8(4).
- Haberberger, R. V., Kuramatilake, J., Barry, C. M. and Matusica, D. (2023). Ultrastructure of dorsal root ganglia. *Cell and Tissue Research*, 393(1), 17–36.
- Heinrich, T., Hübner, C. and Kurth, I. (2016). Isolation and primary cell culture of mouse dorsal root ganglion neurons. *Bio. Protoc.*, 6(7), 36–50.
- Hu, H., Gan, J., and Jonas, P. (2014). Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science*, 345(6196), 1255263.
- Hu, X., Yang, Z., Liu, W., Pan, Z., Zhang, X., Li, M., Liu, X., Zheng, Q. and Li, D. (2020). The anti-tumor effects of p-coumaric acid on melanoma A375 and B16 cells. *Frontiers in Oncology*, 10, Article 558414.
- Jaganathan, S. K. (2013). Events associated with apoptotic effect of p-coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 19(43), 7726.

- Janicke, B., Önning, G. and Oredsson, S. M. (2005). Differential effects of ferulic acid and p-coumaric acid on S phase distribution and length of S phase in the human colonic cell line Caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6658–6665.
- Karabulut, G. and Yemiş, O. (2019). Bound forms of phenolic compounds and their bioavailability. *Akademik Gıda*, 17(4), 526–537.
- Kim, W., Chung, Y., Choi, S., Min, B.-I. and Kim, S. K. (2017). Duloxetine protects against oxaliplatin-induced neuropathic pain and spinal neuron hyperexcitability in rodents. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), Article 2626.
- Kishida, K. and Matsumoto, H. (2019). Urinary excretion rate and bioavailability of chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, and ferulic acid in non-fasted rats maintained under physiological conditions. *Heliyon*, 5(10), Article e02708.
- Kolaç, T., Gürbüz, P. ve Yetiş, G. (2017). Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, 5(1), 26-42.
- Kong, F., Li, X., Jiao, R. and Sun, C. (2021). Study on the temperature characteristics of fast capacitance in patch clamp experiments. *Sheng wu yi xue Gong Cheng xue za zhi= Journal of Biomedical Engineering= Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi*, 38(4), 695-702.
- Konishi, Y., Kobayashi, S. and Shimizu, M. (2003). Transepithelial transport of p-coumaric acid and gallic acid in Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(11), 2317–2324.
- Konishi, Y., Zhao, Z. and Shimizu, M. (2006). Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7539–7543.
- Kumamoto, E. (2022). Inhibitory Actions of Clinical Analgesics, Analgesic Adjuvants, and Plant-Derived Analgesics on Nerve Action Potential Conduction. *Encyclopedia*, 2(4), 1902-1934.
- Lin, Y. T. and Chen, J. C. (2018). Dorsal root ganglia isolation and primary culture to study neurotransmitter release. *J. Vis. Exp.*, 1(140), 57–76.
- Lovisolò, D. (2022). Patch clamp: The first four decades of a technique that revolutionized electrophysiology and beyond. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 1–28.
- Mehdi, S., Ahmad, F. U. D., Lodhi, A. H., Khurshid, U., Khalid, A. A., Sidiq, S. S., ... and Baig, M. S. (2022). Protective effects of p-CA against acute liver damage induced by LPS/D-GalN in wistar albino rats. *Drug Design, Development and Therapy*, 3327-3342.

- Molleman, A. (2003). Whole-cell protocols and data analysis. In A. Molleman (Ed.), *Patch clamping: An introductory guide to patch clamp electrophysiology* (pp. 115–139). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Mozaffari Godarzi, S., Valizade Gorji, A., Gholizadeh, B., Mard, S. A. and Mansouri, E. (2020). Antioxidant effect of p-coumaric acid on interleukin 1- $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in rats with renal ischemic reperfusion. *Nefrologia*, 40(3), 311–319.
- Neog, M. K., Joshua Pragasam, S., Krishnan, M., and Rasool, M. (2017). p-Coumaric acid, a dietary polyphenol ameliorates inflammation and curtails cartilage and bone erosion in the rheumatoid arthritis rat model. *BioFactors*, 43(5), 698-717.
- Onat, K. A., Kürkçü, M. S. ve Çöl, B. (2021). Fenolik bileşiklerden sinnamik asit, kafeik asit ve p-kumarik asit'in bazı biyolojik aktiviteleri. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(4), 2587-2598.
- Ozcan, M. and Ayar, A. (2012). Modulation of action potential and calcium signaling by levetiracetam in rat sensory neurons. *J. Recept. Signal Transduct.*, 32(3), 156–162.
- Peeraer, E., Van Lutsenborg, A., Verheyen, A., De Jongh, R., Nuydens, R., and Meert, T. F. (2011). Pharmacological evaluation of rat dorsal root ganglion neurons as an in vitro model for diabetic neuropathy. *Journal of pain research*, 55-65.
- Pei, K., Ou, J., Huang, J. and Ou, S. (2016). p-Coumaric acid and its conjugates: Dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 2952–2962.
- Pragasam, S. J. and Rasool, M. (2013). Dietary component p-coumaric acid suppresses monosodium urate crystal-induced inflammation in rats. *Inflammation Research*, 62(5), 489–498.
- Pragasam, S. J., Venkatesan, V., and Rasool, M. (2013). Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. *Inflammation*, 36, 169-176.
- Rudrapal, M., Khairnar, S. J., Khan, J., Dukhyil, A. B., Ansari, M. A., Alomary, M. N., Alshabrmi, F. M., Palai, S., Deb, P. K. and Devi, R. (2022). Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: Insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism(s) of action. *Frontiers in Pharmacology*, 13, Article 806470.
- Savrun, F. K. (2017). Ağrıda nörofizyolojik yöntemlerin yeri. *Türkiye Klinikleri Neurology-Special Topics*, 10(4), 339-346.
- Saygın, M., Nazıroğlu, M. ve Çalışkan, S. (2009). Patch clamp'ın elektrofizyolojik uygulamalarında son gelişmeler. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 26(4), 148–152.
- Sleigh, J. N., West, S. J. and Schiavo, G. (2020). A video protocol for rapid dissection of mouse dorsal root ganglia from defined spinal levels. *BMC Res. Notes*, 13(1), 302–311.

- Stuber, G. D., Sparta, D. R., Stamatakis, A. M., van Leeuwen, W. A., Hardjoprajitno, J. E., Cho, S., Tye, K.M., Kempadoo, K.A., Zhang, F., Deisseroth, K. and Bonci, A. (2011). Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. *Nature*, 475(7356), 377-380.
- Tehami, W., Nani, A., Khan, N. A. and Hichami, A. (2023). New insights into the anticancer effects of p-coumaric acid: Focus on colorectal cancer. *Dose-Response*, 21(1), 155932582211507.
- Vauzour, D., Corona, G., and Spencer, J. P. (2010). Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyldopamine induced neurotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 106-111.
- Velioğlu, S. K. (2017). Ağrı anatomisi: Ağrı yolları, beyin sapı ve beyin. *Turkiye Klinikleri Neurology-Special Topics*, 10(4), 329-334.
- Wang, V. C. and Mullally, W. J. (2020). Pain neurology. *The American Journal of Medicine*, 133(3), 273–280.
- Woolf, C. J. (2011). Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, 152(3), S2–S15.
- Yağcı, Ü. ve Saygın, M. (2019). Ağrı fizyopatolojisi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(2), 209–220.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T. and Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21(1), 381-406.
- Yang, F., Zhang, C., Xu, Q., Tiwari, V., He, S.-Q., Wang, Y., Dong, X., Vera-Portocarrero, L. P., Wacnik, P. W., Raja, S. N. and Guan, Y. (2015). Electrical stimulation of dorsal root entry zone attenuates wide-dynamic-range neuronal activity in rats. *Neuromodulation: Technology at the Neural Interface*, 18(1), 33–40.
- Yehia, A. and Wei, H. (2020). Studying nicotinic acetylcholine receptors using the IonFlux™ microfluidic-based automated patch clamp system with continuous perfusion and fast solution exchange. *Current Protocols in Pharmacology*, 88(1), Article e73.
- Zhao, Z. and Moghadasian, M. H. (2009). Bioavailability of hydroxycinnamates: A brief review of in vivo and in vitro studies. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 133–145.
- Zhu, H., Liang, Q., Xiong, X., Wang, Y., Zhang, Z., Sun, M., Lu, X. and Wu, D. (2018). Anti-inflammatory effects of p-coumaric acid, a natural compound of *Oldenlandia diffusa*, on arthritis model rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, Article 5198594.

## EKLER

### EK-1. Etik kurul

T.C. ANADOLU ÜNİVERSİTESİ			
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR FORMU			
Toplantı No: 3 Dosya Kayıt No:24-05 BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	"p-Kumarik Asit'in Olası Analjezik Etkilerinin Değerlendirilmesi"	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI / ADI KURUMU	Dr. Öğr. Üyesi Fezza ALYU ALTINOK Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Ecz.Şenay CAKOVA	
	Hayvan Türü ve Sayısı	Sprague Dawley(Erkek/24)	
DEĞERLENDİRİLEN BELGE	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ ve EKLERİ	Var	
KARAR BİLGİLERİ	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Fezza ALYU ALTINOK'un araştırma yürütücüsü olduğu 24-05 dosya kayıt no'lu ve "p-Kumarik Asit'in Olası Analjezik Etkilerinin Değerlendirilmesi" başlıklı etik kurul proje başvurusu, Deney Hayvanları etik kurul yönergesine uygun bulunarak onaylanmasına karar verilmiştir.		
	KARAR NO: 2024-05	KARAR TARİHİ: 13.03.2024	
ETİK KURUL ÜYELERİ			
ÜNVANI / ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ	BİRİMİ	TOPLANTIYA KATILMA	KARARA KATILMA İMZA
Prof. Dr. Bülent ERGUN BAŞKAN	Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Özgür Devrim CAN ÜYE	Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. A.Tansu KOPARAL ÜYE	Yunus Emre Sağlık Hiz. Meslek Yüksek Okulu	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ ÜYE	Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof.Dr. Ümide DEMİR ÖZKAY ÜYE	Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. M.Sinan KAYNAK ÜYE	Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Dr.Öğr.Üy.Mustafa ESER ÜYE	Deney Hayvanları Arş. Ve Uyg. Birimi	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Vet. Hek. Mustafa SAYIN ÜYE	Serbest	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Av.İsmail KARADANA ÜYE	STK Üyesi	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Anadolu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Sekreterliği, Yunus Emre Kampüsü, 26470 ESKİŞEHİR Tel:+90 222 335 05 80-3798 Faks+90 222 335 36 16, E-Posta hadyekanadolu@gmail.com, Web http://www.anadolu.edu.tr			

## ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Şenay CAKOVA  
Yabancı Dil : İngilizce, Sırpça, Arnavutça  
Doğum Yeri ve Yılı : \*\*\*\*\*  
E-Posta : \*\*\*\*\*

### Eğitim Geçmişi:

- 2005- 2013. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Bölümü, Lisans
- 2018-... Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans

### Mesleki Geçmişi:

- 2014-2022. Mesul Müdür, Özel Koru Ankara Hastanesi
- 2023-2024. Mesul Müdür, Özel Mim Hastanesi