

TC.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ
ANABİLİM DALI

ANTİKANSER İLAÇLARIN OLUŞTURDUĞU NÖROPATİK AĞRI VE
GLUTAMAT TAŞIYICI AKTİVİTE DEĞİŞTİRİCİLERİNİN BU AĞRININ
TEDAVİSİNDEKİ ROLLERİ

Fatih SARUHAN

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Yüksek Lisans Tezi
Erzurum - 2010

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
TABLolar LİSTESİ.....	II
GRAFİKLER LİSTESİ.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VII
KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Glutamat veNörotoksisite.....	2
2.1.1. Eksitator amino asit nörotransmitter “L-glutamat”.....	2
2.1.2. Glutamat sentezi.....	5
2.1.3. Glutamat reseptörleri.....	6
2.1.3.1. AMPA reseptörleri.....	7
2.1.3.2. NMDA reseptörleri.....	9
2.1.3.3. Kainat reseptörleri.....	11
2.1.3.4. Metabotropik reseptörler.....	13
2.1.4. Glutamat ve nörotoksisite.....	14
2.1.5. Glutamat taşıyıcıları.....	16
2.2. Ağrı.....	18
2.2.1. Ağrı reseptörleri ve ağrı yolağı.....	18
2.2.2. Nöropatik ağrı, hiperaljezi ve allodini.....	20
2.2.3. Antikanser ilaçlarla oluşan ağrılı nöropatiler.....	21
2.2.3.1. Paklitaksel ile oluşan nöropati ve nöropatik ağrı sendromu.....	23
2.2.3.2. Paklitaksel ile oluşan nöropatik ağrıda tedavi yaklaşımları.....	24
2.2.3.3. Paklitaksel ile oluşan nöropatik ağrıda alternatif tedavi yaklaşımı.....	25
3. MATERYAL VE METOD.....	27
3.1. Deney hayvanları.....	27
3.2. Kimyasal maddeler.....	27
3.3. Paklitakselle indüklenen nöropatik ağrı modeli.....	27
3.4. İstatistiksel analizler.....	29
4. BULGULAR.....	30
5. TARTIŞMA.....	35
6. KAYNAKLAR.....	43

TABLÖLAR LİSTESİ	Sf.
Tablo 1. Tek kür paklitaksel alan sıçanlarda nöropatik ağrının tespit edilmesi için yapılan test sonuçları.....	30
Tablo 2. İlk paklitaksel enjeksiyonundan sonra 0-96. günler arasında yapılan analjeziyometre test sonuçları.....	32
Tablo 3. Bir ay ara ile toplam iki kez paklitaksel enjeksiyonundan sonra 0-112. günler arasında yapılan analjeziyometre test sonuçları.....	33

ŞEKİLLER LİSTESİ	Sf.
Şekil 1. Glutamat sentezi.....	6
Şekil 2. Nöronal hasar ve/veya ölüme neden olan hücre membranı ve mitokondriyel hasar oluşum kaskadı.....	15
Şekil 3. Ekstraselüler glutamatın nöronlara ve astrositlere geri taşınması.....	17
Şekil 4. Randall selitto analjeziometre test ekipmanı.....	29
Şekil 5. Tek kür paklitaksel alan sıçanlarda nöropatik ağrının tespit edilmesi için yapılan test sonuçları.....	32
Şekil 6. İlk paklitaksel enjeksiyonundan sonraki 0-96. günler arasında yapılan analjeziometre test sonuçları.....	33
Şekil 7. Bir ay ara ile toplam iki kez paklitaksel enjeksiyonundan sonra 0-112. günler arasında yapılan analjeziometre test sonuçları.....	35

TEŞEKKÜR

Tezimin tasarlanması ve yürütülmesinde desteğini bir an olsun esirgemeyen ve tecrübesiyle yol gösteren değerli hocam, Doç. Dr. Ahmet Hacımüftüoğlu'na,

Tez çalışmaları süresince bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilimdalı başkanı saygıdeğer hocam, Prof. Dr. Fatma Göçer; Anabilimdalı öğretim üyeleri kıymetli hocalarım Prof. Dr. Halis Süleyman, Yrd. Doç. Dr. İsmail Kara ve Doç. Dr. Zekai Halıcı'ya,

Tez için yapılan laboratuvar çalışmalarında kıymetli yardımları olan Abdülmecit Albayrak, Damla Çetin, Bahadır Süleyman, Nihal Çetin, Beyzagül Polat, İrfan Çınar ve Berna Öztürk'e ayrıca Farmakoloji AD. bölüm sekreteri Musa Atasever ile bölüm çalışanları Sadık Dikbaş ve Ömer Önder'e,

Tezimin hazırlanmasında desteklerini esirgemeyen Eczacılık Fakültesi Dekanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fatih Akçay ile Dekan yardımcıları Prof. Dr. Yücel Kadioğlu ve Prof. Dr. İnci Gül, Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı eski başkanı Yrd. Doç. Dr. Mine Gülaboğlu ve Farmakoloji Anabilim Dalı başkanı Yrd. Doç. Dr. Elif Çadircı nezdinde bütün Eczacılık Fakültesi öğretim üyeleri ve çalışanlarına müteşekkirim.

Ecz. Fatih Saruhan

Haziran 2010

ÖZET**ANTİKANSER İLAÇLARIN OLUŞTURDUĞU NÖROPATİK AĞRI VE
GLUTAMAT TAŞIYICI AKTİVİTE DEĞİŞTİRİCİLERİNİN BU AĞRININ
TEDAVİSİNDEKİ ROLLERİ**

Paklitaksel solid tümörlerin tedavisinde sıklıkla kullanılan antikanser bir ilaçtır. Ancak ağır seyreden nöropatik ağrı sendromu ve diğer bazı yan etkileri bu ilacın uzun süre ve yüksek dozlarda kullanımını engellemektedir. Bahsedilen nöropatik ağrı sendromunun etiyolojisinin henüz tam olarak saptanamamış ve tedavisi için yeterince etkin bir yöntem geliştirilememiş olması onkologları birçok vakada paklitakselin tedavi dozunu düşürmek veya paklitakselle tedaviyi kesmek zorunda bırakmaktadır.

Bu çalışma, paklitaksel kemoterapisinin etkinliğini artırmak amacıyla doz kısıtlayan nöropatik ağrının tedavisinde glutamat taşıyıcı aktivitesini artıran iki önemli antibakteriyel, penisilin G ve seftriaksonun, paklitakselle oluşturulan bir nöropatik ağrı sendromu modelinde analjezik etkilerinin olup olmadığını araştırmak için tasarlanmış ve yürütülmüştür. Bu amaçla 200-220 g ağırlığında 48 adet Albino Wistar türü erkek sıçan 8 gruba ayrılmış ve Randall Selitto analjeziyometre test aparatı ile bazal ağrı eşikleri tespit edildikten sonra bu gruplardan altısına birer gün ara ile (0, 2, 4, 6. günler) toplam dört kez paklitaksel (2.0 mg/kg) intraperitoneal yoldan zerk edilmiştir. Bir ay sonra bu gruplardan üçüne ikinci kür olarak paklitaksel enjeksiyonları, penisilin G ve seftriaksonun paklitakselin tekrarlayan dozlarındaki analjezik etkinliğini araştırabilmek için tekrarlanmıştır. Bahsedilen nöropatik ağrı 25-30. günlerde en şiddetli hale geldiğinden bu nöropatik ağrıda analjezik tedavi etkinliklerini araştırdığımız penisilin G (400.000 U/kg) ve seftriakson (200 mg/kg) 30. günden itibaren 10'ar gün süre ile 1 mL taşıyıcı içerisinde sıçanlara intraperitoneal yoldan zerk edilmiştir.

Ağrı eşikleri tek kür paklitaksel injeksiyonu sonrası 0, 30 ve 96. günlerde yapılan test sonuçlarında penisilin G, seftriakson ve paklitaksel kontrol gruplarında sırasıyla $9,5\pm3,6$; $18,5\pm7,7$; $32,2\pm29,9$ gram olarak tespit edilmiş ağrı eşikleri β -laktam tedavisinden sonraki 66. günde yine sırasıyla $26,6\pm25,4$; $45,7\pm24,1$; $33,7\pm20,1$ grama yükselmiştir. Bir ay ara ile yapılan iki kür paklitaksel injeksiyonu sonrası yapılan tedavide yine sırasıyla $19,1\pm6,9$; $15\pm3,79$; $16,4\pm3,4$ gram olarak tespit edilmiş ağrı eşiklerinin 66. gün $31,3\pm12$; $31,6\pm1$ ve $22,6\pm7$ grama yükseldiği gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar hem penisilin G hem de seftriaksonun tedaviye başladıktan 66 gün sonra mekanohiperaleziyi anlamlı ölçüde tedavi ettiğini göstermektedir. Ancak sıçanların ağrı eşiği tam olarak paklitaksel uygulamasından önceki değerlere geri dönmemiştir.

Penisilin G ve seftriaksonun paklitakselle indüklenen hiperalezide terapötik etkinliklerinin olduğunu tespit ettiğimiz bu çalışma beta-laktam antibiyotiklerin kemoterapiyle indüklenen nöropatik ağrının yanında amyotrofik lateral skleroz (ALS), Alzheimer, inme ve Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'nde hücre dışında artmış glutamat konsantrasyonlarıyla yakından ilişkilendirilen diğer nörolojik rahatsızlıklarda da faydalı olabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Glutamat, nöropatik ağrı, beta-laktam antibiyotikler, sıçan, allodini, hiperalezi, paklitaksel

SUMMARY**ANTICANCER AGENT INDUCED NEUROPATHIC PAIN AND THE ROLE
OF GLUTAMATE TRANSPORTER ACTIVITY ENHANCERS IN
TREATMENT OF THIS TYPE OF PAIN**

Paclitaxel, an anticancer drug, is the one of the most frequently used chemotherapeutics for the treatment of solid tumours. However, its use is often limited because of the incidence of severe adverse reactions including the neuropathic pain syndrome. Because the ethiology of paclitaxel induced pain syndrome has not been adequately understood yet and, unfortunately, there are no acceptable therapies to prevent this side effect oncologists have to stop paclitaxel therapy or reduce paclitaxel dose in most cases.

To develop a treatment healing aforesaid side effect of paclitaxel and enhance the success of paclitaxel therapy, the present study was undertaken to observe the antinociceptive effects of ceftriaxone and penicillin G, two important glutamate activity enhancers, in an animal model of neuropathic pain induced by paclitaxel. Forty eight adult male Albino Wistar rats (200-220 g) were housed in groups of eight. After baseline measurement of pain sensitivity by Randall Selitto apparatus, six groups of rats were injected intraperitoneally on four alternate days (days 0, 2, 4, and 6) with vehicle or paclitaxel (2,0 mg/kg). One month later, four of them were injected intraperitoneally with vehicle or paclitaxel again to observe if ceftriaxone and penicillin G had antinociceptive effects in repetitive dosage regimens. Because Paclitaxel-evoked hyperalgesia reaches peak severity on 25th–30th days ceftriaxone (200 mg/kg), penicillin G (400.000 U/kg) or distilled water, as vehicle, was administered intraperitoneally once a day in a volume of 1 mL for 10 days.

VIII

Mechanical thresholds measured by Randall Selitto analgesiometer were almost stable at 75 g for intact group of rats. Mechanical thresholds measured on 30th day, for penicillin G, ceftriaxone and paclitaxel control groups were $9,5 \pm 3,6$; $18,5 \pm 7,7$; $32,2 \pm 29,9$ g and on 66th day (after β -lactam therapy) at $26,6 \pm 25,4$; $45,7 \pm 24,1$; $33,7 \pm 20,1$ g respectively. The mechanical thresholds measured after second paclitaxel injection on 30th day were $19,1 \pm 6,9$; $15 \pm 3,79$; $16,4 \pm 3,4$ g and on and 96th day $31,3 \pm 12$; $31,6 \pm 1$ and $22,6 \pm 7$ g respectively. This study showed that penicillin G and ceftriaxone, significantly suppressed mechanohyperalgesia 66th day (after β -lactam therapy) but complete recovery was not observed.

In the present study, we found ceftriaxone and penicillin G have terapotic affects in the treatment of paclitaxel induced hyperalgesia. This findings support the idea that beta-lactam antibiotics may be useful in the treatment of ALS, Alzheimer, stroke and other neurological diseases associated to increased glutamate levels in extracellular area of CNS.

Key words: Glutamate, neuropathic pain, beta-lactam antibiotics, rat, allodynia, hyperalgesia, paclitaxel

KISALTMALAR

AMPA : α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonat

DRG : Dorsal kök ganglionları

EAA : Eksitator amino asitler

GLT-1 : Glutamat taşıyıcısı-1

GLAST: Glutamat-aspartat taşıyıcısı

KA : Kainik asit

MSS : Merkezi sinir sistemi

mGluR : Metabotropik glutamat reseptörleri

iGluR : İyonotropik glutamat reseptörleri

NMDA : N-metil-D-aspartat

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Paklitaksel *Taxus brevifolia* (pasifik porsuk ağacı) isimli bitkiden elde edilen ve mitoz mekiği kontraktıl proteinlerini oluşturan mikrotübülleri stabilize ederek etki gösteren, bitkisel kaynaklı sitostatik bir ilaçtır. Solid tümörlerin (meme kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, over kanseri, Kaposi sarkomu) tedavisinde kullanılan bu ilacın doz kısıtlayan en önemli yan etkisi sebep olduğu nöropati ve bu nöropatiye eşlik eden nöropatik ağrı sendromudur. Bu yan etki çoğu kez hastaya optimum ilaç miktarının optimum süre verilmesini ve dolayısıyla tedavi başarısını engellemektedir. Bahsedilen nöropatinin sebebi kesin olarak bilinmemekle birlikte aksonal taşımadaki bozukluklar ve mitokondriyel disfonksiyonun nöropatinin altında yatan sebep olduğuna dair kanıtlar mevcuttur.

Paklitakselle ilgili yapılan bazı çalışmalarda paklitakselin, hücre dışında yüksek konsantrasyonlara ulaştığında kendine özgü reseptörleri aracılığıyla eksitotoksisteye (aşırı uyarıma bağlı nöronal hasar) neden olan nörotransmitter “glutamat” ı hücre dışından astrositlere ve nöronlara geri taşıyarak bu transmitterin hücre dışı ortamda bahsedilen eksitotoksik konsantrasyonlara ulaşmasını engelleyen glutamat taşıyıcı proteinlerin üretimini azalttığı diğer bazı çalışmalarda ise β -laktam antibiyotiklerin bu taşıyıcı proteinlerin sentezini gen aktivasyonu aracılığı ile artırdığı tespit edilmiştir.

Bizim bu çalışmadaki amacımız yukarıda bahsedildiği gibi glutmat taşıyıcılarının aktivitesini azaltan paklitakselle oluşan nöropatiyi ve nöropatik ağrıyı yine bu taşıyıcıların aktivitesini artıran β -laktam antibiyotiklerle tedavi etmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glutamat ve Nörotoksisite

2.1.1. Eksitatör Amino Asit Nörotransmitter “L-glutamat”

Bugün glutamat hakkında sahip olduğumuz bilgiler sebebiyle bizlere şaşırtıcı gelse de glutamatın beyin dokusunu uyarabildiği 20. yüzyılın ikinci yarısında tespit edilmiş ve ancak 1970’lerde glutamat bir “transmitter adayı” veya “şüpheli transmitter” olarak addedilmiştir. Glutamatın nörokimya camiası tarafından Merkezi Sinir Sistemi (MSS)’nin majör eksitatör nörotransmitteri olarak kabulü ise 1984 yılında Fonnum, F. isimli araştırmacının “Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain” başlığıyla J. Neurochemistry dergisinde yayımlanan makalesiyle gerçekleşmiştir. Muhtemelen 1968 yılında aynı dergide yayınlanmış olan “Potassium effects on ion transport in brain slices” isimli makalesi için çalışmalar yapan Leif Hertz isimli bilimadamı dahi, kültür medyumunda artmış K^+ düzeylerinin beyin kültürlerine önceden yüklenmiş [^{14}C] işaretli glutamatın salgılanmasını artırdığını tespit ettiğinde bir nörotransmitter olan glutamatın depolarizasyon aracılı salgılanmasını gözlemlediğinin farkında değilken¹ bugün glutamatın in-vivo koşullarda hücre dışı konsantrasyonlarını saniye bazında tespit edebilen cihazlarla donatılan tıp dünyası glutamatın fizyolojik ve patolojik etkileri hakkında çok daha fazla bilgiye sahiptir. Şöyle ki günümüzde memeli MSS’indeki eksitatör sinyallerin major medyatörü olarak kabul edilen amino asit L-glutamat, birçok yönden hafıza, öğrenme ve bilişsel aktiviteyi de içeren normal beyin fonksiyonlarıyla²⁻⁴; sinaps eliminasyonu ve indüksiyonunu, hücre migrasyonunu, farklılaşmasını ve ölümünü içeren MSS’nin gelişimiyle; endokrin hücrelerde^{5,6} ve periferik organ ve dokularda sinyal iletimiyle^{1-4,7} ayrıca presinaptik ve postsinaptik reseptörleri aracılığıyla

nosiseptif uyarıların iletimi ve hiperaljezinin oluşmasıyla⁷⁻⁹ yakından ilişkilendirilmektedir.

MSS, serotonin (5-HT) ve dopamin (DA) gibi birçok önemli nörotransmitterin miktarından yaklaşık 1000 kat daha fazla miktarda glutamat (bölgeye bağlı olarak yaklaşık 5-15 mmol / kg'dır ve beyinde toplam miktarı glutamata en yakın olan transmitter madde 1-5 mmol / kg ile aspartattır¹⁰) ihtiva eder ve bu miktarın dağılımı enerji teminindeki değişikliklere son derece hassas dinamik bir denge içinde tutulur. MSS'de bulunan glutamatın büyük kısmı normal koşullarda hücre içinde ve küçük bir kısmı ise hücre dışında bulunur. Hücre dışı ortamdaki glutamatın parçalanmasından sorumlu herhangi bir kimyasal mekanizmanın bulunmadığı, dolayısıyla bu nörotransmitterin hücre dışı etkinliğinin sonlandırılmasının sinaptik aralıktan taşıyıcı mekanizmalar ile uzaklaştırılmasına bağlı olduğu bilinmektedir. Bahsedilen mekanizma Na^+ bağımlı ve yüksek afiniteli bir geri taşıma mekanizmasıdır ve nöron ve astrositlerden hücre dışı ortama sızan glutamat sürekli olarak bu taşıyıcı mekanizma sayesinde hızla nöronlara ve astrositlere geri taşınmaktadır^{7,10,11}. Şöyle ki 1992 yılında Clements ve ark. yaptığı bir çalışmada santral glutamerjik sinapslarda glutamat konsantrasyonunun 1.1 mM düzeylerine kadar yükseldiği ve 1.2 ms gibi kısa bir sürede glutamatın büyük bir kısmının sinapslardan uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir¹².

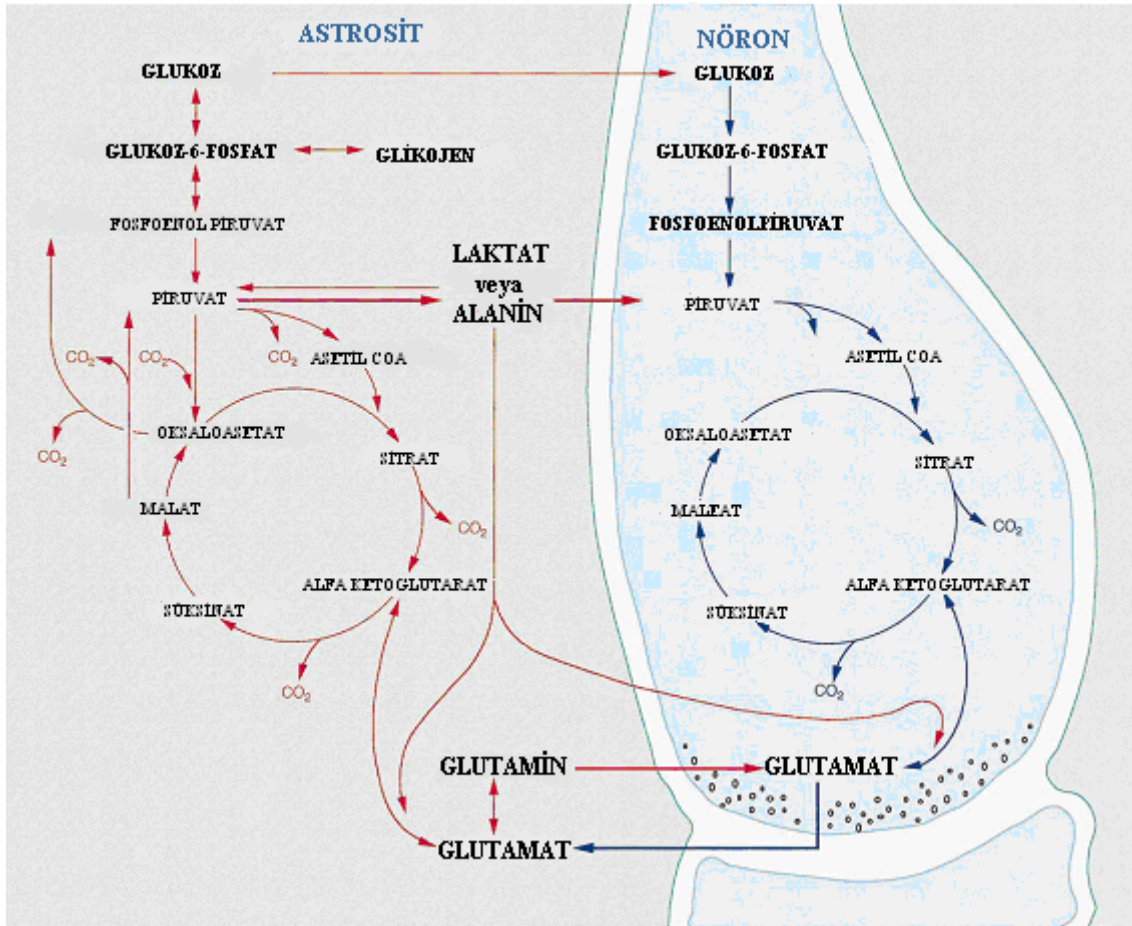
70'li yıllarda yapılan önemli çalışmalarla ise MSS'de sinir dokusunun, eksitator sinyal iletiminden sorumlu olan glutamat ve diğer "eksitator aminoasitler" (EAA)'in yüksek konsantrasyonlarına maruz kalmasının, nöronal dejenerasyona ve/veya ölüme sebep olduğu ve glutamatın ve diğer EAA'ların bu etkilerinin nöron membranlarını depolarize edebilmelerine ve dolayısıyla nöronları uyarabilmelerine bağlı olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki sinir uçlarından glutamatın ve diğer

EAA'ların aşırı salgılanması ve/veya astroglialar tarafından yetersiz geri taşınmaları dolayısıyla bu transmitterlerin hücre dışı ortamda birikmeleri, glutamat da dahil bahsedilen nörotransmitter aminoasitleri hipereksitasyona bağlı geridönüşsüz sinir hücresi harabiyetine sebep olabilen güçlü “eksitotoksin” lere dönüştürmektedir^{13,14}. Bu bilgi günümüzde farklı tip EAA reseptörlerinin karakterizasyonu ve bu reseptörlerin fonksiyonlarının tespitindeki gelişmeler sayesinde mekanizması belirli oranda açıklanabilmiş, “eksitotoksisite” diğer bir deyişle “aşırı uyarıma bağlı nöronal hasar” kavramını ortaya çıkarmıştır¹⁴.

MSS’de eksitator sinyal iletiminde önemli rol oynadığını ve hücre dışındaki aşırı miktarlarının nöronlarda hipereksitasyona bağlı hasar oluşturduğunu belirttiğimiz glutamatın, MSS dışında periferde; primer aferentler¹⁵, keratinositler, makrofajlar, schwann hücreleri ve serumda¹⁶ da kendine özgü reseptörleri ile etkileşebilen depoları bulunmaktadır. Periferdeki bu depolardan glutamatın MSS’ye geçişi, yani MSS’nin periferik glutamatla kontaminasyonu, kan ile MSS arasında farklı birçok maddenin de MSS’ye geçişine mani olan ve dolayısıyla MSS’deki hücre dışı sıvının mahiyetinin kontrolünü sağlayarak MSS’yi muhtemel toksisitelerden uzak tutan bir yapılanma sayesinde engellenmektedir. Beynin vasküler endotelinde bulunan ve “kan-beyin bariyeri” olarak adlandırılan bu yapılanma sınırlı ölçüde aktif transport mekanizmasına sahip olup, yukarıda da bahsettiğimiz gibi glutamat dahil kanda çözünmüş birçok maddenin MSS’ye geçişine mani olmaktadır. Bu durum MSS’nin, glutamatı kendi sınırları içerisinde sentez ve depo edebilen ayrıca bu eksitator transmitterin ektraseüler miktarının regülasyonunu yapabilen özerk bir bölge olduğunu göstermektedir¹⁷.

2.1.2. Glutamat Sentezi

Daha önce de belirttiğimiz gibi kan-beyin bariyeri glutamatın sistemik dolaşımından MSS'ye ayrıca MSS'den sistemik dolaşıma geçişine mani olmaktadır. Dolayısıyla MSS'deki glutamatın tamamı burada sentez ve depo edilmektedir. Glutamatın sentezi büyük ölçüde glutamerjik sinir uçlarında glutaminin, glutaminaz (GLS) enzimi aracılığıyla hidroliz edilmesi ile gerçekleştirilir¹⁸. Glutamatın az bir kısmı ise kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçebilen glukozun metabolizmasındaki ara ürünler kullanılarak sentez edilir. Glukozu CO₂ ve suya kadar indirgeyebilecek donanımına sahip olan nöronlar ve astrositlerde öncelikle glikoliz ile piruvat ve piruvattan bir molekül CO₂'nin uzaklaştırılmasıyla asetil koenzim A (asetil CoA) ve asetil CoA'nın trikarboksilik asit (TCA) siklusunda oksaloasetat ile kondensasyonu ile sitrat meydana gelir. Daha sonra iki farklı ara maddenin de oksidasyonu ile bir molekül asetil CoA'ya karşılık iki molekül CO₂ üretilmiş ve bir molekül oksaloasetat, TCA siklusunda sitrat üretimi için tüketilmiş, diğer bir asetil CoA molekülü ile kondensasyon için hazır hale getirilmiş olur. Bu arada TCA siklusunda meydana gelen ara ürün α -ketoglutarat, alanin aminoasidi ile transamine edilerek glutamat sentezlenir¹⁷. Burada glukozun oksidasyonu ile yüksek miktarda enerji elde edilirken TCA siklusundaki ara maddelerin net bir sentezi gerçekleşmemektedir. TCA siklusunda oluşan ara ürünlerin sentezi, özellikle siklusun devamlılığını ve glutamat üretimi için harcanan ara ürünlerin yerine konmasını sağladığı için önem arz etmektedir.



Şekil 1. Glutamat sentezi.

2.1.3. Glutamat Reseptörleri

Nöronlar ve astrositlerden salıverilen¹⁹ ve hücre dışındaki yüksek konsantrasyonları MSS hastalıklarının birçoğu ile yakından ilişkilendirilen glutamatın, postsinaptik hücre zarında yerleşim gösteren ve hücrel fonksiyonlarına aracılık eden kendine özgü reseptörlerinin modülasyonunun, santral (ör. omurilik hasarı) veya periferel (ör. diyabetik nöropati, radikülopati) sinir harabiyeti ve/veya hastalığına bağılı gelişen ağrılar dahil persistan ağrının birçok türünde ve inflamatuvar veya mafsalla ilişkili ağrılarda (ör. romatoid artrit, osteoartrit) terapötik yarar sağlayabileceğı düşüncesini destekleyen çok sayıda delil mevcuttur²⁰. Bu nedenle glutamat reseptörlerinin,

etkilerinin, etki mekanizmalarının ve ağrıyla olan ilişkilerinin incelenmesi önem arz etmektedir.

Glutamat reseptörleri (GluR); elektrofizyolojik özellikleri, farmakolojik antagonizmaları ve klonlandıkları genler göz önünde bulundurularak **(i)** iyonotropik reseptörler (iGluR, ligand kapılı iyon kanalları) ve **(ii)** metabotropik reseptörler (mGluR, ACPD reseptörleri, G protein kenetli) olmak üzere iki ana grupta kategorize edilirler^{12,20-24}. iGlu reseptörleri, mono veya divalan katyonlara geçirgen katyon-spesifik iyon kanalları olup doğal agonistlere gösterdikleri seçiciliğe göre; α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonat (AMPA), 2-karboksi-3-karboksimetil-4-izopropenil-pirolidin (KA, kainik asit) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör kanalları olmak üzere üç alt başlık altında toplanırlar^{21,22} (AMPA ve kainat reseptörleri agonist ve antagonistleri tam anlamıyla tespit edilmeden önce non-NMDA reseptörler olarak isimlendirilmiştir ve bu isimlendirme bazı kaynaklarda halen kullanılmaktadır). mGlu reseptörleri ise selektif olarak ($\pm$)-1-aminosiklopentan-*trans*-1,3-dikarboksilik asit'e (*trans*-ACPD) afinite gösteren²²⁻²⁴, G proteinine kenetli, yedi transmembranal segmentli reseptörlerdir ve bazı hücre içi ikincil habercilerin (inositol trifosfat ve siklik nükleotidler gibi) üretimini düzenlerler^{12,20,22}.

2.1.3.1. AMPA Reseptörleri

Bu reseptörler, önce kiskolat reseptörleri olarak daha sonra ise metabotropik glutamat reseptörlerinin de kiskolata afinite gösterdiğinin ve AMPA'nın bu ligand kapılı iyon kanalları için kiskolattan daha seçici olduğunun tespitinden sonra AMPA reseptörleri olarak yeniden adlandırılmış^{12,25}; GluR1, GluR2, GluR3 ve GluR4 (GluRA-D veya GLU_{A1-4} olarak da bilinirler) olmak üzere toplam dört adet altbirimden teşekkül eden homo- veya heterotetramerlerdir. NMDA reseptörleriyle kıyaslandığında

glutamata daha düşük afinite gösterirler ve doğal agonistleri olan glutamata seçicilikleri AMPA'dan daha düşüktür²⁵. AMPA reseptörleri beyin fonksiyonları için kritik öneme sahiptir; şöyle ki selektif AMPA reseptör antagonistlerinin sıçan hipokampusüne infüzyonu, bu bölgedeki eksitator sinyal iletiminin neredeyse tamamen kesilmesine sebep olmuştur²⁶. Aktivasyonları hızlı oluşan (1-4 ms) ve çabuk sönen (2-14 ms) depolarizasyon sağlayan AMPA reseptörlerinin MSS'deki birçok sinapta hızlı eksitator sinyal iletimine aracılık ettiği düşünülmektedir²⁴.

Bu iyon kanallarının büyük bir kısmı Ca^{2+} permeabilitesini belirleyen GluR2 altbirimi içerir²² ve primer olarak Na^{+} ve K^{+} iyonlarına geçirgendir. Küçük elipsoidal hipokampal nöronlar, retinal bipolar hücreler ve serebral korteksin non-piramidal nöronlarındakiler hariç GluR2 altbirimi içeren AMPA reseptörleri genel olarak Ca^{2+} 'ya geçirgen değildir^{24,27}.

AMPA reseptör proteinlerinin varlığı periferde dorsal kök gangliyon (DRG) hücrelerinin gövdelerinde, insan derisinde ve sıçanların miyelinli ve miyelinsiz duysal sinirlerinde gösterilmiştir²⁰. Omurilik düzeyinde, DRG nöronlarının hassasiyetinin idamesinde rol oynayan AMPA reseptörleri, hem normal duysal hem de inflamatuvar ve nöropatik ağrıyla ilgili sinyallerin iletiminde görev almaktadır^{20,28-30}. İnsizyonel modellerde ve birinci derece yanık modellerinde intratekal AMPA reseptör antagonistleri 2,3-dihidroksi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo[f]kinoksalin-2,3-dion (NBQX) veya 6-siyano-7-nitrokinoksalin-2,3-dion (CNQX) ile yapılan öntedavi ile spinal sentizasyon ve sekonder hiperaljezi, engellenebilmektedir^{31,32}. Benzer şekilde philathotoxin'ler ve joro örümceği toksini (JSTX) gibi selektif olarak Ca^{2+} 'ya geçirgen AMPA reseptörlerini bloke eden ajanlar kullanılarak bu reseptörlerin bloke edilmesi ile, termal hasar sonucu gelişen sekonder mekanoadlodin, insizyonel ağrı ve birinci

derece yanık sonrası gelişen sekonder allodininin önüne geçilebilmesi de bu reseptörlerin hem normal duyuşal hem de inflamatuvar ve nöropatik ağrıyla ilgili sinyallerin iletiminde görev aldığını göstermektedir³³. Ayrıca AMPA reseptörlerinin presinaptik nöronlarda glutamat salıverilmesinin feedback kontrolünde³⁴, hafıza, öğrenme, MSS'nin gelişiminde ve bazı nörolojik rahatsızlıkların temelinde yatan uzun dönem ve kısa dönem sinaptik plastisite de rol oynadığını da bilinmektedir^{3,4}.

2.1.3.2. NMDA Reseptörleri

EAA reseptörleri arasında glutamata en fazla selektivite gösteren reseptör tipidir. Glutamat kadar güçlü bir agonisti olmamasına rağmen sentetik agonisti N-metil-D-aspartat (NMDA)'a olan seçici afinitesi sebebiyle NMDA reseptörleri (NMDAR) olarak adlandırılmış, D-2-amino-5-fosfonovalerat (APV) ve α -metil-4-karboksifenilglisin tarafından selektif ve kompetitif olarak bloke edilebilen, ligand (=glutamat) kapılı iyon kanallarıdır. Bu iyon kanalları hipokampus, striatum, septum ve amigdalada fazla miktarda bulunur ve postsinaptik yerleşim gösterir³⁵.

Bu reseptörler yapısal olarak heterotetramerdir ve fonksiyonel her bir NMDA reseptörü, glisin bağlayan iki NR1 altbirimi ile glutamat bağlayan iki NR2 (veya bir NR2 altbirimi yerine glisin bağlayan bir NR3) altbiriminin kombinasyonundan müteşekkil bir komplekstenen ibarettir^{12,22,36}. Bu iyon kanalları ayrıca proton (H^+), poliamin (spermin, spermidin, ifenprodil), redoks ajanları, nitrik oksit (NO), Mg^{2+} ve Zn^{2+} 'nin bağlandığı allosterik modülasyon bölgeleri de ihtiva eder³⁷.

NMDA reseptörleri, MSS'de eksitatör nörotransmisyonu AMPA reseptörlerinden farklı yollarla aracılık eder ve diğer ligand kapılı iyon kanalları ile karşılaştırıldığında bu reseptörler işlevlerini yerine getirebilmek için hem membran potansiyeline hem de agonistin etki bölgesine bağlanmasına ihtiyaç duymaları yönüyle farklılık arzeder.

Ayrıca NMDA reseptörleri aktivasyonları için iki farklı agoniste (glutamat ve glisin) ihtiyaç duymaları nedeniyle de özgündür³⁸. Bu şekilde glisin kendine özgü glisin reseptörleri üzerinden inhibitör aktivite gösterirken, NMDA reseptörlerindeki özgün bağlanma bölgesi aracılığıyla eksitator sinyal iletiminde de rol almış olmaktadır.

Mg^{2+} bağlanma bölgesi ihtiva eden NMDA reseptörlerinin birçok alttipi istirahat membran potansiyelinde hücre dışı Mg^{2+} tarafından bloke edilmiş halde bulunur. NMDA reseptörleri aracılığıyla gerçekleşen sinaptik akımı engelleyen hücre dışı Mg^{2+} 'nin bu reseptörlere bağlanarak bahsedilen fiziksel tıkaç görevini görmesi, büyük oranda voltaj ve belirli oranda da protein kinaz C (PKC) aktivasyonuna bağımlıdır ve bu özellik NMDA reseptörlerinin fizyolojik rollerini belirlemektedir. Nöronların depolarizasyonu ile, örneğin postsinaptik AMPA veya kainat reseptörlerinin aktivasyonu sayesinde, voltaj bağımlı Mg^{2+} bloku kısmen azalmakta ve azalan blokajla birlikte aktive olmuş NMDA reseptörleri hücre içine doğru gerçekleşen Ca^{2+} akışını sağlamaktadır^{12,20,39-41}. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu sonucunda hücre içine doğru oluşan Ca^{2+} akımı; nöron içerisinde çeşitli fonksiyonları düzenleyen birçok kinazın, fosfatazın, endonükleazlar ve kalpain gibi proteazların aktivasyonunu ve bu enzimlerin aktivasyonu ile ilişkili çeşitli kaskadların tetiklenmesini sağlamaktadır^{12,21,42}. Bahsedilen Ca^{2+} akımı aşırı miktarda gerçekleşirse nöron hücresinde fosfolipazlar, endonükleazlar ve kalpain gibi proteazların aşırı aktivasyonuna bağlı olarak nöron membranı, iskeleti ve DNA'sının hasar gördüğü eksitotoksik kaskadlar tetiklenmektedir.

NMDA reseptörleri aracılığıyla gerçekleşen nörotransmisyon bu reseptörlerin yavaş kinetiği nedeniyle AMPA reseptörleri ile gerçekleşen nörotransmisyonla nazaran daha yavaş gelişir ve daha uzun sürer^{12,43}. Dolayısıyla iyon kanalının geçirgenliğinin artmasına eşlik eden hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonundaki artış "uzun süreli

potansiyalizasyon” (long term potentiation, LTP) diğerk bir deyişle “öğrenme ve bellekle ilgili olaylara aracılık eden sinaptik etkinlikte uzun süreli artış” la sonuçlanır^{27,35}.

NMDA reseptörlerinin aktivasyonu omurilik nöronlarını hasar görmüş veya duyarlı nosiseptörlerden ve düşük eşikli mekanoseptörlerden gelen bütün uyarılara daha hassas hale getirir⁴⁴⁻⁴⁶. Bu duruma kapsaisin (ağrı, kaşıntı ve yanma gibi duyuların iletiminden sorumlu C-liflerinin spesifik stimulanı olan, kırmızı biberde bulunan aktif bileşik) intradermal enjeksiyonuyla oluşan ve 20 dakikada sonlanan güçlü, yanma tarzındaki ağrının azalmasından sonra enjeksiyon bölgesi ve etrafında görülen allodinik ve hiperalezik hassasiyetin NMDA reseptör blokajı ile önlenebilmesi önemli bir kanıttır⁴⁷. Ancak bahsedilen sentisizasyon muadili hiperalezik ve allodinik durumlarda NMDA reseptör antagonistlerinin sistemik uygulaması; bu ilaçların unutkanlığa, psikomimetik etkilere, ataksi ve motor düzensizliklere yol açması ve normal sinaptik iletimi etkilemesi nedeniyle uygun bir tedavi yaklaşımı değildir^{46,48}.

2.1.3.3. Kainat Reseptörleri

Kainik asitin güçlü eksitotoksik ve epileptojenik etkilerinden yola çıkarak 1981 yılında Watkins ve Evans adlı bilimadamları kainik asitin bu etkilerini kendisine özgü reseptörleri üzerinden oluşturduğu hipotezini öne sürmüştür. Bu hipotez daha sonra sıçan beyinde [³H]kainata yüksek afinite gösteren bağlanma bölgelerinin izole edilip gösterilmesi ve in-vitro koşullarda DRG’lerde ve C-liflerinde kainatın belirgin depolarizan ve desensitizan cevap oluşturması bu hipotezi desteklemiştir²⁵. Ancak sonraki 20 yıl içerisinde kainat reseptörlerinin MSS’deki fonksiyonel rolleri yeteri kadar aydınlatılamamıştır. Son 10 yıl içerisinde yapılan çalışmalar, bu reseptörlerin postsinaptik bölgede mütevazi fakat uzamış depolarizasyon oluşturduğunu, eksitator ve inhibitör transmisyonunda ve nöronal eksitabilitede rol oynadığını göstermiştir^{20,49,50}.

Birçok açıdan AMPA reseptörleri ile benzerlik gösteren bu glutamat kapılı katyon kanalları, MSS’de hızlı eksitator sinaptik iletiye iştirak etmektedir^{20,25}.

Kainat reseptörleri beş farklı gen aracılığıyla sentezlenen ve GluR5, GluR6, GluR7 (veya GLU_{K5-7}), KA1 ve KA2 (veya GLU_{K1} ve GLU_{K2}) olarak adlandırılan 5 altbirimin kombinasyonundan müteşekkil tetramerlerdir^{12,21,22,24,25}. KA1 ve KA2 altbirimleri [³H]kainata GluR5-7’den daha yüksek afinite gösterdikleri için isimlendirilmeleri farklılık arzetmektedir. Teorik olarak sadece yüksek afiniteli altbirimlerin biraraya gelebileceği öngörülebilse de fonksiyonel bir kainat reseptörü için bu durum yeterli değildir²⁰.

Kainat reseptörleri MSS’de NMDA ve AMPA reseptörlerine kıyasla çok daha çeşitli olaylarda rol oynar. Bu iyon kanalları, bir noktadan diğerine gerçekleşen kimyasal sinyal iletiminin ve sinapslarda gösterdikleri modulator faaliyetlerin⁵¹ yanında ağrının iletiminde de görev alır. Bu durumu sıçan omurilik dilimlerindeki DRG’lerde, C-liflerinin aktivasyonunu takiben bu reseptörlerin aracılık ettiği eksitator postsinaptik akımların gözlemlenmiş olması yeterince açıklamaktadır⁵². Hem klinik hem de prelinik veriler özellikle GLU_{K5} altbirimi içeren kainat reseptörlerinin ağrı iletiminde rol oynadığını göstermektedir. Şöyle ki GLU_{K5} reseptör alttiplerine seçici ve yüksek afinite gösteren antagonist LY382884, formalinle indüklenen persistan ağrının tedavisinde yarar sağlamakta⁵³ ve başka bir periferik nöropati modelinde mekanik uyarılara ve sıcaklık uyarılarına karşı spinotalamik bölgenin cevabını azaltmaktadır⁵⁴. Ayrıca insanlarda kainat reseptör antagonisti LY293558’in sistemik uygulaması kapsaisinin indüklediği ağrıyı ve sekonder allodiniyi gidermektedir⁵⁵.

2.1.3.4. Metabotropik Reseptörler (mGluR, ACPD Reseptörleri)

Metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR) 1980'lerde glutamat ve diğer EAA'ların (kiskolat ve ibotenat gibi) MSS'de farklı tip hücrelerde fosfoinozitin (PI) fosforilasyonunu stimüle edebildiklerinin veya hücre içi Ca^{2+} 'nın mobilizasyonunu sağladıklarının gösterilmesi ile keşfedilmiştir⁵⁶. γ -aminobütirik asit_B (GABA_B) reseptörlerinin de dahil olduğu G-protein bağlı reseptörlerin (GPBR) C sınıfına dahil, doğal ligandların bağlanması için geniş amino uçlarında meydana gelmiş cep benzeri bağlanma bölgeleri ile karakterize⁵⁷ bu reseptörler yedi transmembranal segment ihtiva ederler^{12,20,41}.

Bugüne kadar sekiz farklı alttipte (mGlu1-8) mGlu reseptörü klonlanmıştır. Bu reseptör alttipleri aminoasit dizilişindeki benzerliklere, sinyal iletim mekanizmalarına ve farmakolojik özelliklerine göre üç gruba ayrılabilir^{2,56-59}. Grup I mGlu reseptörleri (mGlu1 ve mGlu5) G α q-proteini aracılığıyla fosfolipaz C (PLC) ile pozitif kenetlidir ve fosfoinozitin hidrolizini dolayısıyla intraselüler Ca^{2+} düzeyini ve araşidonik asit salgısını artırır. Grup II mGlu reseptörleri (mGlu2 ve mGlu3) G α i-proteininin aktivasyonu aracılığıyla adenilil siklaz (AC) ile negatif kenetlidir. Benzer şekilde grup III mGlu reseptörleri (mGlu4, mGlu6, mGlu7 ve mGlu8) de G α i-proteini aracılığıyla AC ile negatif kenetlidir⁵⁷⁻⁵⁹.

Birçok mGlu reseptörü inen ve çıkan nosiseptif yollarda pre- ve postsinaptik olarak bulunmaktadır. Örneğin DRG hücrelerinde mGlu8 reseptörleri dışındaki metabotropik glutamat reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir²⁰. Bunula birlikte mGlu reseptörleri; omuriliğin dorsal boynuzu, talamus, amigdala ve serebral korteks gibi nosiseptif olaylarla ilişkilendirilen MSS bölgelerinde de yerleşim gösterirler. Grup I mGlu reseptörlerinin Ca^{2+} mobilizasyonu ve dolayısıyla nöronal uyarılabilirlik ile olan

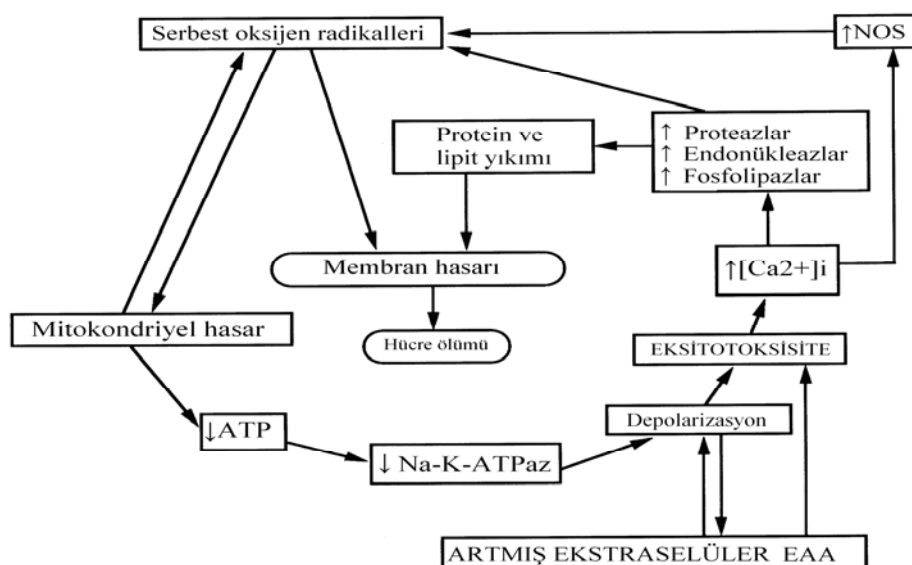
bağlantısı bu reseptörlerin nöropatik ağrı ile ilişkilendirilmesini ve ilgi çekici ilaç hedefleri haline gelmesini sağlamıştır^{56,57,60}.

2.1.4. Glutamat ve Nörotoksisite

MSS'nin fizyolojik fonksiyonlarını sürdürebilmesi için elzem bir transmitter olan glutamatın¹⁻⁴ hücre dışı ortamdaki miktarının hipereksitasyona bağlı nöronal eksitotoksisiteyi tetikleyecek konsantrasyonlara ulaşmasına mani olabilmek için, hücre dışına salınmış glutamatın Na^+ bağımlı ve yüksek kapasiteli bir transport mekanizması vasıtasıyla nöronlara ve özellikle de astrositlere geri taşınması ve bu suretle hücre dışı konsantrasyonunun kontrol altında tutulması gerekmektedir^{7,10,11,14}. Enerji bağımlı bu geri-taşıma mekanizmasının; hipoglisemi, hipoksi veya uzamış epileptik nöbetler vb. sebeplerle bozulan enerji metabolizmasına bağlı olarak yetersiz işlev görmesi ve/veya nöron ve astrositlerden aşırı glutamat salıverilmesi, sinaptik aralıkta biriken glutamata bağlı uyarının şiddetlenmesine ve glutamat reseptörlerine bağlı kaskadların uzun süre ve daha güçlü işlemesine sebep olmaktadır¹⁴. Bahsedilen bu durum çeşitli nosiseptif, kognitif ve lokomotor hastalıklarla ilişkilendirilen nöronal hasarla yakından ilişkilendirilmektedir¹⁰. Şöyle ki bu reseptörlerin selektif ve kompetitif antagonistlerinin nörodejenerasyona bağlı birçok patolojik durumda nöroprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir⁴⁴.

Glutamatın hücre dışı ortamda yüksek konsantrasyonlara ulaşmasıyla aşırı uyarılan glutamat reseptörleri (özellikle Ca^{2+} influksuna mücade eden NMDA reseptörleri) aracılığıyla hücre içerisine yoğun Na^+ ve Ca^{2+} akışı meydana gelir. Hücre içi tampon mekanizmalarının yetersiz kalması ile aşırı yükselen hücre için Na^+ ve Ca^{2+} konsantrasyonunun bahsedilen eksitotoksisitenin primer nedeni olduğu düşünülmektedir. Na^+ 'nın hücre içi konsantrasyonlarındaki artış ile meydana gelen

depolarizasyonu Cl^- ve suyun hücre içine girişi takip etmekte ve buna bağlı olarak da hücrede bazen tolere edilebilir bazen de lizisle sonuçlanabilen morfolojik şişme meydana gelmektedir⁶¹. Ca^{2+} 'nın artmış hücre içi düzeyleri ise kalpainler ve diğer proteazların, protein kinazların, nitrik oksit sentaz (NOS)'ın, kalsinörinlerin ve endonükleazların aşırı aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Bahsedilen enzimlerin aşırı aktivasyonunun **(i)** aşırı miktarda hidrojen peroksit, süperoksit (O_2^-) ve nitrik oksit (NO) gibi reaktif oksijen türlerinin oluşmasına, **(ii)** hücre iskeleti teşekkülünde azalmaya, **(iii)** programlanmış hücre ölümüne (apoptozis) neden olan genetik sinyallerin oluşmasına ve **(iv)** mitokondriyel hasara neden olduğu bilinmektedir⁶². Örnek olarak NOS'nin Ca^{2+} - kalmodulin etkileşmesi sonucu aktive olması hücre membranı hasarına ve mitokondriyel hasara neden olan hücre içi NO ve süperoksitlerin üretimini artırır⁶³ ve oluşan mitokondriyel hasara bağlı gelişen enerji üretimindeki azalma hücrenin ölümüne veya hasar görmesine neden olan kaskadları tetikler¹⁴.



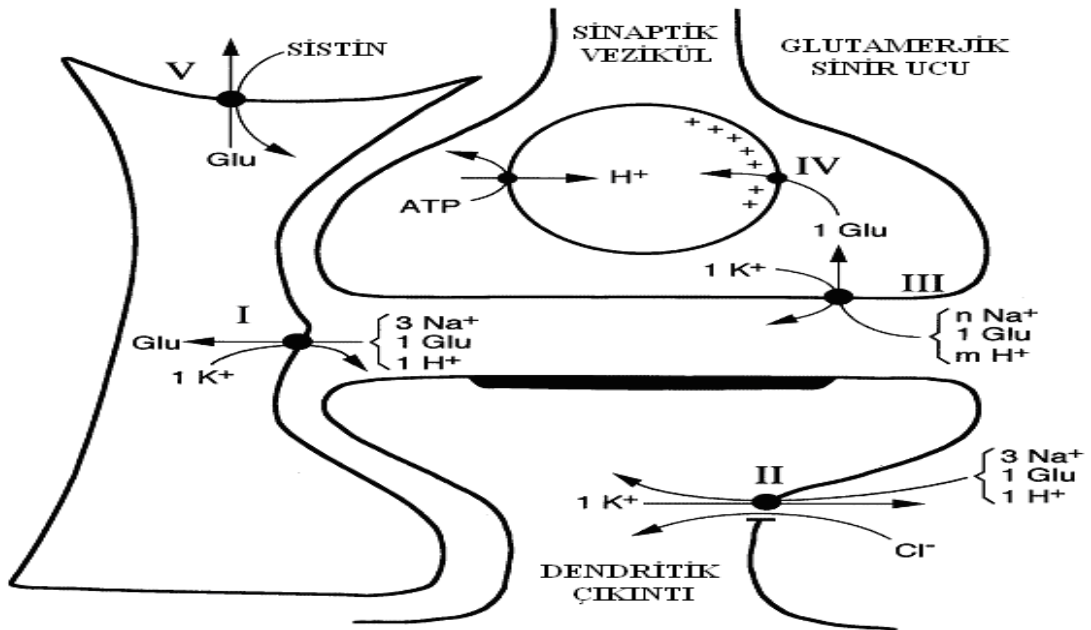
Şekil 2. Nöronal hasar ve/veya ölüme neden olan hücre membranı hasarı ve mitokondriyel hasar oluşum kaskadı.

2.1.5. Glutamat Taşıyıcıları

Hücre dışı ortamda bulunan yüksek konsantrasyonlarda glutamatın nörotoksik etkilerine aracılık eden glutamat reseptörlerinin sadece sinapslarda değil; nöron soması, dendritler ve nöron sonlanmaları gibi nöronal unsurlarda da bulunması, nöronları glutamatın eksitotoksik etkilerinden koruyabilmek için sadece sinaptik aralıktaki miktarının değil aynı zamanda ekstrasinaptik ortamdaki miktarının da kontrol altında tutulması gerektiğini göstermektedir^{7,64-66}. Daha önce değinildiği gibi glutamatın hücre dışı ortamdaki miktarını bu transmitteri kimyasal yollarla parçalamak suretiyle regüle edebilecek bir enzim sistemi bulunmamaktadır. Bu durum glutamatın hücre dışı miktarının regülasyonu için bir taşıyıcı mekanizmanın elzem olduğu fikrini doğurmuş ve Na⁺ bağımlı bir taşıyıcı mekanizmanın glutamati özellikle astrositlere ve bunun yanında nöronlara geri taşımak suretiyle hücre dışı glutamat miktarını kontrol altında tuttuğu tespit edilmiştir. Astrositler ve nöronlar tarafından gerçekleştirilen geri alımın büyük kısmı (%95 oranında) bahsedilen bu Na⁺ bağımlı ve yüksek afiniteli taşıyıcılarla ve az bir kısmı da (%5 oranında) Na⁺ bağımsız (Cl⁻ bağımlı glutamat /sistin taşıyıcıları) bir mekanizmayla gerçekleştirilir^{7,11,67}. Glutamatın geri taşınması, sadece sinyal iletiminin sonlandırılması ve eksitotoksitenin önlenmesinde değil hücre içi glutamat havuzlarının yeni uyarılarla glutamatın tekrar salıverilmesi için doldurulması yönüyle de önem arz etmektedir.

Şu ana kadar EAAT1 (GLAST, Glutamate-Aspartate Transporter), EAAT2 (Glutamate Transporter, GLT), EAAT3 (Excitatory Amino Acid Carrier, EAAC), EAAT4 (Excitatory Amino Acid Transporter) ve EAAT5 olmak üzere toplam beş adet Na⁺ bağımlı ve yüksek afiniteli glutamat (veya EAA) taşıyıcısı klonlanmıştır. GLAST ve GLT1 ilk defa sıçan, EAAC tavşan ve EAAT4 ile EAAT5 ise insandan izole

edilmiştir. İnsanlarda bu taşıyıcı proteinlerden EAAT1 ve EAAT2 MSS astrositlerinde, EAAT3 MSS nöron somaları ve dendritlerinde, EAAT4 serebellar purkinje hücrelerinde ve EAAT5 özellikle retinada lokalize olmuştur^{7,64,66,67}. Bu taşıyıcılar vasıtasıyla 3 Na⁺ ve 1 H⁺ iyonu yanında bir adet glutamat anyonunu hücre içine geri taşınırken 1 K⁺ iyonu ise hücre dışına çıkarılmaktadır. Nöronlar içerisine taşınan glutamat, burada veziküler glutamat taşıyıcıları (VGLUT) vasıtasıyla veziküller içerisine sekestre olmakta ve daha sonra salıverilmek üzere konsantre edilmektedir⁶⁸. Glutamati amonyum (NH₄⁺) ile amide eden reaksiyonu katalizleyen glutamin sentaz (GS) enzimini ihtiva eden astrositlerde ise glutamat, enerji gerektiren bir reaksiyonla glutamat ve GABA prekürsörü olan glutamine dönüştürülmekte ve hücre dışı ortama salıverilmektedir. Astrosit tarafından salıverilen glutamin hücre dışı ortamdan nöronlar tarafından alınıp glutaminaz (GLS) enzimi ile enerji gerektirmeyen bir reaksiyonla tekrar glutamata dönüştürülmektedir. Bu döngüye glutamat-glutamin döngüsü adı verilir^{1,17,68}.



Şekil 3. Hücre dışındaki glutamatın nöronlara ve astrositlere geri taşınması.

2.2. Ağrı

Ağrı, Uluslararası Ağrı Araştırmaları Teşkilatı (International Association for the Study of Pain, IASP) tarafından 1986 yılında “vücudun herhangi bir yerinden kaynaklanan, gerçek ya da olası bir doku hasarı ile birlikte seyreden, hastanın geçmişteki tüm deneyimlerini kapsayan, hoş olmayan, emosyonel (duygusal) ve sensoryal (algılanan) bir duygudur” şeklinde tanımlanmıştır⁶⁹. Genellikle doku zedelenmesine bağlı yani nosiseptif nitelikte bir duygu olan³⁵ ve hem ileri doku zedelenmesinin önüne geçen hem de iyileşme esnasında zedelenmiş dokunun korunmasını sağlayan ağrı, zorunlu korunma refleksinin fiziksel ekidir. Ancak ağrı belirgin doku zedelenmesinin olmadığı periferik veya merkezi sinir sisteminde ağrı yolları üzerindeki bozukluklara bağlı olarak da ortaya çıkabilmektedir^{70,71} (deafferentasyon ağrısı).

Ağrı, süresine göre “akut ağrı” ve “kronik ağrı” olarak ikiye ayrılabilir. Akut ağrı daima nosiseptiftir; kronik ağrı ise çoğu olguda nosiseptif nitelikte olmasına rağmen bazı olgularda deafferentasyon ağrısı şeklindedir. Psikojenik/psikolojik tarzdaki ağrılar ise organik bir neden olmaksızın hissedilen veya çoğu olguda olduğu gibi organik lezyona göre şiddet ve süre olarak abartılı ağrılardır³⁵.

2.2.1. Ağrı Reseptörleri ve Ağrı Yolağı

Ağrı reseptörleri (nosiseptörler) ağrı duyusunun algılanmasında rol alan çıplak sinir uçlarıdır. Bu uçlar tarafından algılanan (transdüksiyon) ağrı dürtüleri periferden MSS’ye (omuriliğin arka boynuzunda substantiya jelatinosada bulunan ve beyin sapı ve talamusun çeşitli bölgelerine çıkan ikinci nöronlara) iki lif sistemi ile taşınır (transmisyon). Bunlardan birincisi mekanik ve termal uyarıları taşıyan miyelinli (iletim hızı 12-30 m/s) ve büyük çaplı (2-5 mm) Aδ lifleridir. Ağrı dürtülerini MSS’ye taşıyan

ikinci lif sistemi ise mekanik ve termal uyarıların yanında kimyasal uyarıları da taşıyan, miyelinsiz (iletim hızı 0.5-2 m/s) ve ince (0,4-1,2 mm) C polimodal liflerdir.

Hızlı ve orta şiddette ağrı impulslarını taşıyan birincil aferent nöronlarla substantia jelatinosadaki ikincil aferent nöronlar arasında sinyal aşırımını sağlayan transmitterin glutamat; yavaş ve yüksek şiddette ağrılarda ise P maddesi olduğu düşünülmektedir^{35,70,72-75}. Substantiya jelatinosada primer olarak glutamat ve P maddesi tarafından birincil aferent liflerle sinaps yapan ikincil aferent liflere iletilen ağrılı uyarı ikincil aferent liflerle korteks, talamus ve beyin sapında ağrı ile ilişkili bölgelere iletilir ve buralarda ağrının algılanması gerçekleşir (persepsiyon)⁷⁰. Korteks; ağrının ayırdedilmesi, doğru ve anlamlı yorumlanması ile belirgin bir biçimde ilişkiliyken ağrının algılanması için korteksin varlığı elzem değildir⁷⁴.

Ağrı ile ilgili teorilerden en çok kabul gören 1965 yılında Melzack ve Wall tarafından ileri sürülen “kapı kontrol teorisi”, ağrının ilk olarak omurilikte kontrol edildiği düşüncesini ortaya koyar. Bu teoriye göre A ve C lifleri ile alınan uyarıların düzenlenmesi ve değiştirilmesi substantiya jelatinosa hücrelerinin aracılığı ile gerçekleşir. Aferent liflerle omuriliğin V. laminasındaki T (transmisyon hücreleri) hücrelerine gelen sinir impulsu, arka boynuzun II ve III. laminasında bulunan substantiya jelatinosa hücrelerinin aktivitesi tarafından düzenlenir. Substantiya jelatinosa hücreleri, uyarıların geçişini **(i)** presinaptik olarak, Aδ ve C lifi aksonlarında impulsu bloke etmek ya da, **(ii)** postsinaptik olarak; kimyasal transmitter salıverilmesini inhibe ederek ve gelen eksitator impulsların algılanma seviyesini değiştirmek suretiyle iki yolla etkiler. Kapı mekanizması esas olarak geniş çaplı Aα ve Aβ liflerinin aktivitesi ile kontrol edilir. Kalın liflerin uyarılması, substantiya jelatinosa hücrelerini stimüle ederek (kapı kapanır) T hücrelerine uyarı geçişini inhibe eder. İnce liflerin uyarılması

ise substantiya jelatinosa hücrelerini inhibe ederek (kapı açılır) T hücrelerine uyarı geçişini artırır. Kapı kontrol teorisi, ağrının giderilmesinde klinikte geniş kullanım alanına sahiptir. Bu teoriye göre deri uyarısı ağrıyı giderebilir. Masajla derinin ovulması, sıcak ve soğuk uygulama, tedavi edici dokunma ve akapunktur gibi yöntemlerin temelindeki etki mekanizması kapı kontrol teorisine dayanmaktadır⁷⁶.

2.2.2. Nöropatik Ağrı, Hiperalezi ve Allodini

Uluslararası Ağrı Araştırmaları Teşkilatı'nın 1994 yılında terminolojideki karışıklıkları önlemek amacıyla yaptığı tanıma göre nöropatik ağrı; “periferik veya santral sinir sisteminin bir kısmının zedelenmesi, fonksiyonun bozulması veya uyarılabilirliğinin değişmesi ile ilgili bir ağrıdır”⁶⁹.

Allodini: Dokunma gibi normalde ağrı oluşturmeyen uyarıların bile ağrı oluşturmaya ile belirgin hiperalezik bir durumdur⁷⁴.

Hiperalezi: Normal koşullarda hafif bir ağrı oluşturacak uyarıların abartılı bir ağrıya sebep olduğu durumdur.

Ağrıya sebep olan nöropatiler ayırıcı tanıları göz önünde bulundurularak asimetrik tipte olanlar:

1. Kraniyal nevraljiler: trigeminal-glassofaringeal ve laringeal-nevralji,
2. Sinir sıkışmaları: post-travmatik, karpal tünel sendromu (sinir başı sendromu), meralgia paraestetika, sinir kökü sıkışması (intervertebral disklerin fıtıklaşması),
3. Nöromalar: post-travmatik, post-operatif, amputasyonu müteakip nöromalar ve Morton nevraljisi,
4. Pleksus nöropatileri: servikobrakial veya lumbosakral pleksusların idiyomatik nevrileri,

5. Diyabetik mono-/oligo-nöropatiler: akut oftalmopleji, akut torakoabdominal nöropati, diyabetik amyotrofi,
6. Anjiyopatik nöropatiler: inflamatuvar, okluzif/iskemik nöropatiler,
7. İnfeksiyöz/parainfeksiyöz nöropatiler: postherpetik, sifiliz, herpes simplex, AIDS, borelyoz nöropatiler,

ve simetrik tipte olanlar:

1. Metabolik: diabetes mellitus, pellegra (niasin eksikliği), beriberi (tiamin eksikliği) hastalıklarına bağlı gelişen nöropatiler,
 2. Toksik: Etanol, sitostatik ilaçlar (ör. paklitaksel, vinkristin), izoniazid, talyum, arsenik, cıva ile oluşan nöropatiler,
 3. İmmün yanıt sonucu gelişen: Sjögren sendromu ile ilgili nöropati, kriyoglobulin ile ilgili nöropati, akut veya kronik demiyelitizan nöropatiler,
 4. Kalıtsal: ırsi duyusal nöropatiler, Fabry hastalığı
- diye sınıflandırılabilir⁷⁷.

2.2.3. Antikanser İlaçlarla Oluşan Ağrılı Nöropatiler

Malign neoplaziler (kanserler) hayatı tehdit eden ve çoğu kez hastanın hayatını kaybetmesine neden olan; vücudun kalıtsal yapılanma planından bağımsız olarak çoğalan, yüksek proliferatif indeksli, sağlıklı dokuları istila etme ve bu dokularda ikincil tümörler oluşturma (metastaz) eğilimi gösteren hücrelerden müteşekkil doku kitleleriyle belirgin hastalıklardır. Günümüzde bu hastalıklar antikanser ajanlar yardımıyla belirli ölçüde tedavi edilebilmekte ve en azından hastanın hayat süresi ve hayat kalitesi belirli oranda artırılabilir (palyatif tedavi). Özellikle antikanser ilaçlarla beraber cerrahinin ve radyoterapinin birlikte uygulanması (multimodal tedavi) ile kanserli

hastalarda 1960’larda %39 olan beş yıllık sağkalım oranı 90’lı yıllarda %70’lere ulaşmıştır^{35,78}.

Antikanser tedavide amaç hastanın sağlıklı hücrelerine zarar vermeden kanserli hücrelerin çoğalmasını önlemek veya mümkünse onları tamamen yok etmektir. Ancak sağlıklı vücut hücreleri ile kanserli hücrelerin birbirine birçok yönden benziyor olması antikanser ilaçların seçiciliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu ajanlar kanserli hücrelerin yanında yüksek proliferasyon indeksine sahip sağlıklı vücut hücrelerini (kıl folikül hücreleri, kemik iliği kök hücreleri, barsak epiteli vb.) de etkilemektedir. Bununla beraber bu ilaçlar proliferatif indeksi düşük olan sinir, böbrek ve karaciğer hücrelerini de etkileyebilmektedirler. Antikanser ilaçların genel yan tesirleri dokular üzerindeki antiproliferatif etkilerine bağlı olarak gelişmektedir. Örneğin kıl foliküllerinin çoğalma hızlarının düşmesi saç kaybına yol açarken yaşam süreleri birkaç günle sınırlı olan enterositlerin yetersiz çoğalmalarına bağlı olarak sayılarının azalması gastrointestinal şikayetlere (diyare) neden olmaktadır. İmmün sistem hücrelerinin yetersizliği ise hastanın infeksiyonlara hassasiyetini artırmakta ve kemik iliği depresyonuna bağlı olarak kan tablosu bozulmaktadır (nötropeni, trombositopeni, anemi). Hamilelerde bu ilaçların kullanılmasıyla da muhtemel fetal malformasyonlar meydana gelmektedir^{35,78}.

Daha önce de değinildiği gibi antikanser ajanlar proliferatif indeksi yüksek olan hücrelerin yanında proliferasyonun belirgin olmadığı hücreleri de etkileyebilmektedir. Örneğin, sinirlerin antikanser ajanlardan (özellikle paklitaksel, vinkristin ve sisplatin gibi) etkilenmesi ile ağrı duyusunun doğru algılanamamasına neden olan sinir harabiyeti gelişebilmektedir. Hasta, normalde ağrı oluşturmeyen bir uyararla bile ağrı hisseder hale gelirken ağırlı uyarılar sebebiyle orantısız ağrılar algılamaya başlar. İlk durum

“allodini” ikincisi ise “hiperaljezi” olarak adlandırılmaktadır ve her iki durum da genellikle standart analjeziklerle tedaviye direnç göstermektedir. Bahsedilen bu yan etkiler nedeniyle onkologlar birçok vakada ilaç dozunu azaltmak veya antikanser terapisini sonlandırmak zorunda kalmaktadır. Tedavinin tamamlanamaması veya düşük dozlarla tedaviye devam edilmesi ile tümör dokusuna hem ilaca karşı direnç geliştirmesi hem de tekrar büyüyüp hastanın hayatını tehdit etmesi için bir şans daha verilmiş olur. Dolayısıyla paklitaksel, vinkristin ve sisplatin gibi ilaçlarla oluşan nöropati ve nöropatik ağrının önlenmesi veya tedavi edilmesi, bu ilaçlarla gerçekleştirilen tedavinin daha etkin hale getirilmesine ve kanserli hastaların sağkalım oranlarının artırılmasına olanak sağlayacaktır.

2.2.3.1. Paklitaksel ile Oluşan Nöropati ve Nöropatik Ağrı Sendromu

Paklitaksel, *Taxus brevifolia* (pasifik porsuk ağacı) isimli bitkiden elde edilen ve mitoz mekiği kontraktıl proteinlerini oluşturan mikrotübülleri stabilize edip mitozu G2 fazında durdurarak etki gösteren bitkisel kaynaklı sitostatik bir ilaçtır^{79,80}. Solid tümörlerin (meme kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, over kanseri, Kaposi sarkomu) tedavisinde kullanılan bu ilacın doz kısıtlayan en önemli yan etkileri sebep olduğu nöropati ile bu nöropatiye eşlik eden nöropatik ağrı sendromu ve miyelosupresyondur^{81,82}. Bahsedilen nöropati ve nöropatiyi takip eden nöropatik ağrının insidansı; ilacın kümülatif dozuna ve diyabet, alkolizm ve diğer antineoplastik ajanlarla kombine tedavi gibi nörotoksik faktörlerin eşzamanlı varlığına bağlıdır⁸³. Zamanla şiddetlenen nöropatik ağrı çoğu kez yeterli paklitaksel dozunun yeterli süre uygulanmasını dolayısıyla tedavi başarısını engellemektedir⁸¹. Genel olarak kemoterapötik tedavisine bağlı ağrı gelişen hastaların yüzdesi ile ilgili epidemiyolojik bir veri bulunmamasına rağmen çeşitli raporlar özellikle yükek doz tedavi gerektiren

hastaların %25–50’sinin nöropatik ağrı sendromundan etkilendiğini göstermektedir⁸⁴. Paklitakselle oluşan nöropatinin sebebi kesin olarak bilinmemekle birlikte mikrotübül stabilizasyonuna bağlı olarak gelişen aksonal taşımadaki bozukluklar⁸⁵ ve mitokondriyel disfonksiyonun⁸⁶ nöropatinin altında yatan sebep olduğu tahmin edilmektedir. Paklitakselin indüklediği nöropatik semptomlar genellikle halsizlik ve parestezi ile başlamakta ve el ve ayaklarda ağrılar, uyuşukluk, yazı yazma ve düğme ilikleme gibi günlük yaşam hareketlerinde güçlükler ve özellikle gece ortaya çıkan denge bozukluğu ile devam etmektedir⁸⁷⁻⁸⁹.

2.2.3.2. Paklitaksel İle Oluşan Nöropatik Ağrıda Tedavi Yaklaşımları

Klinikte kemoterapi alan hastaların birçok nedenle ağrı hissediyor olmaları (antikanser ajanlara bağlı ağrının yanında kanserli doku ve/veya psikolojik nedenlerle) ve bu hastalara bazı ağrı kesicilerin (ör. opioidler) uygulanıyor olması hem sadece antikanser ajanla gelişen ağrının hem de bu ağrının tedavi edilip edilemediğinin tespitini güçleştirdiği için sağlıklı deney hayvanlarında kemoterapiye bağlı ağrı modellerinin oluşturulması önem arz etmektedir. Bu modeller sayesinde sadece antikanser ajana bağlı ağrı oluşturulabilmekte ve tedavisi için çalışmalar yapılabilir.

Özellikle hayvansal deney modelleri ile şu ana kadar kemoterapinin indüklediği ağrının önüne geçebilmek için birçok ilaç grubu denenmiş ve bunlardan bazıları kısmen etkili bulunmuştur. Kalsiyum kanal blokerleri, sodyum kanal blokerleri, antidepresanlar, antiepileptikler tedavide etkinliği araştırılan en popüler ilaçlardır.

Kalsiyum kanal blokerleri: Omuriliğin dorsal boynuzları, ince miyelinli Aδ ve miyelinsiz C primer aferent lifleriyle taşınan mekanik, termal ve inflamatuvar birçok uyarının omuriliğe giriş bölgesidir. Kalsiyum kanalları ise buralarda ağrı sinyalinin iletiminden sorumlu olan glutamat ve P maddesi gibi transmitter maddelerin

salıverilmesi için gerekli olan vezikül-membran birleşmesi ve transmitterin bu veziküllerden sinaptik aralığa salıverilmesinde rol oynamaktadır. Yapılan birçok çalışmada omuriliğin dorsal boynuzlarında ağrının iletiminden sorumlu olduğu düşünülen P/Q tip (yüksek eşikli) ve N tip (düşük eşikli) kalsiyum kanallarının, DRG'lerin primer aferent hücre gövdelerinde ve serbest sinir uçlarında bulunan T tip kalsiyum kanallarının ve omuriliğin dorsal boynuzunda ve DRG'lerde sinir hasarından sonra sayıca artış gösteren dolayısıyla nöropatik ağrının gelişmesiyle ilişkilendirilen kalsiyum kanalı altbirimi $\alpha 2\delta 1$ 'lerin⁹⁰ modülasyonu ile nöropatik ağrı ve diğer kronik ağrıların tedavisi amaçlanmıştır. Bu çalışmalarda paklitakselle indüklenen mekanoallodini ve mekanohiperaljezide NMED-126⁸⁴ (N ve T tip kalsiyum kanal blokeri; 4 gün boyunca 30 mg/kg, p.o.), etosüksimid⁹¹ (T tip kalsiyum kanal blokeri; 3 gün boyunca 100 veya 300 mg/kg, i.p.), gabapentin⁹² ($\alpha 2\delta 1$ altbirimine bağlanarak etki gösterdiği düşünülmekte, 100 mg/kg, i.p.) belirli ölçüde etkili bulunmuştur.

Sodyum kanal blokerleri: Sodyum kanal blokerlerinin membran stabilizan etkilerinden dolayı postravmatik periferik nöropati modellerinde hasar görmüş bölgedeki nosiseptörlerin ektojik ve spontan deşarjlarını önleyerek etki gösterdikleri düşünülmektedir. Meksiletin (30 mg/kg, i.p.) yapılan çalışmalarda paklitakselle indüklenen mekanoallodini ve mekanohiperaljezinin tedavisinde etkili bulunmuştur⁸⁴.

Antiepileptik ilaçlar: Antikonvülsan etkinlik gösteren topiramet (20 mg/kg, p.o.) paklitakselle indüklenen nöropatik ağrıda etkili bulunmuştur⁸⁴.

2.2.3.3. Paklitaksel İle Oluşan Nöropatik Ağrıda Alternatif Tedavi Yaklaşımı

MSS'nin majör eksitatör nörotransmitteri glutamatın hücre dışı konsantrasyonundaki artışın bu transmitterin kendine özgü reseptörleri ile etkileşmek suretiyle aşırı uyarılmaya bağlı nöronal hasara sebep olduğuna daha önce değinilmişti.

Glutamatın astrosit ve nöronlara geri taşınmasında meydana gelen aksaklıklar bu eksitator aminoasitin omuriliğin dorsal boynuzundaki sinapslarda yüksek konsantrasyonlara ulaşmasına ve aferent liflerle omuriliğin dorsal boynuzuna gelen ağrıya ilgili sinyallerin ampfilie edilmesine ve böylece hiperaljezinin oluşmasına zemin hazırlamaktadır⁹³.

Glutamatın hücre dışı ortamdaki düzeylerinin, bu amino asiti astrosit ve nöronlara geri taşıyan yüksek afiniteli ve Na^+ bağımlı bir taşıyıcı mekanizma aracılığıyla kontrol altında tutulduğu bilinmektedir. Weng ve ark.⁹⁴ ile Cata ve ark.⁹⁵ 2005 ve 2006 yılında sıçanlarla yaptıkları çalışmalarda omurilikte bu taşıyıcıların (GLAST ve GLT1) ekspresyonunun paklitakselle ile indüklenen hiperaljezide azaldığını tespit etmişlerdir.

2005 yılında Rothstein ve ark.⁹⁶ Nature dergisinde yayınlanan çalışmalarında ise GLT-1 seviyelerinin β -laktam antibiyotik (penisilin deriveleri; amoksisilin, bakampisilin, ampisilin ve nafsilin ile sefalosporinler; seftriakson, sefoperazol, sefadroksil ve sefalotin) uygulaması ile %210-610 oranında arttığı tespit edilmiştir. Daha sonra bu bulguyu destekleyen birçok çalışma yapılmıştır⁹⁷⁻¹⁰⁰.

Yukarıda bahsedilen bilgilere dayanarak glutamat taşıyıcılarının sayısının azalmasına bağlı olarak geliştiğini düşündüğümüz paklitakselle indüklenen nöropatik ağrıyı bu taşıyıcıların hem sayısını hem de aktivitesini artırdıkları tespit edilmiş β -laktam antibiyotikler penisilin G ve seftriakson ile tedavi etmeye çalıştık.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen ve ağırlıkları 200–220 gram arasında değişen toplam 48 adet Albino Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deney hayvanları laboratuvarında normal oda sıcaklığında (22°C), doğal gece-gündüzün yaşandığı bir ortamda, altı talaş serili plastik kafeslerde barındırıldı ve beslendi. Çalışmamızın bütün aşamalarının etik kurallara uygun olduğu “Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü Etik Kurulu” tarafından verilen 1 Nisan 2010 tarihli ve B.30.2.ATA.0.01.00.05/00/759 sayılı yazı ile ve “Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK)” tarafından verilen 29 Nisan 2010 tarihli ve B.30.2.ATA.023.85-10 sayılı yazı ile onaylanmıştır.

3.2. Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan paklitaksel (Taxol, 6mg/mL flakon), penisilin G (Devapen 800.000 IU, IM flakon), seftriakson (Cefaday 1g, IV flakon) sırasıyla Bristol Myers Squibb İlaçları Inc., Deva Holding Aş., Biofarma İlaç San. Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir.

3.3. Paklitakselle İndüklenen Nöropatik Ağrı Modeli

Bu çalışmada deney hayvanları her biri altı hayvandan oluşan sekiz gruba ayrıldı. Mekanik hiperaljezi ve allodini oluşturmak için yapılacak paklitaksel enjeksiyonundan evvel plantar Randall selitto analjeziometre test ekipmanı (Ugo Basile, İtalya) ile farklı günlerde dört farklı test yapılarak bütün hayvanların arka pençelerine basınç uygulamak suretiyle herbir sıçanın bazal ağrı eşikleri tespit edildi. Daha sonra altı gruba ait sıçanlara 2 mg/kg dozda paklitaksel mekanik hiperaljezi ve allodini oluşturmak

amacıyla, stok ilaç (Taxol[®]) 2mg/ml'ye seyreltildikten sonra, birer gün ara ile (0., 2., 4., ve 6. gün) i.p. yoldan toplam dört kez zerk edildi⁹². Bu gruplardan üçüne penisilin G ve seftriaksonun, paklitakselin tekrar tedavisindeki muhtemel etkinliklerini tespit edebilmek için bir ay sonra paklitaksel tekrar birer gün ara ile toplam 4 kez daha zerk edildi. Sağlıklı gruba ise aynı hacimde injeksiyonluk su yine i.p. yoldan verildi.

Paklitaksel ile oluşturulan mekanik hiperaljezinin tespiti için yine plantar Randall selitto analjeziometre test ekipmanı kullanıldı. Her bir test öncesi deney hayvanlarının değişen ortam koşullarına uyum sağlaması amacıyla 20-30 dakika beklendi. Ayrıca kullanılan test ekipmanının sıçanların arka pençelerine uyguladığı basınç nedeniyle pençelerde ağırlı uyarana karşı oluşabilecek muhtemel hassasiyetin test sonuçlarını etkilememesi için aynı sıçan grubuna iki gün üst üste test yapmaktan kaçınıldı. Yaptığımız ön çalışmalarda ilk paklitaksel injeksiyonundan yaklaşık 14 gün sonra tespit edildiğini gördüğümüz mekanik hiperaljezi ve allodini 30. günde en şiddetli hale geldiğinden, ağrı duyarlılığının oluştuğu gözlenen hayvanlara 30. günden itibaren 10'ar gün süre (30.-40. günler arası) ile 400.000 U/kg/gün dozunda penisilin G¹⁰¹ ve 200 mg/kg/gün seftriakson^{96,102} i.p. yoldan 1'er mL injeksiyonluk su içerisinde zerk edildi. Sağlıklı grup ile paklitaksel kontrol grubu sıçanlarına bu esnada 1'er mL injeksiyonluk su i.p. yoldan zerk edildi. Penisilin G ve seftriakson tedavisine başlandıktan sonra dört deney grubunun da ağrı eşiklerindeki değişikliklerin tespiti için her hafta en az bir test yapıldı.



Şekil 4. Randall selitto analjeziometre test ekipmanı (Ugo Basile, İtalya).

3.4. İstatistiksel Analizler

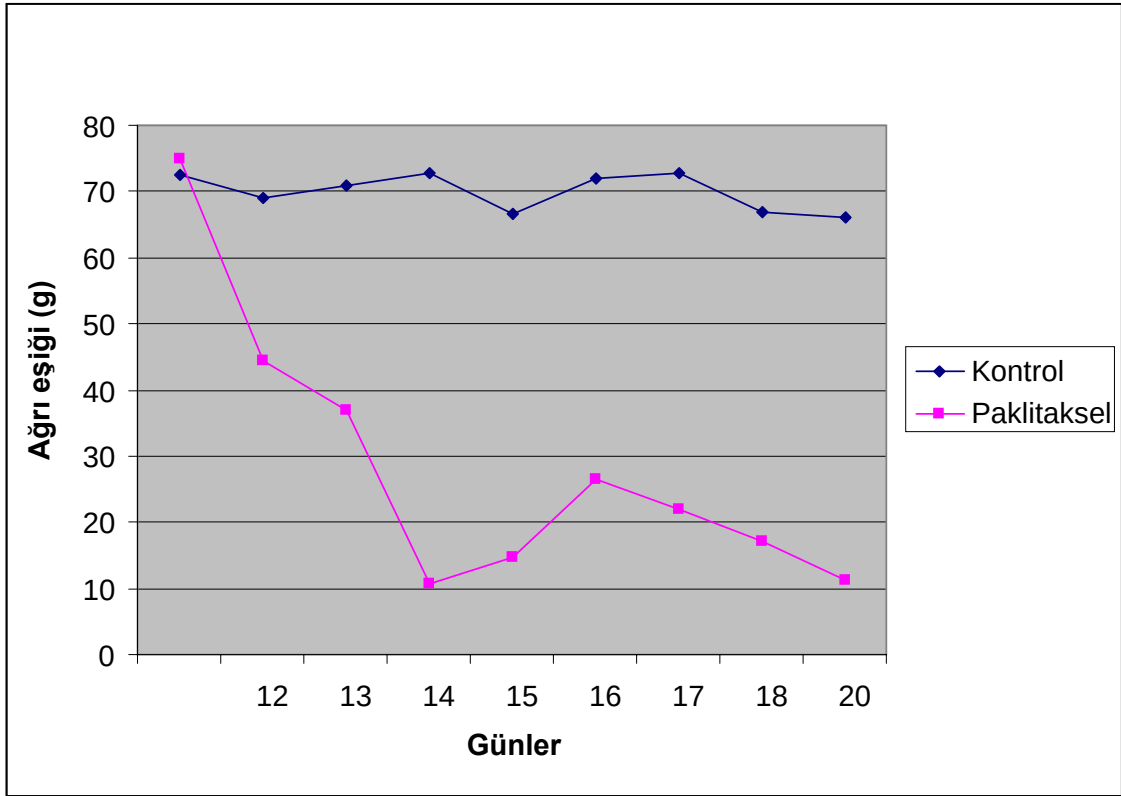
Deneylerden elde edilen değerler ortalama değer $\pm$ standart hata olarak ifade edildi. Gruplar arası farkın önemlilik derecesi one-way ANOVA testi kullanılarak belirlendi. Takibinde Fisher's post-hoc LSD (least significant differences) yapıldı. Tüm istatistiksel işlemler “ SPSS for Windows, 13.0 ” istatistik programında yapıldı ve $p < 0.05$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Birer gün ara ile toplam dört kez 2 mg/kg dozda paklitaksel injekte edilen sıçanlarda ağrı eşiğindeki düşüşün istatistiksel olarak anlamlılık arzettiği, diğer bir deyişle paklitakselin indüklediği nöropatik ağrının ortaya çıktığı günün tespiti için sıçanlar aynı sıçan iki gün üst üste teste tabi tutulmayacak şekilde her gün Randall-Selitto analjeziometre test ekipmanı (Şekil 4) ile teste tabi tutuldu. Son paklitaksel injeksiyonundan (6.gün) sonra her gün ağrı eşiklerinin tespiti için yapılmaya başlanan test sonuçlarına göre ilk paklitaksel injeksiyonundan sonraki 14. güne kadar ağrı eşiklerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş tespit edilemedi. Ancak ilk paklitaksel injeksiyonundan sonraki 14. gün sıçanlarda ağrı eşiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş tespit edildi ve sıçanlarda ağrılı uyarana karşı gelişen bu hassasiyetin 110 gün süreyle devam ettiği görüldü (Tablo 1, 3 ve Şekil 5, 7).

Tablo 1. Tek kür paklitaksel alan sıçanlarda nöropatik ağrının tespit edilmesi için yapılan test sonuçları (Tedavi öncesinde paklitaksel uygulanan bütün sıçanlarla yapılan test sonuçlarıdır).

Günler	Hayvan Sayısı (n)	Ağrı eşiği (g)	P
0	6	75	-
12	6	44,3±26,4	>0,05
13	3	37±33	>0,05
14	6	10,8±4,2	<0,05
15	5	14,6±2,9	<0,05
16	6	26,5±13,7	<0,05
17	3	22±14	<0,05
18	4	17,2±7,8	<0,05
20	4	11,2±2,8	<0,05



Şekil 5. Tek kür paklitaksel alan sıçanlarda nöropatik ağrının başladığı günün ve ağrı eşiklerindeki değişiminin tespiti.

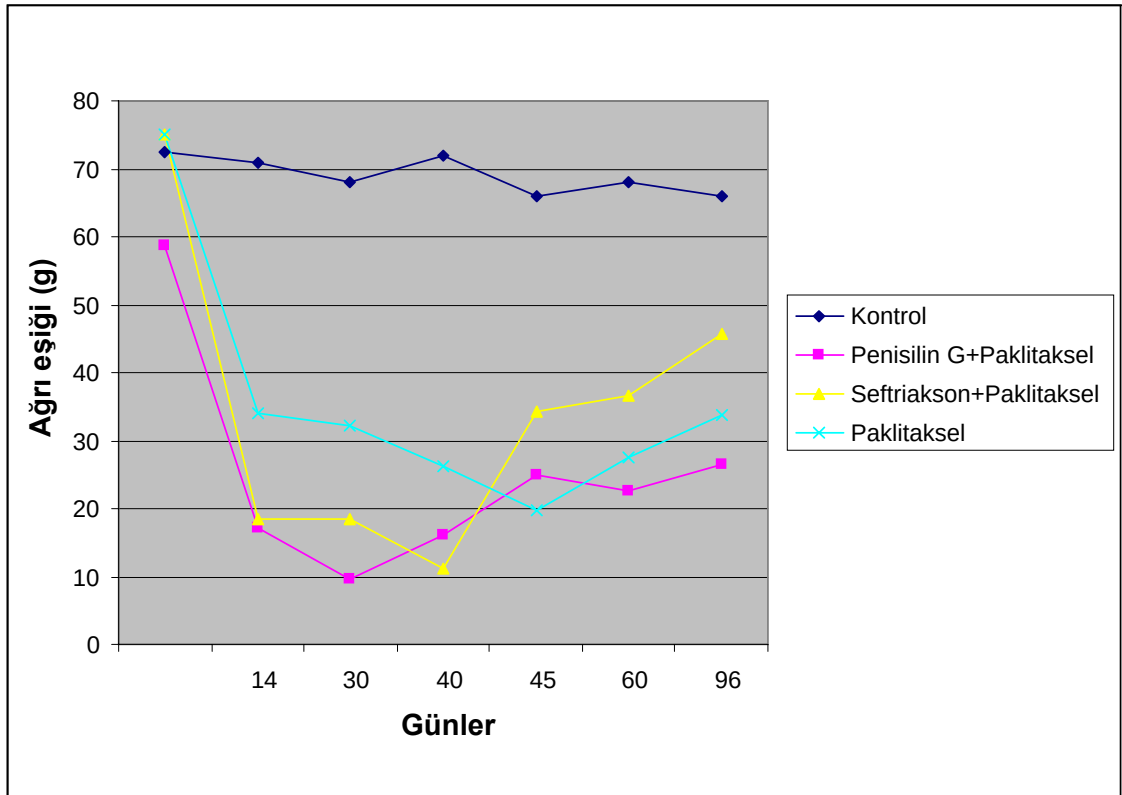
Yapılan ön çalışmalarda paklitakselle indüklenen nöropatiye bağlı gelişen ağrılı uyarana karşı hassasiyetin (hiperaljezinin) ilk injeksiyondan 30 gün sonra en şiddetli hale gelmesi nedeniyle, bu hassasiyetin tedavisinde muhtemel etkinliklerini tespit etmeye çalıştığımız β -laktam antibiyotiklerden penisilin G ve seftriaksonun injeksiyonlarına bu günde başlanmıştır ve tedaviye 10 gün boyunca devam edilmiştir. Penisilin G ve seftriaksonun her ikisinin de tedaviye başladıktan 66 gün sonra analjezik etkileri istatistiksel olarak anlam ifade etmiştir (Tablo 2 ve Şekil 6).

Tablo 2. Tek kür paklitaksel alan hayvanlarda ilk paklitaksel injeksiyonundan sonraki 0-96. günler arasında sıçanlara yapılan analjeziometre test sonuçları (30-40. günler arasında β -laktam tedavisi uygulanmıştır, değerler gram cinsinden ağırlığı göstermektedir).

Gruplar	0. gün	14.gün	30. gün	40.gün	45. gün	60. gün	96. gün
Pen G + PTX (n=6)	58,7 $\pm$ 32,5	17,2 $\pm$ 6,3	9,5 $\pm$ 3,6	16,2 $\pm$ 5,5	25 $\pm$ 12,4	22,7 $\pm$ 8	26,6 $\pm$ 25,4*
Sef + PTX (n=6)	75	18,5 $\pm$ 5,3	18,5 $\pm$ 7,7	11,2 $\pm$ 1,5	34,2 $\pm$ 22,5	36,7 $\pm$ 19,6	45,7 $\pm$ 24,1*
PTX kontrol (n=6)	75	34 $\pm$ 36	32,2 $\pm$ 29,9	26,2 $\pm$ 28,8	19,7 $\pm$ 21,5	27,6 $\pm$ 26,5	33,7 $\pm$ 20,1

sef: seftriakson, pen G: penisilin G, PTX: paklitaksel

* 30. gün ölçülen ağrı eşiklerinden istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık arzeden ağrı eşiği değerlerini göstermektedir ($p<0,05$)



Şekil 6. İlk paklitaksel injeksiyonundan sonraki 0-96. günler arasında sıçanlara yapılan analjeziometre test sonuçları.

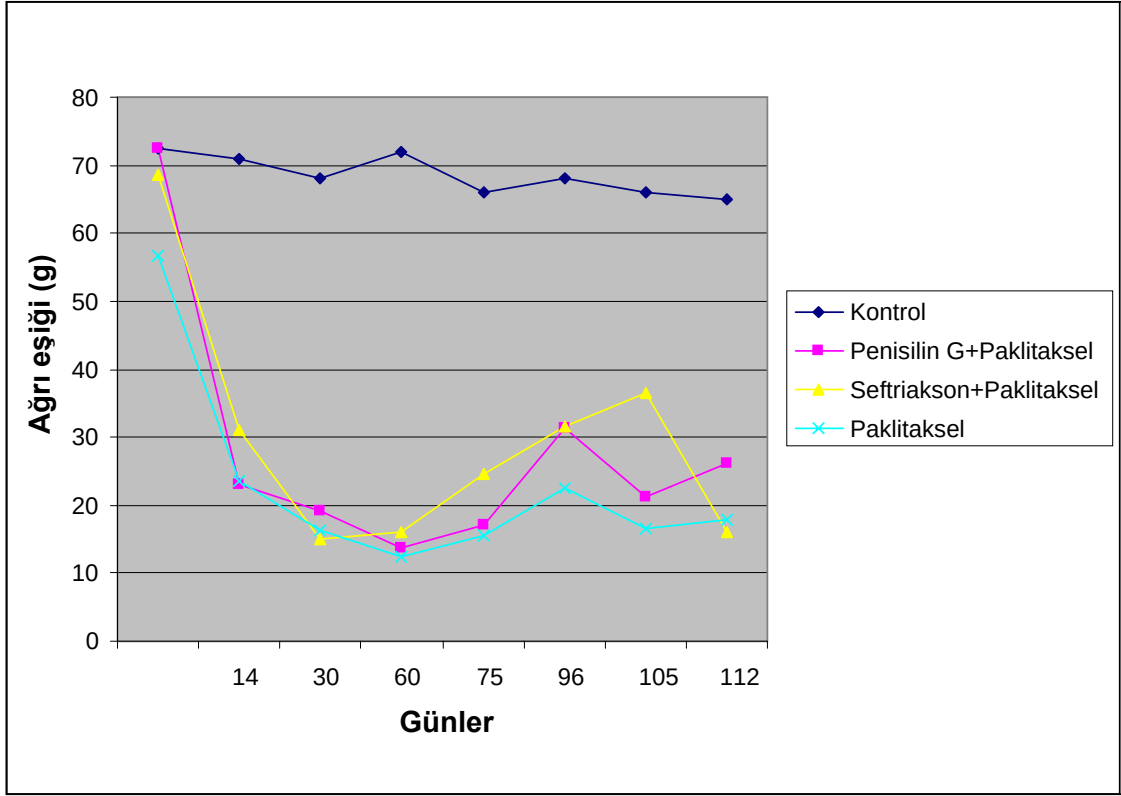
Tek kür paklitaksel ile indüklenen nöropatik ağrıya benzer şekilde iki kür paklitaksel uygulaması ile indüklenen nöropatik ağrıda da penisilin G ve seftriakson tedaviye başladıktan 66 gün sonra istatistiksel olarak anlamlı bir analjezik etki oluşturmuştur. Penisilin G'nin analjezik etkisi 105. günde, seftriaksonun ise 112 günde istatistiksel anlamını yitirmiştir (Tablo 3 ve Şekil 7).

Tablo 3: Bir ay ara ile toplam iki kür paklitaksel injeksiyonundan sonra 0-112. günler arasında sıçanlara yapılan analjeziometre test sonuçları (değerler gram cinsinden ağırlığı göstermektedir).

Gruplar	0. gün	14. gün	30. gün	60. gün	75. gün	96. gün	105. gün	112. gün
Pen G + PTX (n=6)	72,5±3	23±13,11	19,1±6,9	13,8±2,1	17±4,2	31,3±12*	21,3±6,7	26,1±7
Sef + PTX (n=6)	68,5±14	31±15,8	15±3,79	16±6,4	24,5±9,2	31,6±1*	36,5±11*	16±3,5
PTX (n=6)								
kontrol (n=6)	56,7±24	23,6±6.1	16,4±3.4	12,4±1,51	15,6±4,7	22,6±7	16,6±3,6	17,8±4
Kontrol (n=6)	72,5±13	71,6±12	68±14	72±8,5	66±6,8	68±9	66±11	65±5,7

sef: seftriakson, pen G: penisilin G, PTX: paklitaksel

* 30. gün ölçülen ağrı eşiklerinden istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık arzeden ağrı eşiği değerlerini göstermektedir (p<0,05)



Şekil 7: Bir ay ara ile toplam iki kez paklitaksel injeksiyonundan sonra 0-112. günler arasında sıçanlara yapılan analjeziometre test sonuçları.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, β -laktam antibiyotiklerden penisilin G ve seftriaksonun paklitakselle oluşturulan hiperaljezide analjezik etkileri araştırılmıştır. *Taxus brevifolia* (pasifik porsuk ağacı) isimli bitkiden elde edilen paklitaksel, mitoz mekiği kontraktıl proteinlerini oluşturan mikrotübülleri stabilize edip, mitozu G2 fazında durdurarak etki gösteren^{79,80} ve solid tümörlerin (meme kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, over kanseri, Kaposi sarkomu) tedavisinde kullanılan, bitkisel kaynaklı sitostatik bir ilaçtır. Bu ilacın doz kısıtlayan en önemli yan etkileri sebep olduğu nöropati ile bu nöropatiye eşlik eden nöropatik ağrı sendromu ve miyelosupresyondur^{81,82}. Genel olarak kemoterapi tedavisine bağlı nöropatik ağrı gelişen hastaların yüzdesi ile ilgili epidemiyolojik bir veri bulunmamasına rağmen çeşitli raporlar özellikle yüksek doz tedavi gerektiren hastaların %25 – 50’sinin bahsedilen nöropatik ağrıdan etkilendiğini göstermektedir⁸⁴. Bizim kullandığımız deneysel modelde ise paklitaksel ile muamele edilen sağlıklı sıçanların tamamında nöropatik ağrı gelişmiştir.

Bahsedilen nöropati ve takip eden nöropatik ağrının insidansı, ilacın kümülatif dozu ile diyabet, alkolizm ve diğer antineoplastik ajanlarla kombine tedavi gibi nörotoksik fakatörlerin eşzamanlı varlığına bağlıdır⁸³. Örneğin diyabetli hastalarda paklitaksel ve diğer antikanser ajanlarla indüklenen nöropatik ağrı daha sık görülmekte ve daha şiddetli seyretmektedir. Ayrıca önceden vinkristin veya sisplatin tedavisi uygulanmış hastalarda paklitaksel tedavisi sonrası şiddetli sensorimotor polinöropati gelişebilmektedir. Ancak bu tez için yapılan çalışmalarda son paklitaksel kemoterapisinden 30 gün sonra ikinci kez kemoterapi uygulanan sıçanlarla sadece bir kez paklitaksel kemoterapisi alan sıçanlar arasında hiperaljezinin şiddeti açısından fark görülememiştir (Tablo 2, 3 ve Şekil 6, 7).

Paklitakselin indüklediği nöropatinin bu ilacın duysal nöropati, aksonopati, dorsal kök gangliyonopatisi ve schwann hücre anormallığı oluşturma etkilerinin bileşkesi olarak ortaya çıktığı tahmin edilmektedir⁸⁸. Ancak bahsedilen nöropatik ağrıya zemin hazırlayan nöropatinin sebebi kesin olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte mikrotübül stabilizasyonuna bağlı olarak gelişen aksonal taşımadaki bozukluklar⁸⁵ ve mitokondriyel disfonksiyonun⁸⁶ bu patolojik olayın altında yatan sebep olduğu düşünülmektedir.

Paklitakselin yol açtığı nöropatik ağrı sendromunun hastaların yaşam kalitesini ileri derecede azaltması nedeniyle onkologların paklitaksel dozunu düşürmesine bağlı olarak tedavi etkinliğinin ve başarısının düşmesi bilim insanlarını bu ağrının tedavisi için mesai harcamaya yönlendirmiştir. Yapılan bir çalışmada ibuprofen, rofekoksib ve talidomidin profilaktik olarak uygulanmasının (kemoterapötikle birlikte) vinkristinle oluşturulan mekano-allodiniyi engelleyebildiği gösterilmiştir¹⁰³. Bu koruyucu etkinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak non-steroidal antiinflatuar ilaçların genel olarak bu tür ağrı üzerinde terapötik etki oluşturmadığı bilinmektedir. Yüksek doz morfin uygulaması da bu tür ağrının azaltılmasında ancak kısmi bir fayda sağlayabilmiştir. Non-steroid antiinflatuarlar ve opioid analjeziklerin kemoterapiyle indüklenen ağrıda tedavi etkinliği gösterememesi dolayısıyla farklı birçok ilaç grubu ile tedavi amaçlı klinik ve pre-klinik denemeler yapılmıştır. Bu çalışmalarda paklitakselle indüklenen nöropatinin altında yattığı tahmin edilen çeşitli mekanizmalar göz önünde bulundurularak farklı ilaç grupları tedavi amaçlı denenmiştir. Yapılan çalışmalarda antikonvülsan etkinlik gösteren topiramat (20 mg/kg, p.o.), Na⁺ kanal blokeri meksiletin (30 mg/kg, i.p.), NMED-126⁸⁴ (N ve T tip kalsiyum kanal blokeri; 4 gün boyunca 30 mg/kg, p.o.), etosüksimid⁹¹ (T tip kalsiyum kanal blokeri; 3 gün boyunca 100 veya 300

mg/kg, i.p.) ve gabapentin⁹² ($\alpha 2\delta 1$ altbirimine bağlanarak etki gösterdiği düşünülmekte, 100 mg/kg, i.p.) paklitakselle indüklenen mekanoallodini ve mekanohiperaljezinin tedavisinde kısmen etkili bulunmuştur. Hacımüftüoğlu ve ark.¹⁰⁴ yaptığı bir çalışmada ağrı ile yakından ilişkilendirilen $\alpha 2$ -adrenoseptör agonistlerinin, paklitakselle gelişen ağrı eşiğindeki düşüş üzerine etkisi tespit edilmeye çalışılmış ve $\alpha 2$ -adrenerjik agonistler deksmedetomidin ve klonidin bu ağrının tedavisinde kısmen etkili bulunmuştur. Bu tedavi yaklaşımlarının yanında venlafaksin gibi serotonin ve noradrenalin geri alım inhibitörleri (sNaRI), mirtazapin gibi noradrenerjik ve spesifik serotonerjik antidepresanlar (NaSSA) ve reboksetin gibi noradrenalin geri alım inhibitörleri ile tedavi amaçlı çalışmaları da yapılmaktadır⁸⁸.

MSS'nin majör eksitatör nörotransmitteri glutamatin hücre dışında artmış düzeylerinin MSS ile ilgili önemli hastalıklar; amyotrofik lateral skleroz (ALS), omurilik zedelenmesi, epilepsi, Alzheimer ve serebral iskemiyle yakından ilişkilendirilmektedir. Paklitakselle indüklenen nöropatik ağrıda rolü olduğunu düşündüğümüz glutamatin, hücre dışı ortamda birikerek hem toksisiteye neden olacak aşırı uyarılmaya hem de ağrıya ilgili uyarıların sinaptik iletim sırasında ampfilie edilmesine neden olacak düzeylere ulaşmasını, bu amino asiti nöronlara ve astrositlere geri taşımak suretiyle engelleyen yüksek afiniteli taşıyıcı proteinlerin (GLAST ve GLT1) ekspresyonunun paklitaksel ile indüklenen hiperaljezi süresince azaldığının tespit edilmesi bizi bu çalışmayı yapmaya yönlendiren önemli verilerdir^{94,95}. Daha sonra Hacımüftüoğlu ve ark.¹⁰⁴ yaptığı çalışmalarda sıçanlarda paklitaksel ve vinkristin ile oluşturulan nöropatik ağrı modellerinde, beyindeki ağrı ile ilişkili bölgeler (somatosensori korteks, posterior intralaminar nukleus) glutamat taşıyıcı aktivitesi bakımından in vivo voltametrik metodla teste tabi tutulmuş ve ağrı eşiğinde düşüşün

tespit edildiği sıçanlarda bu bölgelerdeki glutamat taşıyıcı aktivitesinin kontrol grubu sıçanlara oranla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmış olduğu tespit edilmiştir. Birbirini destekleyen bu verilere 2005 yılında Rothstein ve ark.⁹⁶ tarafından Nature dergisinde yayınlanan çalışmada glutamat taşıyıcı protein GLT-1'in glutamat taşıma aktivitesinin β -laktam antibiyotikler (penisilin deriveleri ; amoksisilin, bakampisilin, ampisilin ve nafsilin ile sefalosporinler; seftriakson, sefoperazol, sefadroksil ve sefalotin) ile 2-6 katı ve GLT-1 sayısının ise 3 katı oranında kalıcı olarak (seftriakson tedavisinden 3 ay sonrasına kadar) artırıldığıının gösterilmesi ve daha sonra bu bulguyu destekleyen birçok çalışmanın⁹⁷⁻¹⁰⁰ yapılması bizi bakterilerin bazı fizyolojik fonksiyonlarını etkileyerek antibakteriyel etkinlik gösteren β -laktam antibiyotiklerden bir ağrı modelinde analjezik etkinlik ümit etmeye ve bu çalışmayı yapmaya yönlendiren altyapıyı oluşturmuştur.

β -laktam antibiyotiklerin tedavi potansiyellerini tespit etmek amacıyla daha önceki tedavi yöntemi geliştirmeye yönelik prelinik çalışmalarda da kullanılan bir metodla, paklitaksel ile ağrı duyarlılık artışı çalışmamızdaki deney hayvanlarında oluşturulmaya çalışılmış ve %100 başarı sağlanmıştır. Model gereği yapılan ilk paklitaksel enjeksiyonundan sonraki 14 gün boyunca ağrı eşiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş tespit edilememiş ve ilk enjeksiyondan sonra 20 gün boyunca ara verilmeden yapılan aneljeziometre testleri ile takip edilen ağrı eşiğindeki düşüş ancak 14. günden sonra istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermiştir (Tablo 1 ve Şekil 5). Paklitaksel enjeksiyonu öncesi 75 g olan ortalama ağrı eşiği değeri 12. gün $44,3 \pm 26,4$, 13. gün 37 ± 33 ve 14. gün istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık arzeden $10,8 \pm 3,2$ 'ye düşmüştür. Bu durum bize glutamat taşıyıcılarının paklitaksel enjeksiyonuna bağlı nöronal hasar sonrası hemen azalma göstermediği ve bu

taşıyıcıların yaklaşık iki hafta sonra anlamlı düzeyde azaldığını düşünmeye sevk etmiştir. Bu düşünce Sung ve ark.¹⁰⁶ omuriliğin dorsal boynuzunda GLAST, GLT-1 ve EAAC1 glutamat taşıyıcı seviyelerinin kronik sinir sıkışmasına bağlı gelişen hasarda ilk 5 gün boyunca yükseldiğini ancak 7-14. günlerde bu proteinlerin sayısının azaldığını gösterdikleri çalışmayla paralellik arz etmektedir. Başlangıçta glutamat taşıyıcılarındaki sayıca artışın, ilk paklitaksel injeksiyonu ile birlikte gelişen nöropatiye bağlı olarak nöronlarda meydana gelen aşırı glutamat deşarjıyla yükselme gösteren hücre dışı glutamat konsantrasyonunu azaltmaya yönelik bir pozitif feedback mekanizması⁷ olarak geliştiği düşünülmektedir. Bu pozitif feedback mekanizmasının 14. günden sonra glutamat taşıyıcı sayısında meydana gelen azalmayı dengelemeye muktedir olamaması ile birlikte ağrı eşiğindeki düşüş bu günden sonra devam etmiş ve ilk dozu takip eden 30. gün sıçanların ağrı eşikleri en düşük seviyeye ulaşmıştır (Tablo 2, 3 ve Şekil 6,7). Bu durum ise omuriliğin dorsal boynuzunda glutamat taşıyıcı proteinlerin sayısındaki azalmanın 30. güne kadar devam ettiğine ve bugünden sonra azalmanın durduğuna dair bir işaret olabilir. Bu çalışmada yukarıda bahsedilen durum göz önünde bulundurularak penisilin G ve seftriakson tedavisine 30. günden itibaren başlanmış ve 10 gün süreyle devam edilmiştir. 14. gün tespit edilebilen ve 30. gün en şiddetli hale gelen ağrı duyarlılığındaki artış ilk injeksiyondan sonra 112. güne kadar devam etmiştir (Tablo 3 ve Şekil 7).

Elde ettiğimiz sonuçlar hem penisilin G hem de seftriaksonun paklitakselle indüklenen nöropatik ağrıda terapötik etkilerinin olduğunu göstermiştir. Paklitakselin hem tek kür hem de iki kür halinde verildiği deney gruplarında gelişen nöropatik ağrıda her iki ilaç da terapötik olarak etkili bulunmuştur. Ancak paklitaksel injeksiyonu ile düşen ağrı eşiğinin β -laktam terapisi ile tamamen geri çevrilememesi glutamat taşıyıcı

aktivitesinin ve sayısının yeteri kadar penisilin G ve seftriakson tedavisi ile yeterince artış göstermediğinin belirtisidir.

Bu çalışmada tedavi amaçlı kullanılan her iki ilacın da terapötik açıdan birbirine yakın oranda etki gösterdiği ancak seftriaksonun analjezik etkisinin penisilin G'den daha uzun süre devam ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuç glutamat taşıyıcılarının ekspresyonunu artırmaya yönelik yapılan çalışmalarda seftriaksonun glutamat taşıyıcı aktivitesini en fazla artıran β -laktam antibiyotik olarak tespit edilmiş olması ile paralellik arz etmektedir. Ayrıca seftriaksonun gen aktivasyonu ile GLT-1 ekspresyonunu artırmasının¹⁰⁵ yanında glutamat taşıyıcılarında aktivite artışını da sağlıyor olması⁹⁶ da seftriaksonun daha uzun etki göstermesinin altında yatan muhtemel sebep olarak düşünülebilir. Seftriaksonun bahsedilen glutamat taşıyıcılarında sağladığı aktivite artışının mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak bilinen odur ki, bahsedilen glutamat taşıyıcı aktivite artışının glutamat taşıyıcı sayısının artışıyla bire bir ilişkisi bulunmamaktadır⁹⁹.

Glutamat taşıyıcı seviyeleri protein fosforilasyonu veya diğer faktörlerle transkripsiyonel veya post-transkripsiyonel seviyelerde regüle edilebilirler. Seftriaksonun özellikle transkripsiyonel ve penisilin G'nin ise translasyonel aşamaları etkileyerek glutamat taşıyıcı sentezini artırdığı¹⁰⁷ düşünülmektedir. Dolayısıyla tedaviye yönelik yapılacak çalışmalarda glutamat taşıyıcı protein sentezinin penisilin G ve seftriaksonun birlikte kullanılmasıyla her iki aşamada da tetiklenmesi paklitakselle indüklenen nöropatik ağrıda terapötik etkinliği artırabilir. Bununla birlikte glutamat taşıyıcı aktivitelerinin çeşitli termodinamik ve kinetik faktörlerle değiştirilebileceği de tahmin edilmektedir. Ancak bugünkü bilgiler dahilinde glutamat taşıyıcı aktivitesindeki artışın, β -laktam antibiyotiklerin hangi termodinamik ve kinetik faktörleri kullanarak

oluşturduğu bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda seftriaksonun, GLT-1 ekspresyonunda artışı sağladığı konsantrasyonlarının MSS infeksiyonlarının tedavisinde ulaştıkları beyin omurilik sıvısı konsantrasyonlarına çok yakın olması⁹⁶ bu ilacın paklitakselle indüklenen nöropatik ağrıda rahatlıkla MSS infeksiyonlarında kullanılan dozlarda kullanılabileceğini göstermektedir.

SONUÇ

Bu tez çalışmasının sonunda paklitakselle tedavisine karar verilen hastalarda profilaktik maksatla tedaviye başlanmadan önce veya tedavi sırasında 10 günlük seftriakson ve/veya penisilin G uygulanması ile paklitaksele bağlı gelişecek nöropatik ağrının önüne geçilip hastanın hayat kalitesindeki bozulma önlenip nöropatik ağrı nedeniyle gidilmesi gerekebilecek muhtemel bir doz kısıtlamasına mani olunabileceği öngörülebilir.

Yapılan bu çalışma ayrıca etyolojisinde glutamat düzey değişimlerinin yattığı düşünülen ALS, Huntigton, Alzheimer, inme ve nöropatik ağrı gibi hastalıklarda β -laktam antibiyotiklerin faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

DESTEKLER

Bu çalışma Tübitak 107S067 nolu proje ve Atatürk Üniversitesi 2008/126 nolu Bilimsel Araştırma projeleri tarafından desteklenmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Hertz L. Glutamate, a neurotransmitter - and so much more - a synopsis of Wierzba III. *Neurochem Int* 2006;48:416-25.
2. Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Rev* 1999;29:83-120.
3. Kullmann DM, Asztely F, Walker MC. The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1551-61.
4. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 2004;44:5-21.
5. Donoso AO, Lopez FJ, Negrovilar A. Glutamate Receptors of the Non-Normal-Methyl-D-Aspartic Acid Type Mediate the Increase in Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone-Release by Excitatory Amino-Acids Invitro. *Endocrinology* 1990;126:414-20.
6. Moriyama Y, Hayashi M, Yamada H, Yatsushiro S, Ishio S, Yamamoto A. Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones. *J Exp Biol* 2000;203:117-25.
7. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001;65:1-105.
8. Coutinho SV, Urban MO, Gebhart GF. Role of glutamate receptors and nitric oxide in the rostral ventromedial medulla in visceral hyperalgesia. *Pain* 1998;78:59-69.
9. Skyba DA, King EW, Sluka KA. Effects of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptor antagonists on the development and maintenance of

- hyperalgesia induced by repeated intramuscular injection of acidic saline. *Pain* 2002;98:69-78.
10. Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int* 2007;51:333-55.
 11. Kanner BI. Glutamate Transporters from Brain - a Novel Neurotransmitter Transporter Family. *Febs Lett* 1993;325:95-9.
 12. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998;54:581-618.
 13. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog Biophys Mol Bio* 2004;86:279-351.
 14. Tapia R, Medina-Ceja L, Pena F. On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochem Int* 1999;34:23-31.
 15. Omote K, Kawamata T, Kawamata M, Namiki A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. *Brain Res* 1998;787:161-4.
 16. Carlton SM. Peripheral excitatory amino acids. *Curr Opin Pharmacol*. 2001;1:52-6.
 17. Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 1999;57:417-28.
 18. Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD. II. Glutamine and glutamate. *Biomed Pharmacother* 2002;56:446-57.
 19. Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, Parpura V. Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 2004;24:2633-42.

20. Bleakman D, Alt A, Nisenbaum ES. Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol* 2006;17:592-604.
21. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999;51:7-61.
22. Kew JN, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* 2005;179:4-29.
23. Matthews JC, Anderson KJ. Recent advances in amino acid transporters and excitatory amino acid receptors. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:77-84.
24. Michaelis EK. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 1998;54:369-415.
25. Bleakman D, Lodge D. Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 1998;37:1187-204.
26. Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff EL, Martin SJ, Bridge H, et al. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci* 1999;2:898-905.
27. Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology*. New York: Lange Medical Books, 2007.
28. Galan A, Laird JM, Cervero F. In vivo recruitment by painful stimuli of AMPA receptor subunits to the plasma membrane of spinal cord neurons. *Pain* 2004;112:315-23.
29. Garry EM, Fleetwood-Walker SM. A new view on how AMPA receptors and their interacting proteins mediate neuropathic pain. *Pain* 2004;109:210-3.

30. Hartmann B, Ahmadi S, Heppenstall PA, Lewin GR, Schott C, Borchardt T, et al. The AMPA receptor subunits GluR-A and GluR-B reciprocally modulate spinal synaptic plasticity and inflammatory pain. *Neuron* 2004;44:637-50.
31. Nozaki-Taguchi N, Yaksh TL. Pharmacology of spinal glutamatergic receptors in post-thermal injury-evoked tactile allodynia and thermal hyperalgesia. *Anesthesiology* 2002;96:617-26.
32. Pogatzki EM, Zahn PK, Brennan TJ. Effect of pretreatment with intrathecal excitatory amino acid receptor antagonists on the development of pain behavior caused by plantar incision. *Anesthesiology* 2000;93:489-96.
33. Pogatzki EM, Niemeier JS, Sorkin LS, Brennan TJ. Spinal glutamate receptor antagonists differentiate primary and secondary mechanical hyperalgesia caused by incision. *Pain* 2003;105:97-107.
34. Patel DR, Croucher MJ. Evidence for a role of presynaptic AMPA receptors in the control of neuronal glutamate release in the rat forebrain. *Eur J Pharmacol* 1997;332:143-51.
35. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Hacettepe Taş, 2005.
36. Yamakura T, Shimoji K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 1999;59:279-98.
37. Ikeda K, Nagasawa M, Mori H, Araki K, Sakimura K, Watanabe M, et al. Cloning and expression of the epsilon 4 subunit of the NMDA receptor channel. *Febs Lett* 1992;313:34-8.

38. Vyklicky L, Jr., Benveniste M, Mayer ML. Modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. *J Physiol* 1990;428:313-31.
39. Ascher P, Nowak L. Early biophysics of the NMDA receptor channel. *J Physiol* 2009;587:4563-4.
40. Chen L, Huang LY. Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 1992;356:521-3.
41. Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:39-47.
42. Hardingham GE. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans* 2009;37:1147-60.
43. Gibb AJ, Colquhoun D. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by L-glutamate in cells dissociated from adult rat hippocampus. *J Physiol* 1992;456:143-79.
44. Chizh BA, Cumberbatch MJ, Herrero JF, Stirk GC, Headley PM. Stimulus intensity, cell excitation and the N-methyl-D-aspartate receptor component of sensory responses in the rat spinal cord in vivo. *Neuroscience* 1997;80:251-65.
45. Kalia LV, Kalia SK, Salter MW. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurol* 2008;7:742-55.
46. Parsons CG. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2001;429:71-8.
47. Bennett GJ. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: focus on the NMDA-receptor. *J Pain Symptom Manage* 2000;19:S2-6.

48. Christoph T, Schiene K, Englberger W, Parsons CG, Chizh BA. The antiallodynic effect of NMDA antagonists in neuropathic pain outlasts the duration of the in vivo NMDA antagonism. *Neuropharmacology* 2006;51:12-7.
49. Crowder TL, Ariwodola OJ, Weiner JL. Kainate receptor activation potentiates GABAergic synaptic transmission in the nucleus accumbens core. *Brain Res* 2006;1088:73-82.
50. Huettner JE. Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 2003;70:387-407.
51. Gereau RW. *The Glutamate Receptors*. Totowa: Humana Press, 2008.
52. Li P, Wilding TJ, Kim SJ, Calejesan AA, Huettner JE, Zhuo M. Kainate-receptor-mediated sensory synaptic transmission in mammalian spinal cord. *Nature* 1999;397:161-4.
53. Simmons RM, Li DL, Hoo KH, Deverill M, Ornstein PL, Iyengar S. Kainate GluR5 receptor subtype mediates the nociceptive response to formalin in the rat. *Neuropharmacology* 1998;37:25-36.
54. Palecek J, Neugebauer V, Carlton SM, Iyengar S, Willis WD. The effect of a kainate GluR5 receptor antagonist on responses of spinothalamic tract neurons in a model of peripheral neuropathy in primates. *Pain* 2004;111:151-61.
55. Sang CN, Hostetter MP, Gracely RH, Chappell AS, Schoepp DD, Lee G, et al. AMPA/kainate antagonist LY293558 reduces capsaicin-evoked hyperalgesia but not pain in normal skin in humans. *Anesthesiology* 1998;89:1060-7.
56. Bordi F, Ugolini A. Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. *Prog Neurobiol* 1999;59:55-79.

57. Schkeryantz JM, Kingston AE, Johnson MP. Prospects for metabotropic glutamate 1 receptor antagonists in the treatment of neuropathic pain. *J Med Chem* 2007;50:2563-8.
58. Albasanz JL, Ros M, Martin M. Characterization of metabotropic glutamate receptors in rat C6 glioma cells. *Eur J Pharmacol* 1997;326:85-91.
59. Byrnes KR, Loane DJ, Faden AI. Metabotropic glutamate receptors as targets for multipotential treatment of neurological disorders. *Neurotherapeutics* 2009;6:94-107.
60. Pellicciari R, Costantino G. Metabotropic G-protein-coupled glutamate receptors as therapeutic targets. *Curr Opin Chem Biol* 1999;3:433-40.
61. Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1987;7:369-79.
62. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:657-68.
63. Akaike A, Katsuki H, Kume T, Maeda T. Reactive oxygen species in NMDA receptor-mediated glutamate neurotoxicity. *Parkinsonism Relat Disord* 1999;5:203-7.
64. Balcar VJ. Molecular pharmacology of the Na⁺-dependent transport of acidic amino acids in the mammalian central nervous system. *Biol Pharm Bull* 2002;25:291-301.
65. Benarroch EE. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc* 2005;80:1326-38.
66. Tanaka K. Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci Res* 2000;37:15-9.

67. Anderson CM, Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 2000;32:1-14.
68. Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;45:250-65.
69. Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* 2008;137:473-7.
70. Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 2004;1000:40-56.
71. Willis WD, Westlund KN. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 1997;14:2-31.
72. Barber D. The physiology and pharmacology of pain: a review of opioids. *J Perianesth Nurs* 1997;12:95-9.
73. Bromm B, Lorenz J. Neurophysiological evaluation of pain. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1998;107:227-53.
74. Ganong WF. Review of Medical Physiology. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2002.
75. Rice SC. Pain mechanisms and pathways. *Current Anaesthesia & Critical Care* 1999;10(2):98-104.
76. Işık G. Anesteziyoloji Ders Notları. Çukurove Üniversitesi Anesteziyoloji Anabilim Dalı.
77. Koltzenburg M. Painful neuropathies. *Curr Opin Neurol* 1998;11:515-21.
78. Lüllman H. Color Atlas of Pharmacology. Ankara: Palme Yayıncılık, 2001.
79. Kumar N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *J Biol Chem* 1981;256:10435-41.

80. Peltier AC, Russell JW. Recent advances in drug-induced neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2002;15:633-8.
81. Argyriou AA, Koltzenburg M, Polychronopoulos P, Papapetropoulos S, Kalofonos HP. Peripheral nerve damage associated with administration of taxanes in patients with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:218-28.
82. Kannarkat G, Lasher EE, Schiff D. Neurologic complications of chemotherapy agents. *Curr Opin Neurol* 2007;20:719-25.
83. Pascual D, Goicoechea C, Suardiaz M, Martin MI. A cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, reduces neuropathic nociception induced by paclitaxel in rats. *Pain* 2005;118:23-34.
84. Xiao W, Naso L, Bennett GJ. Experimental studies of potential analgesics for the treatment of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. *Pain Med* 2008;9:505-17.
85. Shemesh OA, Spira ME. Paclitaxel induces axonal microtubules polar reconfiguration and impaired organelle transport: implications for the pathogenesis of paclitaxel-induced polyneuropathy. *Acta Neuropathol* 119:235-48.
86. Flatters SJ, Bennett GJ. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain* 2006;122:245-57.
87. Dougherty PM, Cata JP, Cordella JV, Burton A, Weng HR. Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. *Pain* 2004;109:132-42.

88. Batmazoğlu M, Evrensel T, Manavoğlu O, Kanat Ö, Sığırlı D. Kemoterapiye bağlı gelişen nöropatiye karşı venlafaksinin koruyucu etkinliğinin araştırılması. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2008;28:425-36.
89. Wolf S, Barton D, Kottschade L, Grothey A, Loprinzi C. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. Eur J Cancer 2008;44:1507-15.
90. Perret D, Luo ZD. Targeting voltage-gated calcium channels for neuropathic pain management. Neurotherapeutics 2009;6:679-92.
91. Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. Pain 2004;109:150-61.
92. Xiao W, Boroujerdi A, Bennett GJ, Luo ZD. Chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy: analgesic effects of gabapentin and effects on expression of the alpha-2-delta type-1 calcium channel subunit. Neuroscience 2007;144:714-20.
93. Weng HR, Chen JH, Cata JP. Inhibition of glutamate uptake in the spinal cord induces hyperalgesia and increased responses of spinal dorsal horn neurons to peripheral afferent stimulation. Neuroscience. 2006;138:1351-60.
94. Weng HR, Aravindan N, Cata JP, Chen JH, Shaw AD, Dougherty PM. Spinal glial glutamate transporters downregulate in rats with taxol-induced hyperalgesia. Neurosci Lett 2005;386:18-22.
95. Cata JP, Weng HR, Chen JH, Dougherty PM. Altered discharges of spinal wide dynamic range neurons and down-regulation of glutamate transporter expression in rats with paclitaxel-induced hyperalgesia. Neuroscience 2006;138:329-38.

96. Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, et al. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 2005;433:73-7.
97. Hu Y, Li W, Lu L, Cai J, Xian X, Zhang M, et al. An anti-nociceptive role for ceftriaxone in chronic neuropathic pain in rats. *Pain* 148:284-301.
98. Lee SG, Su ZZ, Emdad L, Gupta P, Sarkar D, Borjabad A, et al. Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *J Biol Chem* 2008;283:13116-23.
99. Lipski J, Wan CK, Bai JZ, Pi R, Li D, Donnelly D. Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke. *Neuroscience* 2007;146:617-29.
100. Rawls SM, Zielinski M, Patel H, Sacavage S, Baron DA, Patel D. Beta-lactam antibiotic reduces morphine analgesic tolerance in rats through GLT-1 transporter activation. *Drug Alcohol Depend* 107:261-3.
101. Özbek H, Tuncer İ, Dülger H, Uğraş S, Bayram İ, Türkdoğan K, et al. E Vitamini, N-Asetil Sistein, Penisilin-G ve Urtica dioica L.'nin Phalloidin Toksisitesi Üzerine Etkileri. *Van Tıp Derg* 2005;12:16-21.
102. Thone-Reineke C, Neumann C, Namsolleck P, Schmerbach K, Krikov M, Scheffé JH, et al. The beta-lactam antibiotic, ceftriaxone, dramatically improves survival, increases glutamate uptake and induces neurotrophins in stroke. *J Hypertens* 2008;26:2426-35.
103. Cata JP, Weng HR, Dougherty PM. Cyclooxygenase inhibitors and thalidomide ameliorate vincristine-induced hyperalgesia in rats. *Cancer Chemother and Pharmacol* 2004;54:391-7.

104. Hacimuftuoglu A, Saruhan F, Suleyman H, Halici Z, Cadirci E, Cetin D, et al. Paclitaxel induced pain and its character. *European Neuropsychopharmacol* 2009;19:S281-S.
105. Su ZZ, Leszczyniecka M, Kang DC, Sarkar D, Chao W, Volsky DJ, et al. Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: Cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:1955-60.
106. Sung B, Lim G, Mao J. Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 2003; 23:2899-910.
107. Tian G, Lai L, Guo H, Lin Y, Butchbach ME, Chang Y, Lin CL. Translational control of glial glutamate transporter EAAT2 expression. *J Biol Chem* 2007;282:1727-37.