



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**OPİORFİNİN NOSİSEPTİF KALSİYUM
SİNYALLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN *in vitro*
OLARAK SIÇAN DUYUSAL SİNİR
HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI**

Ömer Faruk KALKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof.Dr. Ahmet AYAR

TRABZON-2011

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

25.07.2011

Ömer Faruk KALKAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecinde desteğini ve emeğini esirgemeyen saygın bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, değerli hocam sayın Prof. Dr. Ahmet AYAR başta olmak üzere bütün Fizyoloji AD öğretim üyelerine teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü desteğini esirgemeyen değerli aileme saygı ve sevgilerimle.

Ömer Faruk KALKAN

İÇİNDEKİLER**Sayfa No**

KABUL ve ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ

ŞEKİLLER DİZİNİ

SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Ağrı Kavramı	5
4.2. Ağrı Terminolojisi	5
4.3. Ağrının Sınıflandırılması	6
4.3.1. Akut Ağrı	7
4.3.2. Kronik Ağrı	7
4.3.3. Nosiseptif Ağrı	8
4.4. Nosisepsiyon	8
4.4.1. Nosiseptörler	8
4.4.2. Nosiseptif Süreç	10
4.5. Ağrı İletimi	10
4.6. Ağrı İletim Yolları	12
4.6.1. Spino-Talamik Yol	13
4.6.2. Spino-Retiküler Yol	13
4.6.3. Spino-Mezensefalik Yol	13
4.7. Ağrılı Uyarana Verilen Fizyolojik Cevaplar	15
4.8. İyon Kanallarının Ağrıdaki Rollerini	15
4.8.1. Sodyum Kanalları	16

4.8.2. Potasyum Kanalları	17
4.8.3. Klor Kanalları	18
4.8.4. Kalsiyum Kanalları	18
4.9. Nöronal Kalsiyum Homeostazisi ve Kalsiyum Sinyalleşmesi	19
4.10. Ağrı Oluşumunda Rol Alan Bazı Mediatörler	21
4.10.1. Bradikinin	21
4.10.2. Prostaglandinler	21
4.10.3. Serotonin	21
4.10.4. Sinir Büyütme Faktörü	21
4.10.5. TRP Kanalları	22
4.10.6. Pürinerjik P2X Reseptörleri	22
4.10.7. Opioid Reseptörler	22
4.11. Dorsal Kök Gangliyon Nöronları	22
4.12. Dorsal Kök Gangliyon Nöronlarında Kalsiyumun Rolü	23
4.13. Endojen Analjezik Sistem	23
4.14. Opiorfin	24
4.15. Amaç	25
5. GEREÇ ve YÖNTEM	26
5.1. Kültür Solüsyonları ve Kullanılan Ajanlar	26
5.2. Kültür Vasatı	26
5.3. Hücre Kültürü İçin Genel Prensipler	26
5.4. DKG Hücre Kültürü Protokolü	28
5.5. Kullanılan Ajanlar	29
5.6. Hücre İçi Kalsiyum Görüntüleme ve Görüntü Analizleri	29
5.5. İstatistik	32
6. BULGULAR	33
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	39
8. KAYNAKLAR	42
9. ÖZGEÇMİŞ	48

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo

Sayfa

Tablo 1. Duysal Nöron Tipleri

9

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Ağrı İletim Basamakları	12
Şekil 2. Ağrı İletim Yolları	14
Şekil 3. Nöronal ER Bölgeleri	20
Şekil 4. Opiorfinin Kimyasal Yapısı	25
Şekil 5. Laminer hava akımlı güvenlik kabini	27
Şekil 6. Kalsiyum Görüntüleme Sistemi	31

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER

Kısaltmalar

ADP	Adenozin di-fosfat
APN	Aminopeptidaz N
ATP	Adenozin tri-fosfat
CGRP	Kalsitonin Geni Bağlı Peptid
DKG	Dorsal Kök Gangliyonu
ER	Endoplazmik Retikulum
GABA	Gamma Aminobütrik Asit
IASP	Uluslar Arası Ağrı Araştırmaları Derneği
I.C.V	Intra Cerebro Ventriküler
I.P	Intra Peritoneal
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NEP	Nötral Endopeptidaz
NGF	Sinir Büyütme Faktörü
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
pH	Hidrojen Gücü
RYR	Riyanodin Reseptör
TG	Trigeminal Gangliyon
TRPV	Geçici Reseptör Potansiyel Kanalı
TTX	Tetradotoksin
UV	Ultraviyole
VGCC	Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalı

Simgeler

$[Ca^{2+}]_i$	Hücre İçi Kalsiyum
mEq	Miliequivalent
nm	Nano metre

m	Metre
μ	Mikro
L	Litre
°C	Derece Santigrat
mg	Mili gram
sn	Saniye
vb.	Ve Benzeri
dk	Dakika
ml	Mili litre
>	Büyüktür
<	Küçüktür
&	Ve
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
γ	Gama
Osm	Ozmolarite
K⁺	Potasyum
Ca²⁺	Kalsiyum
Na⁺	Sodyum
Cl⁻	Klor

Formüller

NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
IP₂	İnositol di-fosfat
IP₃	İnositol tri-fosfat
NaHCO₃	Sodyum Bikarbonat

1. ÖZET

OPİORFİNİN NOSİSEPTİF KALSİYUM SİNYALLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN *in vitro* OLARAK SIÇAN DUYUSAL SİNİR HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Ağrı, periferden başlayarak merkezi sinir sistemine iletilen bir süreçtir. Bu süreçte ilk durak olan dorsal kök gangliyon nöronları nosiseptörlerin hücre gövdelerinin lokalize olduğu nöronlardır. Bu nöronlarda, hücre içi serbest Ca^{2+} seviyesindeki artış ağrı iletiminde kritik öneme sahiptir.

Bu çalışmada, sıçan DKG hücre kültüründe opiorfinin hücre içi serbest Ca^{2+} seviyeleri üzerine olan etkisi incelendi. DKG nöronları 1–2 günlük neonatal sıçanlardan elde edilerek, enzimatik ve mekanik işlemlerle izole edildi. Fura-2 ile yüklenen DKG hücrelerinde hücre içi serbest kalsiyum $[Ca^{2+}]_i$ (ex.340/380 nm em.@ 510 nm) düzeyleri dijital mikroskopik görüntü analiz sistemiyle kayıt ve analiz edildi. Kayıt süresi yarım saat olarak belirlendi. Verilerin değerlendirilmesi eşleşmemiş *t* testi ile gerçekleştirildi. $P < 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

Opiorfin ile 30 dakikalık muamele, KCl ile arttırılan sitosolik kalsiyum cevaplarını tamamen inhibe etti. Hücrelerin uyarılma aralıkları olan 340/380 nm dalga boyları oranında, bazal seviye $[0.79 \pm 0.05$ (n=67)] KCl uygulamasından sonra $[30$ mM KCl, $P < 0.05$, (n= 67)] anlamlı bir şekilde arttı. Beşinci dakikaya kadar anlamlı bir düşüş gözlenmezken, 30 dakikalık 100 uM opiorfin uygulanması, oluşan cevapları tamamen ortadan kaldırdı (30 mM KCl + 100 uM opiorphin: 0.78 ± 0.07 , n=55).

Çalışmanın bulguları, opiorfinin membran depolarizasyonu sonucu oluşturulan periferel nosiseptif kalsiyum sinyalleşmesini, duysal nöronlarda inhibe ettiğini gösterdi. Bu etki zaman almasına rağmen, ilaç toleransı ve yan etki göstermemesi bakımından önemli avantajlar sağlamaktadır. Opiorfin ya da opiorfinin uygun türevleri, ağrı tedavisinde umut vaad edici ajanlar olarak görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ağrı, opiorfin, DKG nöronları, kalsiyum, nosisepsiyon

2. SUMMARY

AN *in vitro* INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF OPIORPHIN ON NOCICEPTIVE CALCIUM SIGNALING RAT SENSORY NEURONS

Pain is a process that inceptive from periphery and transmit to central nervous system. Dorsal root ganglions are the first stopping place where the cell bodies of nociceptors are present. Increase of intracellular free calcium levels in these neurons has a key role in pain transmission. In these study, the effects of opiorphin on $[Ca^{2+}]_i$ levels in rat DRG cell culture were examined.

DRGs were removed from 1–2 day old neonatal rats and DRG neurons were isolated by enzymatic and mechanical procedures. Cells were loaded with a fluorescent dye fura-2. Intracellular free calcium $[Ca^{2+}]_i$ (ex.340/380 nm em.@ 510 nm) levels were studied with a microscopic digital image analysis system. All data were analyzed by using unpaired *t* test, *P* <.05 defining statistical significance.

Treatment with opiorphin for 30 minutes caused a complete inhibition of cytosolic calcium responses to KCl (30 mM). The mean 340/380 nm ratio was increased from baseline level of 0.79 ± 0.05 (n=67) to 1.24 ± 0.06 with KCl exposure (30 mM KCl, *P* <0.05, n= 67) which remained without significant change at 5th minute but abolished after 30 minute treatment with 100 uM opiorphin (30 mM KCl + 100 uM opiorphin: 0.78 ± 0.07 , n=55).

We report for the first time in these peripheral nociceptive sensory neurones that opiorphin inhibits membrane depolarisation-induced calcium signalling. Although this effect takes time, considering the fact that opiorphin advantages with respect to the abuse liability and drug tolerance, this agent or its proper derivatives are promising candidates for treatment of pain conditions.

Key words: Pain, opiorphin, DRG neurons, calcium, nociception

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Ağrı, toplumların en yaygın sorunlarından biridir. Hekime başvurma nedenleri arasında ilk sıralarda yer alan ağrı bireyin yaşam kalitesini düşüren ve bireyin gerek fiziksel gerek ruhsal yönden kötü hissetmesine neden olan bir olgudur. Ağrı tedavisi için her yıl büyük bütçeler ayrılmaktadır. Sürekli olarak yeni ağrı kesicilerin piyasaya çıkması ve tedavi ettiği ağrı semptomuna göre değerinin değişmesi, ağrının oldukça karmaşık ve bir o kadar da gerek bireyi gerek sağlıkla ilgili makamları masrafa sokan bir kavram olduğunu göstermektedir. Ağrı tedavisinde kullanılan eksojen ajanların bazı durumlarda yetersiz kalması, kullanılan ilaçlara karşı zamanla organizmada tolerans gelişmesi, ağrı tedavisinde güncel hedefi endojen mekanizmalara doğru yöneltmiştir (1).

Endojen bir kimyasal olan opiorfin, insan tükürüğünden izole edilmiş ve QRFSR pentapeptide olarak adlandırılmıştır (2). Birçok deneysel çalışmada opiorfinin antinosiseptif özellik gösterdiği ortaya konulmuştur. Yapılan *in vivo* çalışmalarda opiorfinin i.c.v (intracerebroventriküler) ve i.p (intraperitoneal) uygulanması analjezik etki göstermiştir. Benzer bulgular *in vitro* çalışmalarda da ortaya konulmuştur. Mekanizması irdelendiğinde ise opiorfinin bu etkinliğini endojen analjezide rol oynayan enkefalinlerin yıkımını engelleyerek ortaya çıkardığı vurgulanmıştır. Bu etkinin ortaya çıkması direkt olarak enkefalin yıkımını engelleyerek değil, enkefalin yıkımlayıcı enzimler olan nötral endopeptidaz (NEP) ve aminopeptidaz (APN)'in aktivasyonunu engelleyerek ortaya çıkmaktadır (2).

Ağrı iletimi, nosiseptörlerce algılanarak periferden başlayan ve santral sinir sistemine iletilen bir süreçtir. Algılanan ağrı sinyalleri, omuriliğe buradan da santral sinir sistemine taşınır. Dorsal kök gangliyon nöronları, ağrı iletiminde primer afferent nöronlar olarak adlandırılan nosiseptörlerin hücre gövdelerinin lokalize olduğu nöronlardır. Ağrı sinyalleri omuriliğe giriş yapmadan önce dorsal kök gangliyonlarından geçmek zorundadır. Periferde nosiseptörlerce algılanan ağrının ilk durak noktası bu nöronlardır. Bir katyon olan ve vücutta birçok fizyolojik süreçte rol oynayan kalsiyum (Ca^{2+}) ağrının iletilmesinde de oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Ağrılı bir uyarının nosiseptörlerce algılanması, bu nöronlarda hücre içi serbest kalsiyum seviyesinde artışa neden olmakta ve böylece ağrının iletilmesi sağlanmaktadır. Bu tez çalışmasında amaç opiorfinin, ağrı iletiminde kritik role sahip olan hücre içi serbest

kalsiyum seviyeleri üzerine olan etkisinin *in vitro* sıçan dorsal kök gangliyon hücre kültüründe araştırılmasıdır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Ağrı Kavramı

İnsanlığın varoluşundan günümüze tanımı yapılmakta zorluk çekilen kavramlardan biri de ağrıdır. Çevre koşulları, bireyin fizyolojik yapısı, genetik faktörler din, ırk ve benzeri kavramların etkisi sonucu ağrının algılanması ve ağrıya verilen cevaplar her toplumda hatta her bireyde farklılık göstermektedir. Bir bireyin ağrı olarak algılamadığı bir uyarı başka bir birey ağrı olarak algılayabilmektedir. Dolayısıyla ağrı her zaman bireye özgüdür bu nedenle bireyden bireye farklılıklar gösterir (3).

Latince ceza, işkence, intikam anlamındaki ‘poena’ sözcüğünden gelen ağrı, tanımı oldukça zor bir kavramdır. Uluslar arası Ağrı Araştırma Derneği (IASP) tarafından yapılan tanımlamaya göre ağrı; ‘vücudun belirli bir bölgesinden kaynaklanan, bir doku harabiyetine bağlı olan ya da olmayan, insanın geçmişten edindiği deneyimlerle ilgili hoş olmayan emosyonel bir duyum ve davranış şeklidir’ (4).

Bu tanımda vurgulanan, ağrının hem duysal hem de emosyonel olarak istenmeyen bir algı türü olduğudur. Yine bu tanıma göre ağrının bir deneyim haline gelebilmesi için bir doku hasarının gerçekleşmesi mecburiyetinin olmadığı vurgulanmaktadır.

Ağrıya ilgili yapılan diğer tanımlamalar şöyledir;

New Oxford American Dictionary 2004: “Hastalık ya da yaralanmaya bağlı ortaya çıkan fiziksel, ızdırap veya rahatsızlık durumu. Vücudun belirli bir bölgesinden kaynaklanan rahatsızlık verici his. Mental ızdırap veya stres durumu”.

Encyclopedia.worldvillage.com/s/b/pain: “Genellikle doku hasarı veya inflamasyon ile ilişkili duysal ve emosyonel hoş olmayan deneyim”.

www.doctorsofpain.com/patient/terminology.html: “Özelleşmiş sinir sonlanmalarının uyarılması sonucu ortaya çıkan rahatsız edici, acı veren ve strese sokan, vücudu zararlı uyarandan koruyan bir mekanizma”.

Yapılan bütün tanımların temelini bilimsel veriler ve gözlemlere dayanmasına rağmen hala ağrının bütün otoriteler tarafından kabul edilmiş net ve kesin bir tanımı yok gibi görülmektedir.

4.2. Ağrı Terminolojisi

Ağrının tanımlanmasında kullanılan terimler şunlardır; (5).

Allodoni: Normalde ağrı olarak algılanmayan uyarının, ağrı olarak algılanması.

Anestezi: Ağrı dâhil bütün hislerin kaybı.

Analjezi: Ağrı duyusunun bastırılması.

Dizestezi: Uyarı veya uyarı olmaksızın oluşan nahoş ve anormal duyu.

Anestezi dolorosa: Duyu kaybı olan bölgede ağrı.

Hipoaljezi: Ağrılı uyarana azalmış cevap.

Hiperaleji: Ağrılı uyarana artmış cevap.

Hiperpati: Uyarı kesildikten sonrada ağrının hissedilmesi.

Hipoestezi: Azalmış cilt duyarlılığı.

Kozalji: Periferik sinirlerde tahribat sonucu gelişen, yanıcı karakterdeki ağrı.

Nöralji: Bir spinal ya da kranial sinirin dağılım alanında görülen tekrarlayıcı ve şiddetli ağrı.

Parestezi: Belirli bir bölgede, herhangi bir uyarı olmadan, spontan olarak iğnelenme karıncalanma veya uyuşma hissedilmesi.

Radikülopati: Bir veya birden fazla sinir kökünün anormal fonksiyonu.

Fizyolojik ağrı: Doku hasarı yapabilecek şiddete yakın, ancak belirli bir inflamasyon ya da sinir hasarı uyarılarının neden olduğu duyu şekli.

Nöropatik ağrı: Doku hasarı ya da inflamasyon sonucu sinir hasarına bağlı oluşan ağrı.

Noksiyus: Doku hasarı oluşturan stimulus.

4.3. Ağrının Sınıflandırılması

Ağrı, zaman, patofizyolojik mekanizmalar, lokalizasyon bölgesi gibi farklı şekillere göre sınıflandırılabilir

- Nörofizyolojik mekanizmalara göre;
 - a-Nosiseptif
 - b-Somatik
 - c-Viseral
 - d-Nöropatik (nonnosiseptif)
 - Santral
 - Periferal
 - e-Psikojenik
- Süreye göre;
 - a-Akut
 - b-Kronik

- Etiyolojik faktörlere göre;
 - a-Kanser ağrısı
 - b-Postherpetik nevralji
 - c-Orak hücreli anemiye bağlı ağrı
 - d-Artrit ağrısı
- Ağrı bölgesine göre;
 - a-Baş ağrısı
 - b-Yüz ağrısı
 - c-Bel ağrısı
 - d-Pelvik ağrı

4.3.1. Akut ağrı:

Akut ağrı; genellikle travmatik doku hasarı, inflamasyon ya da hastalık sonucu oluşan ve kısa bir süreyle sınırlı olan ağrı türüdür. Lokalizasyonu yüksek olan akut ağrının iyileşme süreci hızlıdır. Keskin bir hissedilme şekli olan akut ağrının üstlendiği temel rol organizmayı zararlı uyarana karşı uyarmaktır (6). Akut ağrı sempatik sinir sistemini stimüle ederek ‘savaş ya da kaç’ olgusunun ortaya çıkmasını sağlar (7). Akut ağrıda ağrıyı periferden serebral kortekse taşıyan farklı nöron grupları bulunmaktadır. Primer afferent duysal nöronlar, dorsal kök gangliyonunda bulunurlar. Anatomik olarak DKG ler her omurilik seviyesinde vertebral foramenler içerisinde yer alır. Buradan çıkan nöronlar arka boynuzda ikinci sıra nöronlarla sinaps yapar. İkinci sıra nöronlarda talamik nükleustaki üçüncü sıra nöronlarla sinaps yapar. Buradan çıkan nöronlar ise serebral korteksin postsantral girusuna ulaşır. Akut ağrı kısa süreli olarak nosiseptörlerde duyarlılığa yol açar ve duyarlı hale gelen nosiseptörlerin uyarılma eşiği düşer (8).

4.3.2. Kronik ağrı:

Kronik ağrı, ağrıya sebep olan mekanizmanın ortadan kaldırılmasına rağmen devam eden uzun süreli ağrı türüdür (9). Kanser gibi uzun süreli bir hastalık sonucu oluşabileceği gibi, şiddetli bir yaralanma sonucu da ortaya çıkabilir. Kronik ağrıya sebep olan yaygın hastalıklar şunlardır; migren, artrit, fibromiyalji, kanser, sırt ağrıları (10). Kronik ağrıyı oluşturan etkenler hastalık ya da yaralanma olarak vurgulansa da altında yatan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Kronik ağrıya sebep olan uzlaşmış temel mekanizma ise, uzun süreli etkiye maruz kalan nosiseptörlerin

yapısının bozulmasıdır. Bu yapı bozukluğunun bir sonucu olarak nosiseptörler üzerine direkt bir uyarı olmasa bile nosiseptörlerin aktif hale gelmesi kronik ağrının en belirgin ve tedavisini en çok zorlaştıran özelliğidir (11).

4.3.3. Nosiseptif ağrı:

Fizyopatolojik süreçlerin kaslarda, deride, iç organlarda, bağ dokuda oldukça yaygın bir şekilde bulunan ağrı reseptörlerini (nosiseptör) uyarması sonucu ortaya çıkan ağrıdır. İki tip nosiseptif ağrı vardır, bunlar; somatik ve visseral ağrıdır. Somatik ağrı eklemler, kemikler, kaslar ve yumuşak dokulardan gelirken, visseral ağrı iç organlardan köken alır. Somatik ağrının duysal lifler ile visseral ağrının ise sempatik lifler ile taşınması bu iki ağrı tipi arasındaki temel farktır. Somatik ağrı genellikle kas iskelet ağrısı olarak tanımlanır ve lokalizasyon derecesi yüksektir. Somatik ağrının hissedilme şekli keskin ve şiddetlidir. Visseral ağrı iç (internal) ağrı olarak tanımlanır. Somatik ağrının tersine lokalizasyon derecesi yüksek değildir. Sızlama şeklinde hissedilir (12).

4.4. Nosisepsiyon

Ağrı ve nosisepsiyon kavramları iç içe geçmiş kavramlar olsa da, bu iki kavram tamamen birbirleriyle örtüşmemektedir. Nosisepsiyon, nosiseptör olarak adlandırılan ve vücudun neredeyse bütün bölgelerinde bulunan özelleşmiş serbest sinir uçlarının eksitasyonu sonucu oluşan cevaptır. Her ne kadar nosisepsiyon ağrı deneyimini arttırsada, nosisepsiyonun olmadığı durumlarda da ağrı artabilir. Bunun tam tersine ağrının oluşmadığı durumlarda da nosisepsiyon olayı gerçekleşebilir. Dolayısıyla non-nosiseptif ağrı ve nosiseptif ağrı kavramlarını iyi ayırt etmek gerekir (13). Nosisepsiyon; zararlı uyarının nöral olarak işlenip kodlanması olayıdır (5). Nosisepsiyon, ağrı yollarının ve ağrının algılanmasının ilk basamağıdır.

4.4.1. Nosiseptörler:

Nosiseptörler ilk kez 1906 yılında Charles Scott Sherrington tarafından keşfedilmiştir (14). Sherrington birçok farklı deneyler yaparak farklı tipte uyarıların sinirler üzerinde farklı cevaplar oluşturduğunu, bazı kuvvetli uyarıların, uyarandan çekilme refleksi, otonom cevaplar ve ağrıyı tetiklediğini göstermiştir. Bu spesifik kuvvetli uyarılara cevap veren reseptörleri nosiseptör olarak adlandırmıştır (14). Duysal nöronlar olan nosiseptörler insanlarda deri, kas, iç organlar, eklemler gibi birçok farklı vücut bölgesinde lokalize olmuş durumdadır. Nosiseptörlerin hücre gövdeleri ise dorsal kök gangliyonları ya da trigeminal gangliyonlarda bulunur (15).

Duysal sinirler temel olarak iki farklı gruba ayrılır, bunlar A ve C lifleridir. A lifleri de kendi içinde $A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$ ve $A\gamma$ olmak üzere dört alt gruba ayrılır. A tipi lifler spinal sinirlerin tipik geniş ve orta kalınlıkta miyelinli lifleridir. C tipi lifler ise ince miyelinsiz liflerdir. C tipi lifler periferik sinirlerin çoğunun duysal liflerinin yarısından fazlasını otonom postgangliyonik liflerin ise hepsini oluşturur. Nosiseptörler ise A delta ve C lifleri olmak üzere iki farklı alt gruba ayrılır. Bunlardan A delta lifleri zayıf miyelinli akson çapları C liflerine göre daha kalın ve hızlı iletkenlik özelliğine sahiptir (20m/sn). Mekanik uyarıların yanı sıra termal uyarılara da % 20–50 oranında hassastır. Miyelinsiz C lifleri ise akson çapları küçük, ileti hızları yavaştır (2-8m/sn) ve A delta liflerine göre daha zor aktif hale gelir. A delta liflerinin reseptif alanları kümeler halindeyken C liflerinin reseptif alanlarında böyle bir durum görülmemektedir (16).

Tablo 1: Duysal Nöron Tipleri

Duysal Nöron Tipleri					
Tip	Sınıflandırma	Çap	Myelin	İletim Hızı	İlişkili Oldukları Duysal Reseptörler
Ia	$A\alpha$	13-20 μm	Var	80–120 m/s	Kas içiğinin primer reseptörleri
Ib	$A\alpha$	13-20 μm	Var	80–120 m/s	Golgi tendon organı
II	$A\beta$	6-12 μm	Var	33–75 m/s	Kas içiğinin sekonder reseptörleri Derideki tüm mekanoreseptörler
III	$A\delta$	1-5 μm	Zayıf	3–30 m/s	Dokunma ve basınçla ilgili serbest sinir uçları Neospinotalamik trakt Soğuk termoreseptörleri
IV	C	0.2-1.5 μm	Yok	0.5-2.0 m/s	Paleospinotalamik trakt Sıcak reseptörleri

4.4.2. Nositseptif Süreç:

Nositseptif süreç 3 aşamada gerçekleşir;

a-Periferal aşama

b-Transmisyon aşaması

c-Ağrının entegrasyonu

Mekanik, termal veya kimyasal uyaranlara bağlı olarak ağrıyı indükleyici maddelerin artışı noisitseptrlerin uyarılmasını sağlar. Bu maddelerden bazıları şunlardır; (17).

Aminler: Serotonin, noradrenalin, histamin,

Amino asitler: Asetilkolin, glutamat, GABA,

Nöropeptidler: Sinir büyütme faktörü (NGF), kalsitonin geni bağlı peptid (CGRP),

Kininler: Taşikininler, P maddesi, bradikinin,

Prostagalandinler: PgE, PgF,

Metabolitler: Laktik asit, ATP, ADP, K⁺.

Bütün bu kimyasal maddelerin üstlendikleri görevler farklıdır, rneğin; GABA santral seviyede ağrının baskılanması görevini üstlenirken, ATP ağrı iletimini hızlandırmaktadır. Zararlı bir uyarının doku hasarı oluşturması, oluşan bu doku hasarı sonucu yukarıda belirtilen kimyasalların ortaya çıkması ve bu kimyasalların noisitseptrler üzerindeki kendi spesifik reseptörlerine bağlanması sonucu ağrının periferal aşaması başlamış olur (18). Bağlanan kimyasal maddenin özelliğine göre iyonotropik ya da metabotropik iyon kanallarının açılması sonucu hücre içi ve hücre dışı iyon dengesi değişir. İyon dengesindeki bu değişim aksiyon potansiyelinin oluşmasına neden olur, oluşan bu aksiyon potansiyeli noisitseptrlerin aksonlarında ilerleyerek dorsal kök gangliyonu ya da trigeminal gangliyona ulaşır (19). Trigeminal gangliyonlar baş ve boyun bölgesinden, dorsal kök gangliyonları ise vücudun geri kalan bölgesinden gelen ağrıyla ilgili duysal informasyonları alır (20).

4.5. Ağrı İletimi

Ağrının iletimi 4 aşamada gerçekleşir (21);

a. Transdüksiyon: Transdüksiyon; mekanik, termal veya kimyasal uyaranların doku hasarı ya da doku yaralanması oluşturması sonucu, noisitseptrlerin uyarılmasıyla başlar. Zararlı uyarının oluşturduğu doku hasarı sonucu; lökositler, trombositler, vasküler endotel hücreler ve immün hücrelerden köken alan sitokinler ve nöropeptidlerin ortama salınımı gerçekleşir. Açığa çıkan bu nöropeptidler ve nromediatrler A delta ve C

liflerinin uyarılmasını sağlar. Ayrıca nosiseptörlerin sinir terminallerinden salınan P maddesi, nosisepsiyonun artmasına vazodilatasyona, kan akımının hızlanmasına ve ödeme neden olur. P maddesindeki bu artış sürecinin devam etmesiyle trombositlerden serotonin ve bradikinin, mast hücrelerinden de histaminin salınmasına neden olur (22).

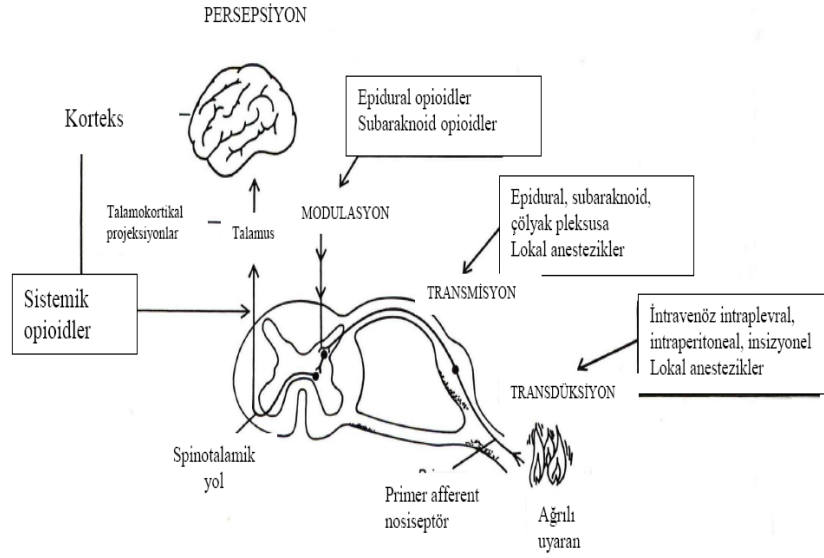
b. Transmisyon: Transmisyon aşaması ağrılı uyarının spinal kordun dorsal boynuzuna taşınması olayıdır. Ağrılı uyarının spinal korda ulaşması sonucu substantia gelatinosada nörotransmitterlerin konsantrasyonunda artışa neden olur. Artan nörotransmitterler spesifik reseptörlerine bağlanarak ağrı iletiminin baskılanmasına ya da artarak devam etmesine neden olur. Transdüksiyonun gerçekleşmesi sonucu iletim hızı yüksek olan A delta lifleriyle 0,1 sn de spinal korda taşınan ilk ağrı ya da keskin ağrı olarak adlandırılan ağrı algılanır. İletim hızı yavaş olan C lifleriyle ise ikinci ağrı ya da yavaş ağrı olarak adlandırılan ağrının spinal korda taşınımı gerçekleşir (23).

c. Modülasyon: Başlıca omurilik seviyesinde gerçekleşen olaydır. Doku hasarını takiben periferde ya da santral seviyede ağrının algılanmasını değiştiren olay olarak tanımlanır. Modülasyon mekanizması normal fizyolojik bir süreçtir. Ağrı modülasyonu periferde nosiseptörlerin çevresinde, merkezi sinir sisteminde omurilik arka boynuzunda ya da supraspinal yapılarda gerçekleşir. Modülasyon sonrası ağrı algılanması inhibe edilebileceği, tam tersine arttırılabilme de gözlenebilir. (24).

Ağrı modülasyonunda rol oynayan 3 farklı sistem tanımlanmıştır, bunlar (25),

- Endojen opioid sistem
- Segmental inhibisyon
- İnici İnhibitör Sistem

d. Persepsiyon: Ağrılı uyarının omurilikten geçip farklı tipte yollar izleyerek üst merkezlerde algılanmasıdır (25).



Şekil 1: Ağrı İletim Basamakları (24).

4.6. Ağrı İletim Yolları

Primer afferent nosiseptörler (A delta ve C lifleri) omuriliğe girdikten sonra ikiye ayrılırlar. Birkaç segment aşağı ve yukarı devam ederek Lissauer traktusunu oluştururlar. Nosiseptörlerin santral terminalleri dorsal boynuz gri cevherinin marjinal zonu (lamina-I) ile subsantia jelatinosa (lamina-II)’da yer alan nöronlarla sinaps yaparlar (26). Ağrılı uyarıyı taşıyan 1.sıra nöronlar(A delta ve C lifleri)’in hücre gövdeleri arka kök gangliyonlarında bulunur. Buradan çıkan lifler spinal korda girer ve substantia jelatinosa da arka boynuz nöronlarıyla sinaps yapar, bu nöronlar ağrı yolunun 2.sıra nöronları olarak tanımlanır. Ağrı yolunun 3.sıra nöronları talamustadır (27). Arka boynuzda 3 tip nöron bulunur;

a. Projeksiyon nöronları: Gelen impulsları anterolateral afferent sistemden üst merkezlere iletirler. Lamina I’de bulunan, sadece A delta ve C lifleri ile uyarılan projeksiyon nöronları ‘nosiseptif spesifik’, lamina I ve V de bulunan, hem nosiseptörlerden hem de düşük eşikli mekanoreseptörlerden gelen impulsları alan nöronlarda ‘wide dynamic range’ olarak adlandırılır (26).

b. Eksitatuvar nöronlar: Ağrılı impulsları projeksiyon nöronlarına ileten ve bu nöronları eskite eden nöronlardır (28).

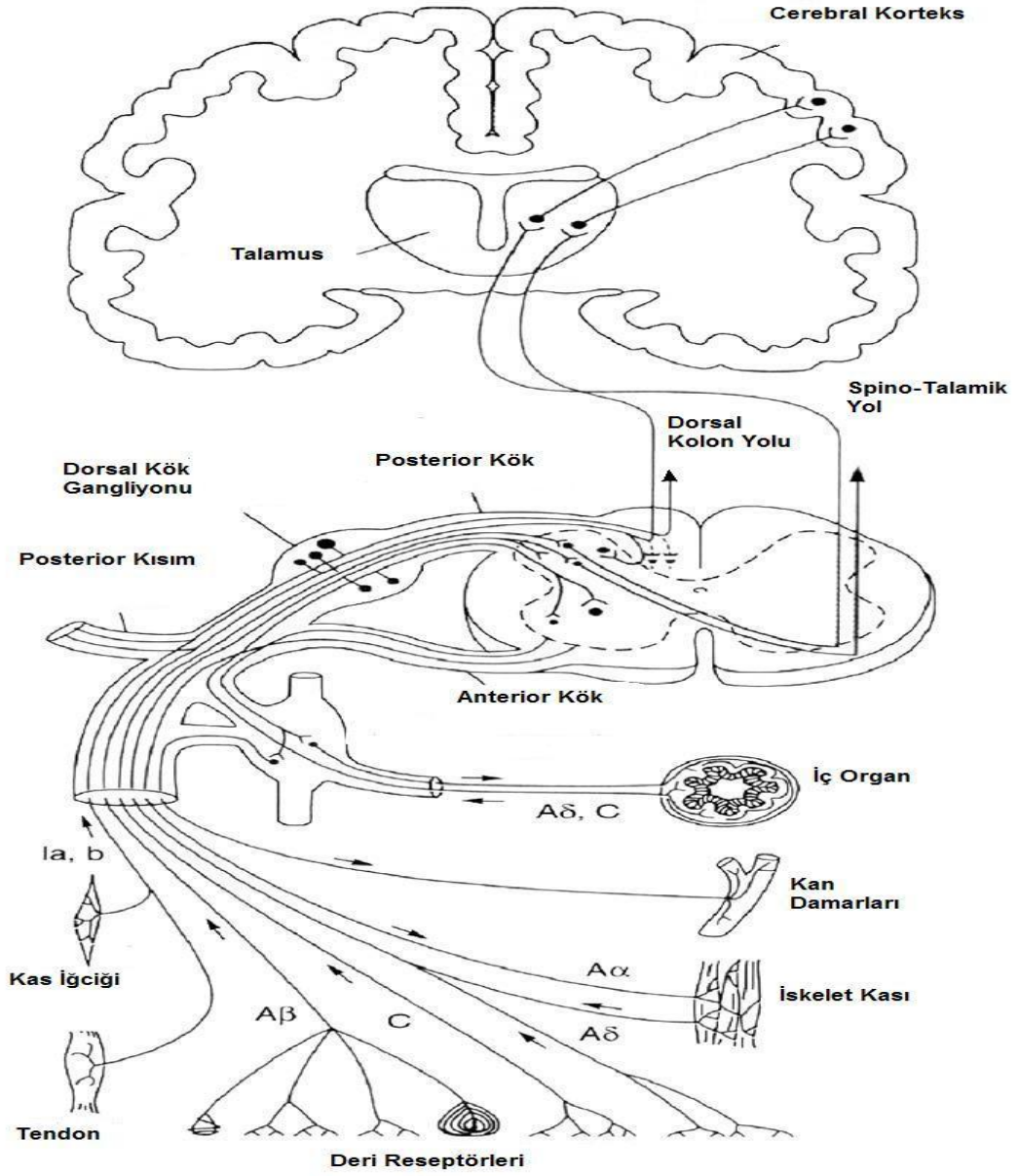
c. İnhibitör nöronlar: Genel olarak A delta ve C liflerinden gelen impulslarla aktive olurlar. Geniş çaplı liflerle uyarıldıkları zaman projeksiyon nöronlarında inhibisyona

neden olurlar. Görevleri ağırlı uyaranları modifiye ederek projeksiyon nöronlarına geçirmektir (29).

4.6.1. Spino-Talamik Yol: Ağırlı uyaran lamina I, V ve VII. nöronlarından köken alır. Orta hattı geçtikten sonra anterolateral çıkıcı sistem içinde ilerler ve spinal kordun karşı tarafında talamusun ventral posterolateral çekirdeğinde sonlanır. Bu nükleus vücudun özel bölgeleri için farklı bölümlere ayrılmıştır. Her bölge kendisiyle ilgili primer korteks bölümüne projekte olur. Talamustan çıkan uzantılarda kortekse ulaşarak postsantral girusta sonlanır. Bu yol ağrının yer, şiddet ve zaman gibi özellikleri ile birlikte algılanmasını sağlar (26).

4.6.2. Spino-Retiküler Yol: Anterolateral çıkıcı sistem içinde ilerler. Bulbus ve pontstaki retiküler çekirdeklere uzanır ya da kollateral verir. Buradan spinal kordun sağ ve sol talamus intralaminar çekirdeklerine çıkar. Buradan çıkan enformasyon amigdala hipotalamus gibi birçok beyin bölgesine ulaşır. Kortikal ve subkortikal yapıları genel uyanıklık içinde tutar. Acı yolağı olarak bilinir (26).

4.6.3. Spino-Mezensefalik Yol: Lamina I ve V'teki nosiseptif projeksiyon nöronları anterolateral sistem içinde yer alır, spino-retiküler yola yakın olarak mezensefalik periakvaduktal gri cevhere kadar çıkar. Buradan köken alan nöronlar, amigdala hipotalamus gibi beyin merkezlerine projekte olur. Bu yolun periakvaduktal gri cevherle bağlantı kurması oldukça önemlidir; çünkü bu bölgede analjezik etkinliği olan enkefalinerjik nöronlar bulunur (26).



Şekil 2: Ağrı iletim yolları (3 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

4.7. Ağrılı Uyarana Verilen Fizyolojik Cevaplar

Ağrı, ağrılı uyarana maruz kalan bireyde stres durumu oluşturur. Bu stres durumu sempatik sinir sistemin devreye girmesine ve bazı fizyolojik cevapların oluşmasına neden olur, bunlar; (30).

- Anksiyete, korku, ümitsizlik, uykusuzluk, intihar etme düşüncesi,
- Ağrıya odaklanma, bağırma, inilti, yüzü buruşturma,
- Kognitif fonksiyonlarda azalma, mental konfüzyon, yüksek somatizasyon pupilla dilatasyonu,
- Kalp hızında artma, periferik, sistemik ve koroner damar direnci, kan basıncında artış
- Solunum hızında artış, tükürük sekresyonunda azalma ve buna bağlı gelişen enfeksiyonlar,
- Gastrik ve intestinal motilitede azalma,
- Üriner sistem fonksiyonunda azalma,
- Antidiüretik hormon, epinefrin, norepinefrin, aldesteron ve glukagonda artış insülin ve testesteronda azalma,
- Hiperglisemi, glikoz intoleransı, insülin direnci, protein katabolizması.

4.8. İyon Kanalları ve Ağrıdaki Roller

İyon kanalları, kas kasılması, besin transportu, aksiyon potansiyelinin oluşumu ve devamı gibi birçok fizyolojik süreçte oldukça önemli rol oynamaktadır. Hastalıkların birçoğu iyon kanallarının normal fizyolojik fonksiyonlarının bozulması sonucu ortaya çıkmaktadır. İyon kanallarının fonksiyon bozukluğu sonucu ortaya çıkan hastalıklar iki grupta sınıflandırılabilir bunlar; iyon kanalının kendisini ya da iyon kanalını düzenleyen proteini kodlayan gendeki mutasyon sonucu oluşan hastalıklar, örneğin; kistik fibrozis epilepsi, ya da non-genetik olarak adlandırılan ve kanallar üzerine etki eden bir toksin sonucu oluşan hastalıklardır. İyon kanalları ağrının algılanması ve iletiminde de önemli rol oynamaktadırlar. Nositseptörlerin santral ve periferik terminallerinde birçok farklı tipte ve yoğunlukta iyon kanalları bulunmaktadır (31). Günümüzde ağrı tedavisinde iyon kanal blokerleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ağrıdaki kritik rolü göz önüne alındığında ağrı tedavisinde iyon kanallarının önemi giderek artmaktadır. Ağrı yolları dorsal kök gangliyonu ve trigeminal nöronlarda başlar, bunlar noisepitif sinyalleri üst merkezlere taşıyan nöron gruplarıdır (32). DKG ve trigeminal gangliyon nöronlarının

aksonlarını periferde yer alır. Periferden aldıkları nosiseptif sinyalleri, aksiyon potansiyeline çevirerek ağrının iletilmesini sağlarlar, dolayısıyla bu iki nöron grubu da farklı yoğunluk ve alt tiplerde iyon kanallarına sahiptir (33).

4.8.1. Sodyum Kanalları:

Sodyum (Na^+) fizyolojik şartlarda hücre dışında, hücre içine oranla daha fazla bulunan ve aksiyon potansiyelin başlamasında temel rol oynayan katyondur. Hücre dışındaki Na miktarı 142 mEq/L iken bu miktar hücre içinde 14 mEq/L ye düşmektedir (34). Kompleks transmembran proteinler olan voltaj kapılı sodyum kanalları (Na_v) uyarılabilir hücrelerde sodyumun hızlı bir şekilde hücre içine akmasına ve aksiyon potansiyelinin ateşlenmesine neden olurlar (35). Sodyum kanallarının aktive olması milisaniyeler içinde gerçekleşen ve membranın depolarize olmasına neden olan bir olaydır. Yapılan elektrofizyolojik çalışmalarda, Na^+ kanallarının duysal nöronlarda özellikle küçük çaplı DKG nöronlarında yoğun bir şekilde bulunduğunu göstermiştir. Kurbağa balığı (*Uranoscopus scaber*) karaciğerinden izole edilen tetrodotoxin (TTX)'in, sodyum kanallarının doğal blokeri olduğu tespit edilmiştir (36). Küçük çaplı DKG nöronlarında TTX'e duyarlı iki tip sodyum kanalı tespit edilmiştir, bunlar hızlı (TTX-S) ve yavaş (TTX-R) inaktive olan sodyum kanallarıdır. TTX-R sodyum kanallarının, aksiyon potansiyelinin süresi ve sinir terminallerinden nörotransmitter salıverilmesi üzerine modüle edici özelliğinin bulunduğu vurgulanmaktadır. Deneysel çalışmalar, motor ve duysal nöron hasarlarından sonra bu nöronların, hücre gövdeleri ve dentritlerinde, sodyum kanallarında anormal artışlar gerçekleştiğini göstermiştir (37).

Elde edilen veriler ışığında, hasar sonucu DKG nöronlarında görülen anormal eksitabilitenin sodyum kanallarındaki bu artışa bağlı olduğu vurgulanmıştır (38). Ağrıda rol alan bazı sodyum kanalları ve görevleri şunlardır;

$\text{Na}_v1.3$: TTX-S voltaj kapılı sodyum kanallarıdır. DKG ve trigeminal nöronlarda, spinal kordda, talamusta ve dorsal boynuzda lokalize olmuş durumdadırlar (39).

$\text{Na}_v1.7$: TTX-S voltaj kapılı sodyum kanallarıdır. DKG ve TG nöronlarda yoğun olarak bulunur. İnflamasyon ve yaralanma sonrası up-regülasyona uğrarlar. Nöropatik ağrı tedavisinde bu iyon kanallarının blokerleri sıkça kullanılmaktadır (39).

$\text{Na}_v1.8$: TTX-R voltaj kapılı sodyum kanallarıdır. Küçük ve orta çaplı DKG ve TG nöronlarında yoğun olarak bulunurlar. Küçük çaplı DKG nöronlarında inflamasyon sonrası yoğunlukları artarken, aksonal yaralanma sonucu yoğunlukları azalır (39).

Na_v1.9: TTX-R voltaj kapılı sodyum kanallarıdır. Küçük ve orta çaplı DKG ve TG nöronlarında yoğun olarak bulunurlar. Sessiz reseptörlerin devreye girmesinde temel rol oynadığı vurgulanmaktadır. Kronik ve inflamatuvar ağrıda önemli rol oynar (39).

4.8.2. Potasyum Kanalları:

Potasyum (K^+) hücre içinde, hücre dışına oranla daha çok bulunan bir katyondur. Potasyumun hücre içindeki miktarı 140 mEq/L iken bu miktar hücre dışında 4 mEq/L ye düşmektedir (34). Aksiyon potansiyeli ateşlendikten sonra potasyum kanalları (K_v) hızla açılarak membranın repolarize olmasına ve böylece aksiyon potansiyelinin susturulmasına neden olur. Ağrının oluşumu ve iletiminde potasyum kanalları önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda bazı G-protein eşli reseptörlerin potasyum kanallarını açtığı ve antinosiseptif özellik gösterdiği belirtilmiştir. Potasyum kanalları periferik sinir sisteminde ve DKG nöronlarında yoğun olarak bulunmaktadır. Bir grup ligand-kapılı potasyum kanallarının zararsız ve zararlı uyaranları modüle ettiği ve nörotransmitter salınımına yol açtığı gösterilmiştir (40). Son yıllarda yapılan çalışmalarda farklı tipte ilacın potasyum kanallarını açtığı ve kuvvetli antinosiseptif özellik gösterdiğinin keşfedilmesiyle birlikte, potasyum kanalları günümüzde yeni ağrı kesicilerin çalışılmasında potansiyel hedef haline gelmiştir. Farklı tipte ve alt tipte potasyum kanallarının bulunması ve her potasyum kanalının farklı farmakolojik ve elektrofizyolojik özellik göstermesi bu çalışmaları kısıtlayan en büyük etkindir. Nöronal potasyum kanalları, potasyumun hızlı bir şekilde diffüze olmasına yol açmaktadır. Potasyum kanallarının bu özelliği, sinir sisteminde nöronal aktivite ve sinyalleşme üzerinde önemli role sahip olmalarını sağlamaktadır. Potasyum kanalları farklı tipte uyaranlarla uyarılabilme özelliğine sahiptir, bu uyaranların potasyum kanallarına etki etmesi sonucu hücre içinde bazı iyonların küçük organik moleküllerin ve proteinlerin düzenlenmesi sağlanır, örneğin; Ca^{2+} , ATP, cAMP düzeylerinde artış (41). Potasyum kanal tipleri ve görevleri şunlardır;

Voltaj-Kapılı K^+ Kanalları: Bu kanallar farklı alt tiplerde bulunmaktadır ve K_v1 den K_v12 ye kadar bilinen 12 farklı voltaj-kapılı potasyum kanalı vardır. Her bir voltaj kapılı K^+ kanalıda kendi içinde alt tiplere ayrılır, örneğin; K_v1 tip kanallar, $K_v1.1$ den $K_v1.7$ ye kadar farklı tiplere ayrılır. Bu kanallar DKG nöronları ve ağrı transmisyonunda rol alan sinapslarda yoğun olarak bulunmaktadır (42).

Kalsiyum-duyarlı K^+ Kanalları: Kalsiyum-duyarlı potasyum kanallar, büyük (BK) orta (IK) ve küçük (SK) çaplı olmak üzere 3 alt gruba ayrılır (43). K_{Ca} kanallarının en kritik özelliği sitoplazmik Ca^{2+} konsantrasyonu arttığı zaman aktive olmalarıdır. Özellikle küçük çaplı SK_1 ve SK_2 kanalları dorsal boynuzda ve DKG nöronlarında yoğun olarak bulunur, bu kanallar afferent girdilerin değerlendirilmesi ve ağrı sinyalleşmesinde önemli rol oynar (39).

İçeri-doğrultucu K^+ Kanalları: Bu kanallar, $K_{ir}1$ den $K_{ir}7$ ye kadar 7 farklı familyaya ayrılmaktadır. Bu kanallardan G-protein düzenlemeli (GIRK veya $K_{ir}3$) ve ATP-duyarlı (K_{ATP}) K^+ kanalları nosisepsiyon için önemlidir (44). Dorsal boynuzda, akut ve kronik inflamatuvar ağrı oluşumunda bu kanallar etkin rol oynamaktadır.

İki-porlu K^+ Kanalları: Bu kanallar 14 farklı gruba ayrılırlar. Farmakolojik özellikleri çok iyi bilinmese de dorsal boynuzda lamina I, II ve spinal kordda ağrı yolları üzerinde yoğun olarak bulunmaları bunların nosisepsiyon da önemli role sahip olabileceğini düşündürmektedir (45).

4.8.3. Klor Kanalları:

Klor (Cl^-), hücre dışında hücre içine göre daha yoğun bulunan bir anyondur. Klorun hücre dışındaki miktarı 103 mEq/L iken bu miktar hücre içinde 4 mEq/L ye düşmektedir (34). Klor iyonu dinlenim sırasında rahatlıkla hücre zarından geçerek hücrenin dinlenim zar potansiyelini dengede tutmasına yardımcı olur. Klor kanalları, nöron eksitabilitesi, kalp kası, iskelet kası ve düz kas hücre volümünün düzenlenmesi gibi birçok biyolojik süreçte görev alır. Transmembran klor gradyanında ki değişiklikler $GABA_A$ ve glisin reseptörlerinin aktivasyonunda önemli rol oynar (46).

4.8.4. Kalsiyum Kanalları:

Kalsiyum (Ca^{2+}) hücre dışında, hücre içine göre daha fazla bulunan bir iyondur. Kalsiyumun hücre dışındaki miktarı 2,4 mEq/L, hücre içindeki miktarı ise 0,0001 mEq/L dir. Kalsiyum vücutta birçok biyolojik süreçte oldukça önemli rol oynar örneğin; hücre içinde kalsiyum konsantrasyonundaki geçici artış, nörotransmitter miktarında artmaya ve hücre zarının uyarılabilirliğinin modüle edilmesine neden olur, aynı zamanda bu etki iyon kanalları(Ca_v) sayesinde hücre dışından hücre içine kalsiyumun girmesi sonucu da gerçekleşir (47). Hücre içine Ca^{2+} akışı 3 farklı yolla gerçekleşir, bunlar;

- a- Membranın depolarize olması sonucu açılan voltaj-kapılı Ca^{2+} kanalları aracılığıyla,
- b- Ligand-kapılı non-spesifik Ca^{2+} kanalları aracılığıyla,
- c- Reseptör-duyarlı Ca^{2+} kanalları aracılığıyla.

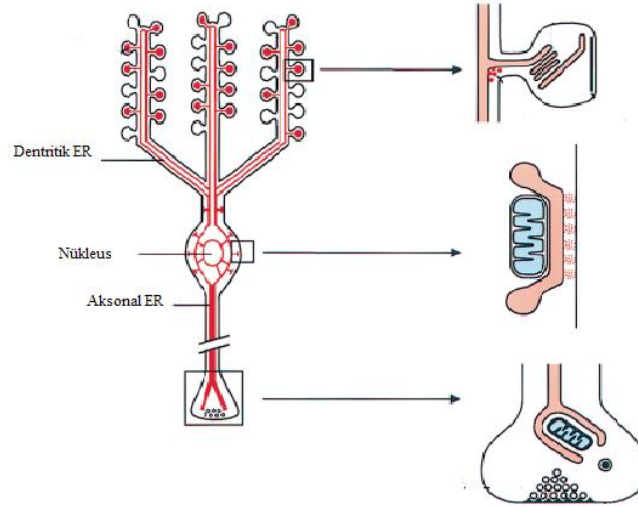
Neredeyse bütün uyarılabilir hücrelerin plazma membranının da voltaj-kapılı Ca^{2+} kanalları bulunmaktadır. Bu kanallar elektriksel aktiviteyi hücre içinde kimyasal sinyaller haline dönüştürürler (48). Bu kanallar kalsiyuma yüksek oranda geçirgenlik gösterirken kısmen de sodyuma geçirgenlik gösterirler ve Ca^{2+} - Na^{+} kanalları olarak adlandırılırlar. Ancak kalsiyuma olan duyarlılıkları sodyumunkine oranla 1000 kat daha fazladır. Hücre zarının dinlenim durumunda bu kanallar kapalı durumdadır, zar depolarize olduğu anda bu kanallar açılır ve kalsiyumun hücre içine girmesine neden olurlar. Bu olay nöronlarda uyarılmaya, nörotransmitter salınımına neden olurken farklı hücre tiplerinde farklı cevapların oluşmasına neden olur, örneğin; kaslarda kasılma gibi. Voltaj-kapılı kalsiyum kanalları(VGCC), uyarılabilirlik olarak iki farklı gruba ayrılır, bunlar; yüksek voltajla aktive olan kalsiyum kanalları(L-, N-, P/Q-, R- tip) ve daha düşük voltajda aktive olan kalsiyum kanalları(T- tip)dır (49). L-, N- ve P/Q- tip kalsiyum kanalları spinal kordun dorsal boynuzunda tespit edilmiştir. L- tip kalsiyum kanalları proksimal dentritler de, MSS nöronlarının hücre gövdelerinde ve bazı glutamaterjik sinapslar da lokalize olmuş durumdadır (50). N- tip kalsiyum kanalları da spinal kordun dorsal boynuzunda lamina I ve II de yoğun olarak bulunmakta ve primer efferentlerden nörotransmitter salınımının da anahtar rol üstlenmektedir. P/Q- tip kalsiyum kanalları da neredeyse bütün kimyasal sinapslar da hızlı sinaptik transmisyonunda önemli rol oynamaktadır. Birçok farklı MSS bölgesinde, medulla spinalisde ve DKG nöronlarında lokalize olmuş farklı tipte kalsiyum kanalları nosiseptif süreçte önemli roller üstlenmektedir. Bu kritik rolleri kalsiyum kanallarını ağrı tedavisinde önemli hedef haline getirmiştir (48).

4.9. Nöronal Kalsiyum Homeostazisi ve Kalsiyum Sinyalleşmesi:

Nöronal kalsiyum, birçok farklı fizyolojik süreçte hücre içi ikincil haberci görevi görür. Diğer hücreler gibi nöronlarda hem hücre dışı hem de hücre içi kalsiyum kaynaklarını kullanırlar (51).

Nöronal plazma membranı farklı tip ve alt tiplerde kalsiyum kanallarına sahiptir bunlar; voltaj-kapılı kalsiyum, reseptör-kapılı kalsiyum ve non-selektif kalsiyum

kanallarıdır. Kalsiyum kanallarının herhangi bir etki sonucu açılması, hücre dışı ortamda yoğun olan kalsiyumun hücre içine girmesine neden olur. Hücre içindeki kalsiyum kaynağı endoplazmik retikulum(ER)'dur. ER nöronlarda, dentritler, nükleus ve akson bölgelerinde lokalize olmuşlardır.



Şekil 3: Nöronal ER bölgeleri. 51 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

Nöronun farklı bölgelerinde bulunan endoplazmik retikulumlar, kalsiyumun salıverilmesine neden olan sinyalleşme sistemine sahiptirler. ER üzerinde lokalize olmuş, 1,4,5-trifosfat (IP_3) ve ryanodin (RyR) reseptörleri üzerinden kalsiyumun salıverilmesi gerçekleşir (53). Hücre dışı ortamdan kalsiyum girmesi ve bunun bir sonucu olarak hücre içi kalsiyum kaynağı olan ER den kalsiyum salıverilmesi olayı şu şekilde gerçekleşir; voltaj-kapılı kalsiyum kanalları ya da bir nörotansmitterin etkisi sonucu aktive olan iyonotropik ya da metabotropik reseptörler üzerinden hücre içine kalsiyum girişi gerçekleşir. Hücre içine giren kalsiyum hızlı bir şekilde kalsiyum bağlayıcı bir protein ile bağ kurar, örneğin; kalmodulin CaM (54). Voltaj-kapılı kalsiyum kanalları ya da iyonotropik reseptörler üzerinden hücre içine giren kalsiyumun kendisi direkt olarak ER üzerinde bulunan RyR ve IP_3 reseptörlerini uyarak kalsiyum salıverilmesine neden olabilir (53). Bu olaya kalsiyum tetiklemeli kalsiyum salıverilmesi mekanizması denir. Başka bir mekanizma ise, bu iki kalsiyum kanalından kalsiyum girişi sonucu hücre içinde cADP-ribozun aktive olması ve ER üzerinde bulunan RyR reseptörlerini uyarması sonucu kalsiyum salıverilmesidir. Metabotropik

reseptörlerin aktive olması IP_2 'nin IP_3 'e dönüşmesine neden olur, IP_3 de ER üzerinde bulunan IP_3 reseptörlerine bağlanarak kalsiyumun salıverilmesine neden olur (51).

4.10. Ağrı Oluşumunda Rol Alan Bazı Mediatörler

4.10.1. Bradikinin: Doku hasarı ve inflamasyon proteolitik kallitreinlerin aktive olmasına neden olur. Kallitreinler, kininojenden bradikinin gibi kininlerin oluşmasına yol açar. Bradikinin dokuz amino grup asit içeren, inflamasyonun ve ağrı indüklenmesinin birincil derece sorumlusu olan bir proteindir. Bradikininin aktive olması iki tane G-protein eşleşmeli reseptör olan B_1 ve B_2 'nin aktif hale gelmesine neden olur. Aktif hale gelen bradikinin reseptörleri fosfolipaz $C\beta$ ve fosfolipaz A_2 yolaklarının devreye girmesini sağlar. Fosfolipaz $C\beta$ ise protein kinaz C yolağını devreye sokar. Protein kinaz C yolağı duysal nöronlarda inflamatuvar sinyalleşmede önemli rol oynar (52).

4.10.2. Prostaglandinler: Prostaglandinler, fosfolipaz A_2 tarafından membran fosfolipidlerinin yıkımı sonucu oluşan maddelerdir. PGE_2 ve PGI_2 aktivasyonu G-protein eşli reseptörler olan EP ve IP reseptörleri aracılığı ile gerçekleşir. Prostaglandinler, dorsal boynuz ve spinal kord da duysal nöronların santral terminalinde pre- ve post- sinaptik reseptörleri etkileyerek bu nöronların uyarılabilirliğini artırır ve santral sensitizasyona neden olur (55).

4.10.3. Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT): Serotonin, trombositlerden köken alan ve 14 den fazla reseptöre etki ettiği bilinen bir maddedir. Bu reseptörlerden sadece 5-HT₃ reseptörü G-protein eşli değildir. 5-HT reseptörü diğer G-protein eşli serotonin reseptörleri gibi ikincil haberci sistemlerini devreye sokmak yerine ligand kapılı iyon kanalları üzerinden Na^+ girişine ve buna bağlı olarak nöronal eksitasyona neden olur. 5-HT₃ reseptör antagonistlerinin dorsal kök gangliyonu ve periferde antinosiseptif özelliklerinin olduğu bilinmektedir (56).

4.10.4. Sinir Büyütme Faktörü (NGF): Doku inflamasyonu ya da hasarı sonucu NGF miktarında artış görülür, artan NGF ise hiperaljezik cevapların doğmasına neden olur. NGF mast hücreleri, makrofajlar ve şivan hücreleri gibi farklı kaynaklardan salınabilir. NGF mast hücreleriyle etkileşime girerek degranulasyona ve 5-HT, histamin ve NGF'nin kendisi gibi mediatörlerin artışına neden olur. NGF post-translatyonal

modifikasyonlarla nosiseptörlerin cevabında etkin rol oynar. Bunlar arasına, TRPV1 sensitizasyonu örnek olarak verilebilir (57).

4.10.5. TRP Kanalları: TRP kanalları, insan vücudunda pek çok plazma membranında lokalize olmuş iyon kanallarıdır. Vaniloid reseptör olarak adlandırılan ve kırmızıbiberin etken maddesi kapsaisine duyarlı olan TRPV₁, Ca²⁺ a yüksek geçirgenlik gösterir. TRPV₁ ayrıca 43 °C üstündeki sıcaklıklarda aktive olarak ağrının oluşmasına neden olur. TRPV₁, ATP ve bradikininle sensitize olarak sıcaklık eşiği 30 °C'nin altına düşebilir. Diğer birçok TRP kanallarının da farklı sıcaklık değerlerinde aktive olduğu gösterilmiştir, örneğin; TRPV₃ (34–38 °C), TRPV₄ (27–35 °C), TRPM₈ 28 °C'nin altında ve TRPA₁ 17 °C'nin altında (58).

4.10.6. Pürinerjik P2X Reseptörleri: Doku yaralanması sonucu artan ATP P2X reseptörleri üzerinden dorsal kök gangliyonu ve dorsal boynuz nöronlarını depolarize edebilir. P2X reseptörleri dorsal kök gangliyonu nöronlarında, hem periferik terminalde hem de santral terminalde yerleşmiş durumdadır. P2X reseptörleri spinal kordda duysal transmisyonu modüle etme özelliğine sahiptir. Yedi tane P2X reseptörü alt tipi tanımlanmıştır (59), örneğin P2X₄ ve P2X₇ reseptörleri kronik ağrının oluşumunda önemli rol oynar. Başka bir örnek ise, inflamasyonun devam etmesi DKG nöronlarında P2X₃ ve P2X₄ reseptörlerinde artışa neden olur (60).

4.10.7. Opioid Reseptörler: Opioidler akut ve kronik ağrı tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Küçük ve orta çaplı DKG nöronlarında bulunan opioid reseptörleri ve opioid peptidleri bu nöronların uyarılabilirliği üzerinde önemli etkilere sahiptir. Bu reseptörler direkt ya da indirekt olarak voltaj kapılı kalsiyum ve sodyum kanallarının kapanmasına potasyum kanallarının ise açılmasına neden olur. Bilinen üç temel opioid reseptörü vardır, bunlar; mu-, delta- ve kappa-opioid reseptörleridir (61).

4.11. Dorsal Kök Gangliyon Nöronları

Dorsal kök gangliyon (DKG) nöronları, periferik dokulardan somatik ve viseral duysal informasyonları spinal korda taşıyan nöronlardır. DKG nöronları, şekil ve çaplarına göre farklı gruplara ayrılabilir (62). Küçük çaplı (<30 µm) hücre gövdesine sahip DKG nöronları genellikle miyelinsiz C liflerine sahiptir. Bu nöronlar ağrı sıcaklık ve kaşınma ile ilgili informasyonları taşır ve nosiseptif nöronlar olarak adlandırılır. Büyük çaplı DKG nöronları (>30 µm) genellikle A alfa ve A beta liflerine sahiptir, bu nöronlar genel olarak proprioseptif informasyonları taşır ve non-nosiseptif olarak

adlandırılırlar. DKG nöronları hücre çapları ve modalitelerine bağlı olarak farklı tipte ve yoğunlukta nörotransmitter reseptörleri ihtiva ederler, örneğin küçük çaplı nosiseptif nöronlar kapsaisine duyarlı vanilloid reseptör VR1, düşük pH ve yüksek sıcaklığa duyarlıdır (63).

4.12. Dorsal Kök Gangliyon Nöronlarında Kalsiyumun Rolü

Kalsiyum, nöronlarda gen ekspresyonu, aksiyon potansiyelinin ateşlenmesi nörotransmitter salıverilmesi gibi birçok olayda önemli rol oynar. Diğer hücreler gibi nöronlarda hem ekstrasellüler hem de intrasellüler kalsiyum kaynaklarını kullanırlar (64). Kalsiyum, merkezi sinir sisteminde migrasyon, sinaptogenezis gibi olaylarda rol almanın yanı sıra apoptozis olayında da etkin rol oynar (65). Nöronal süreçte ikincil haberci olarak gören alan kalsiyum seviyesindeki artış, hücre dışından reseptör-aracılı veya voltaj-kapılı iyon kanallarından hücre içine kalsiyum girmesiyle ya da hücre içi depolardan kalsiyumun salınmasıyla gerçekleşir.

DKG nöronlarında da diğer bütün sinir hücrelerinde olduğu gibi hücre içi kalsiyum düzenleyici mekanizmaların olduğu ve kalsiyum tetiklemeli kalsiyum salıverilmesinin gerçekleştiği gösterilmiştir (66). Bütün merkezi sinir sistemi sinapsların da olduğu gibi DKG nöronlarında da P maddesi, CGRP gibi nosiseptif nörotransmitterler hücre içi kalsiyum miktarındaki artışa bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.

4.13. Endojen Analjezik sistem

Vücutta aşırı ağrıya bağlı olarak diğer fonksiyonların etkilenmemesine yönelik ve morfin benzeri mediyatörleri kapsayan endojen bir analjezik sistem vardır. Bu sistem aracılığı ile ağrı duyusunun baskılanması nosiseptif duyuları ileten periferik primer duyu afferentlerin bulunduğu ve merkezi sinir sistemi yapılarıyla sinaps yaparak bu sinyallerin iletildiği medulla spinalisin dorsal boynuzunda gerçekleşir. Burada ağrı sinyallerinin baskılanmasının ara nöronların hiperpolarizasyonu yoluyla ağrı transmitterlerinin salıverilmesinin inhibisyonu aracılığı ile gerçekleştiği bilinmektedir. Analjezik mekanizmaların aktivasyonu enkefalin, serotonin veya norepinefrin gibi spesifik nörotransmitterler ile ağrı ileten nöronlarda bulunan reseptörlerin etkileşimi yoluyla gerçekleşir (67). Spinal analjezik mekanizmalar periferden kaynaklanan ağrısız ve ağrılı uyarılarla başlayabildiği gibi supraspinal yapı ve mekanizmalarla da

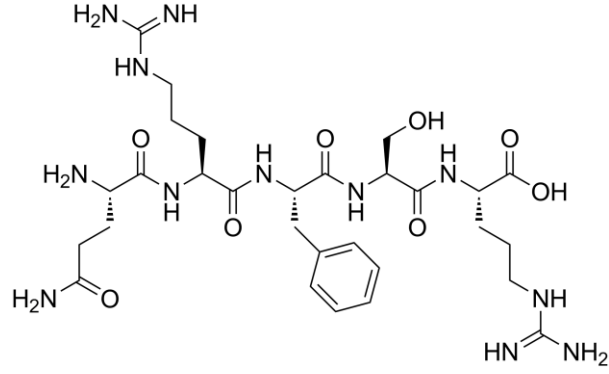
(periaquaduktal gri cevher, lokus seruleus ve medullar nukleuslar) da aktive edilebilir. Supraspinal mekanizmalar opioid sistemle alakalı olarak endorfinlerin salıverilmesi adrenerjik sistem alakalı olarak norepinefrin salıverilmesi ve serotonerjik sistem ile alakalı olarak serotonin salıverilmesini içermektedir. Bu sistemler arasındaki karşılıklı etkileşim spinal analjezik sistemi aktive eder (67).

Endojen analjezik sistem ağrıyı kontrol etmede yetersiz olduğunda analjezik ilaçlar verilerek hastanın semptomları giderilmeye çalışılmaktadır. Ancak, çoğu ilaçlar yetersiz etki göstermekte ya da morfin gibi opioidler ciddi yan tesir kısıtlaması arz etmektedir. Bu amaçla endojen endorfinlerin yıkımının engellenmesi yoluyla ağrı dindirme yaklaşımı umut vaat eden yeni bir yaklaşımdır (67). Bu kapsamda tükrük kökenli endorfin olan opiorfin keşfedilmiş olup, morfinden çok daha güçlü etki göstermektedir (67). Endojen enkefalin katabolize edici enzim inhibitörleri deneysel modellerde test edilmiş ve umut vaat eden sonuçlar elde edilmiştir (67). Ancak, artmış periferel ağrı duyarlılığındaki rolleri, özellikle hangi hücrel sinyalleşme yolları üzerinden etkili oldukları irdelenmemiştir.

4.14. Opiorfin

Endojen peptid mediatörü olan opiorfin ilk kez Wisner ve arkadaşları tarafından keşfedilmiş ve nötral ekto-endopeptidaz (NEP) ve ekto-aminopeptidaz (APN)'ın doğal inhibitörü olarak tanımlanmıştır (2). Membran bağılı metallopeptidazlar olan NEP ve APN anjiyotensin I, anjiyotensin II, bradikinin, kallidin ve enkefalinler gibi pek çok peptidin metabolizmasında rol oynamaktadır (68). NEP ve APN, beyin bölgelerinde özellikle enkefalinler ve opioid peptidlerin bulunduğu bölgelerde lokalize olmuş durumdadır. Daha önce yapılan çalışmalarda sadece NEP ya da APN inhibitörlerinin zayıf analjezik etkiler gösterdiği bulunmuştur. Enkefalinlerin ağrı baskılanmasındaki kritik rolü göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda, met-enkefalinlerin yıkımını engelleyen opiorfinin kuvvetli analjezik etki gösterdiği deneysel çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır. Opiorfinin hangi yollar üzerinden etki ettiğini araştırmayı amaçlayan deneysel çalışmalarda bu etkinin mu (μ) ve delta (δ) opioid reseptörleri üzerinden gerçekleştiği görülmüş, ancak bu etkiyi direkt olarak opioid reseptörlerine bağlanarak değil ekstrasellüler ortamda met-enkefalinlerin konsantrasyonunu koruyarak gösterdiği ileri sürülmüştür (69). Opiorfinin analjezik etkinliğinin, morfinle kıyaslandığı çalışmalarda

opiorfinin morfine göre daha kuvvetli bir analjezik etki gösterdiği ancak bu etkinin morfine oranla daha az sürdüğü gösterilmiştir (70).



Şekil 4: Opiorfinin Kimyasal Yapısı

4.15. Amaç

Bu tez çalışmasının amacı *in vitro* periferel nosiseptif nöron hücre kültürlerinde nosiseptif sinyal belirteci olarak hücre içi serbest kalsiyum düzeyi ölçümü yöntemiyle periferel ağrı ve ağrı duyarlılaşmasında enkefalin yıkılmayıcı enzim inhibitörü olan opiorfinin etkilerini irdelemektir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında sıçan DKG hücre kültürü hazırlanarak hücresel ağrı modeli oluşturuldu. DKG hücrelerinin primer kültürleri Forda ve Kelly (71) tarafından geliştirilen ve aşağıda açıklanan metoda göre gerçekleştirildi.

5.1. Kültür Solüsyonları ve Kullanılan Ajanlar

Hücre kültürü için aşağıda verilen kültür vasatı ve enzimatik ayrıştırma maksadıyla kollegenaz, tripsin ve sinir büyütme faktörü kullanılmıştır. Primer hücre kültürü yapılmasına uygun olan bütün bu ajanlar ticari olarak Sigma firmasından temin edilmiştir.

5.1.2. Kültür Vasatı

100 mililitrelik kültür vasatları aşağıdaki solüsyonları içermektedir

1 ml Penisilin/ Streptomisin (ICN, İngiltere)

120 mg NaHCO₃ (Sigma)

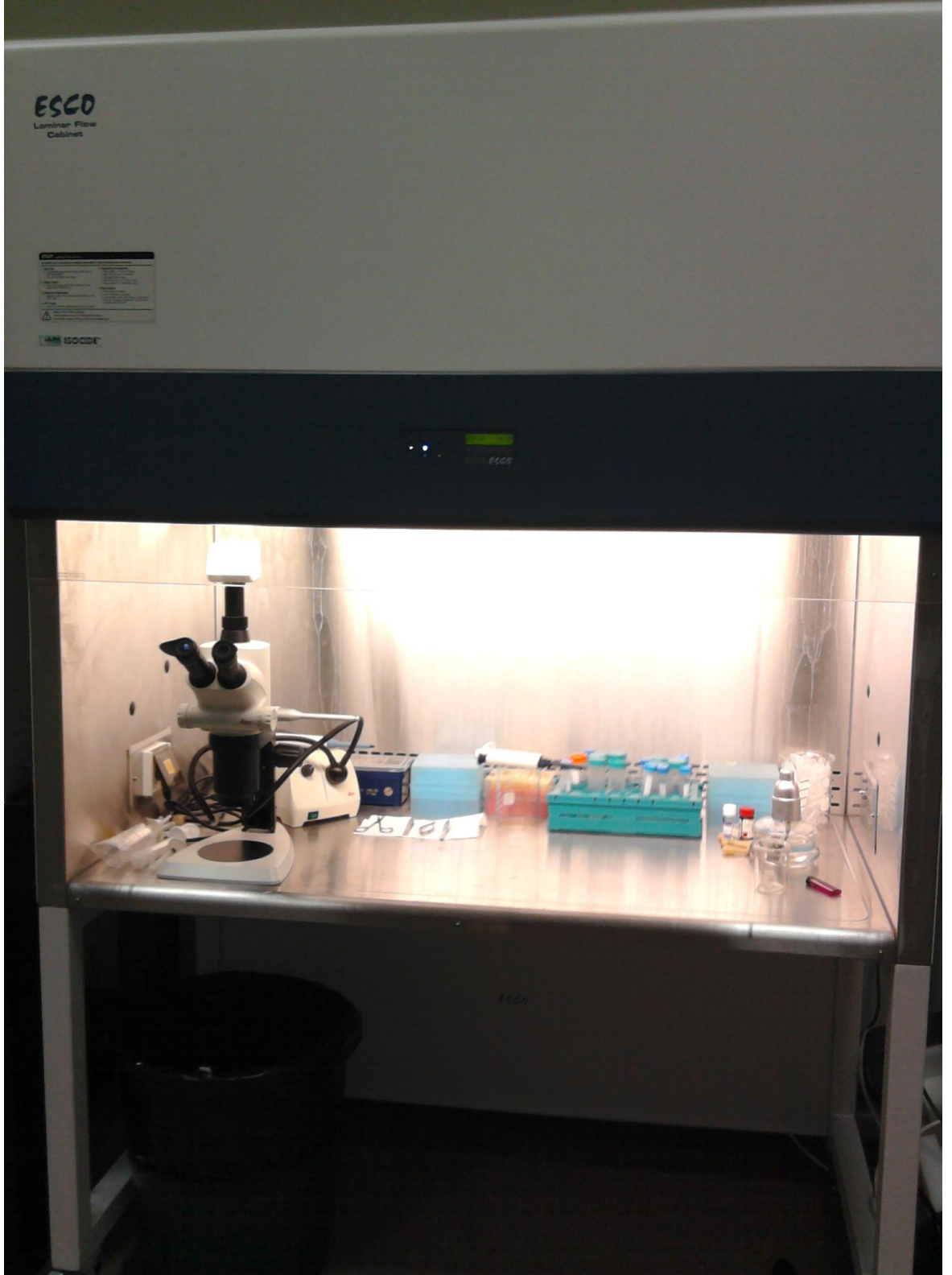
10 ml modifiye edilmiş Dulbeco medyum (Gibco Laboratuvarlar, İngiltere)

10 ml at serumu (Sigma)

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

5.1.3. Hücre Kültürü için Genel Prensipler

Sıçan DKG hücrelerinin primer kültürlerinin yapımı ve bu kültüre hücrelerin saklanması sırasında kontaminasyon durumlarına karşı gerekli asepsi kurallarına uyuldu. Bu maksatla diseksiyon ve enzimatik ayrıştırma işlemleri sabit akımlı güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi (ESCO, Laminar Flow Cabinet). Bunun dışında kullanılan bütün gereç ve solüsyonlar ya steril olarak sağlandı ya da uygun şekilde sterilize edildi.



Şekil 5: Laminar hava akımlı güvenlik kabini

5.1.4. DKG Hücre Kültürü Protokolü

Etanolde (%70'lik) tutulan cam lameller (Thermo Scientific, Almanya) kültür yapımından bir gün önce etanolden çıkarıldı ve sabit akımlı güvenlik kabini içinde steril bir kurutma kağıdı üzerinde kurutuldu. Bundan sonra 100µl poly-L-ornitin (Sigma; 25 mg/ml stok solüsyon) 5ml' lik distile suya ilave edildi ve oluşan bu sıvı çapı 50mm olan steril bir petri kutusuna boşaltıldı. Kuruyan lameller alevden hızla geçirildi ve bu poly-L- ornitin içeren sıvıya yerleştirilerek 37°C'de % 95 oksijen, % 5 karbon dioksit ihtiva eden inkübatörde (Thermo Scientific, Forma STERI-CYCLE CO₂ Incubator, Almanya) bir gece bekletildi. Ertesi gün lameller inkübatörden alındı ve Laminar flow içerisinde steril su ile yıkandı. Her bir lamel üzerine 100µl laminin (Sigma) ilave edilmek suretiyle kültür tablası inkübatöre kaldırıldı. Aynı gün kültür vasatıda hazırlanarak 10ml fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (PBS) ile birlikte bir kısım kültür medyumunu da (~ 40 ml) steril bir plastik tüp içinde inkübatöre yerleştirildi. Diseksiyon cerrahi seti ile birlikte diseksiyon mikroskobu dezenfekte edilerek sabit akımlı güvenlik kabinine alındı.

İki günlük Wistar sıçan yavruları Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Araştırma Merkezi biriminden temin edilerek dekapitasyonla öldürülmek suretiyle yayvan bir petri kutusuna yerleştirildi.

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

DKG gövdeleri disekte edilip petri kutusunda toplandıktan sonra, hassas yuvarlak hareketlerle petri kutusu sallandı. Böylece tüm gangliyonların bir araya toplanması sağlandıktan sonra kültür medyumunu bir pastör pipeti ile çekilerek 900 µl ılık (37°C de inkübe edilmiş) kültür vasatı ile 100 µl kollagenaz (Sigma, 0.125 %) ilave edilip hafif bir şekilde çalkalandı ve 13 dakika süreyle inkübatöre kaldırıldı. Sürenin bitiminde hücre, solüsyon ve enzim karışımı inkübatörden alınarak hızla PBS ile üç defa yıkandı. Bundan sonra 100 µl tripsin (Sigma, 0.25%) ve 900 µl PBS eklenerek hafif bir şekilde çalkalandı ve 6 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından steril plastik tübe

aktarılarak 15 ml ılık kültür vasatı ilave edilerek üç defa yıkandı. Ardından ucu daraltılmış steril bir pastör pipetine hızlı bir şekilde çekilip boşaltılarak gangliyonlar mekanik olarak tek hücrelere ayrıştırıldı. Hemen ardından hücre kültür vasatı süspansiyonuna kültür vasatı ilave edilip 5 ml' ye tamamlandı.

Bir gün önce lamellerin poly-L-ornitinle inkübe edildiği petri kutusuna boşaltılarak 2–3 saat inkübe edildi. Ön inkübasyonda amaç; ölü hücreler ve non-nöronal dokuların uzaklaştırılmasıdır. 2–3 saatlik ön inkübasyonun bitiminde, içinde hücrelerin bulunduğu petri kutusu inkübatörden alındı, üstlerindeki sıvının önemli bir kısmı pastör pipetiyle uzaklaştırıldı ve petri kutusunun dibine yapışmış olan hücreler 1ml'lik taze ılık kültür vasatıyla yıkanarak solüsyona alındı. Petri kutusu mikroskop altında iyice incelenerek bütün hücrelerin uzaklaştırıldığı kontrol edildi. Nöronal olmayan hücreler daha sıkı yapışacağından petri kutusunun tabanında kalacağından ve elimine olacaktır. Hemen ardından hücre süspansiyonuna ılık kültür vasatı eklendi ve 2.4 ml'ye tamamlandı. Son inkübasyon için daha önceden lamininle kaplanan lamellerin bulunduğu küçük petri kutuları inkübatörden alınarak laminin içeren sıvının büyük bir kısmı lamellerden uzaklaştırıldı. Her lamele 20µl sinir büyütmeye faktörü (NGF) ilave edildi ve bir akşam için inkübatöre kaldırıldı. Ertesi sabah her bir petri kutusuna 10 µl NGF ihtiva eden (10 µl/petri kutusu) ılık kültür vasatı ilave edildi ve tekrar inkübatöre kaldırıldı. DKG hücreleri 24 saat sonra Ca^{2+} görüntüleme kayıtları için kullanılmaya başlandı.

5.1.5. Kullanılan ajanlar

Çalışmada kullanılan opiorfin (Sigma) ekstraselüler kayıt çözeltisinde çözüldü. Hücreler, perfüzyon sistemi aracılığı ile sadece kısa süreli (30 sn) yüksek KCl (30 mM) uygulamasına bırakıldı.

5.1.6. Hücre İçi Kalsiyum Görüntüleme ve Görüntü Analizleri

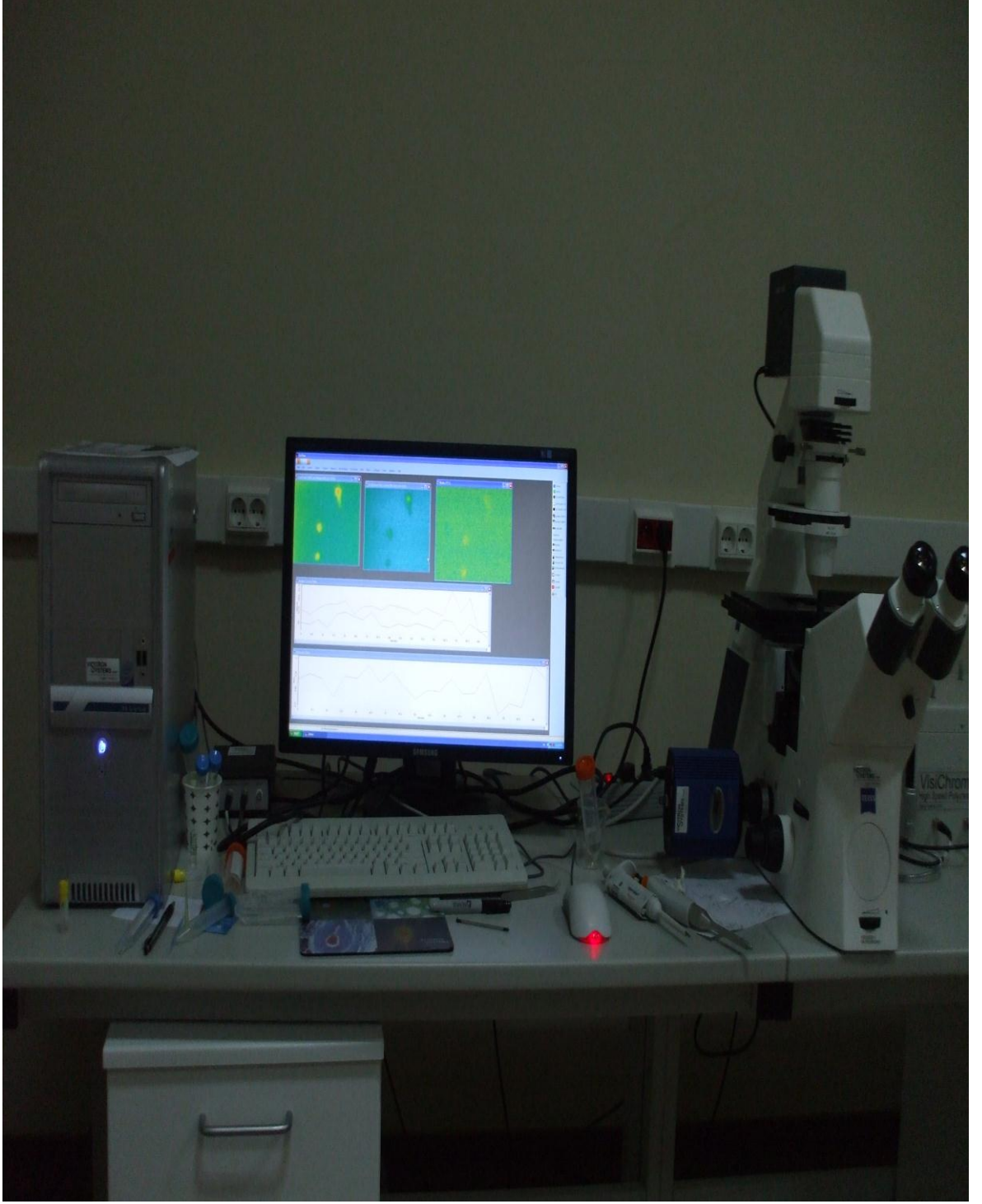
Kültüre edilen hücreler, en az 4–6 saat inkübe edildikten ve lamel üzerine iyice yapışması sağlandıktan sonra kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanıldı. Hücrelerin aksonal ve dentritik uzantılar geliştirmesi floresan kalsiyum görüntüleme hesaplamalarını etkileyebileceği için görüntüleme deneylerinde genelde 1 günlük hücreler kullanıldı.

Hücreler fura-2-AM (5 μ M, Molecular Probes, İngiltere) ile oda sıcaklığında bir saat inkübe edilerek floresan boya yüklemesi yapıldı. Yüklemeyi takiben hücreler 5 dakika aralarla Ca^{2+} -esaslı hücre dışı solüsyonu [130 mM NaCl, 3,0 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 0,6 mM MgCl_2 , 5,0 mM glikoz, 10,0 mM HEPES] (ozmolarite 310 - 320 mOsm NaOH) ile en az üç kez daha yıkanarak, hücre dışındaki boya uzaklaştırıldı ve fura-2'nin de-esterifikasyonu sağlandı ve kalsiyum görüntüleme deneyleri bu hücre dışı kayıt solüsyonu kullanılarak gerçekleştirildi.

Bütün deneyler oda sıcaklığında ($\approx 22^\circ\text{C}$) gerçekleştirildi ve bütün deneysel işlemler hücrelerin floresan işaretleyici ile yüklenmesinden maksimum bir saat içerisinde gerçekleştirildi. Flüoresan boyanın ışığa maruz kalarak ağarmasını sınırlandırmak için optimum pozlama zamanı (exposure time) belirlendi ve bilgisayar kontrollü filtre sürücüsüne yerleştirilen perde (shutter) donanımı aracılığı ile görüntü alınmadığı zamanlarda ışık maruziyeti önlendi.

Fura-2 floresanı, bir Xenon ışık kaynağından (VisiChrome High Speed Polychromoter System, Almanya) gönderilen UV ışınının hızlı bir otomatize filtre sürücüsüne yerleştirilen fura-2 filtre seti 340 ve 380 nm filtrelerden gönderilerek mikroskop optikleri (Zeiss, Almanya) aracılığı dual eksitasyon ve 510 nm'de emisyon gerçekleştirildi. Flüoresan görüntüleri yüksek hızlı soğutmalı dijital bir CCD kamera (Cool SNAP_{EZ}, Photometrics, Tucson, AZ) aracılığı ile veri kazanım-yazılım programı aracılığı ile bilgisayar hafızasına kayıt edildi.

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



Şekil 6: Kalsiyum Görüntüleme Sisteminin Görünümü

5.1.7.İstatistik

Bütün veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunuldu. Verilerin karşılaştırılmasında eşleşmemiş t testi kullanıldı ve $P < 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

Bu tez çalışmasının gerçekleştirildiği deneysel koşullarda, kalsiyuma duyarlı boya olan fura-2 ile yüklenmiş DKG nöronlarından dakikalarca (45-60 dakika) stabil flüoresan sinyalleri kayıt edilebilmektedir. Yine bu kültüre sinir hücreleri standart olarak yüksek K^+ (30 mmol/L) ile uyarılmaya hücre içi serbest kalsiyum düzeyinde artışla cevap vermektedir.

Bu tez çalışmasında, hücrelerde materyal ve metot kısmında ayrıntılı olarak bahsedilen floresan kalsiyum görüntüleme yöntemi kullanılarak hücre içi serbest kalsiyum düzeyi değişiklikleri takip edildi. DKG hücrelerinin ve hücre çapına göre alt tiplerinin non-spesifik depolarizasyon olarak yüksek KCl (30 mM) ile uyarıma cevaplılığı ve bu depolarizasyon cevaplarına opiorfinin etkileri irdelendi.

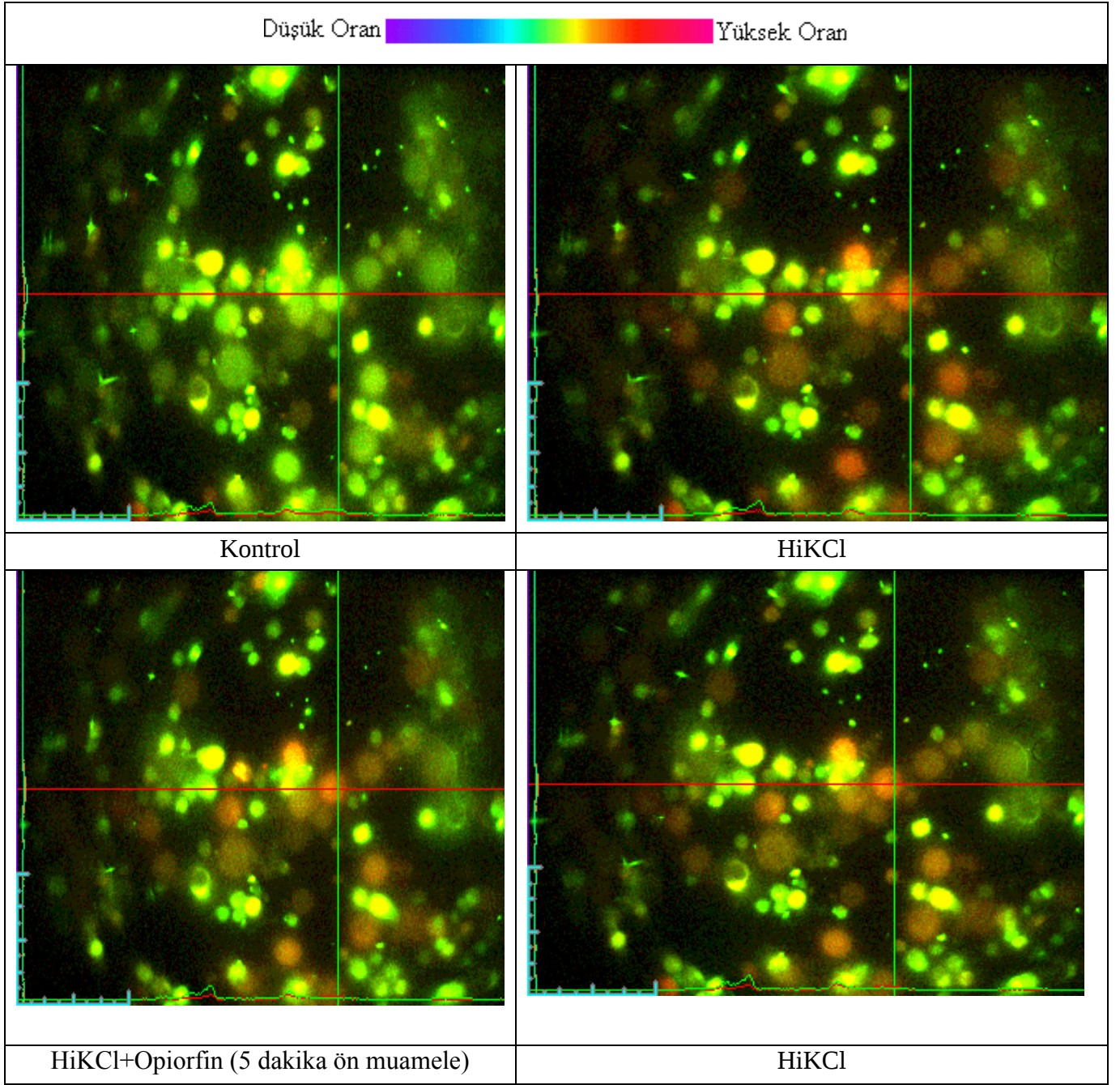
Opiorfinin DKG Hücrelerinde Depolarizasyonla İndüklenen Hücre içi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

İlk aşamada opiorfinin DKG hücrelerinde bazal kalsiyum sinyalleri üzerine etkileri incelendi. Opiorfinin 10 mM gibi yüksek dozlarında bile (yüksek doz bile etkisiz olduğu için düşük dozlara ait bulgular sunulmamıştır) hücre içi bazal kalsiyum düzeyinin etkilenmediği tespit edildi.

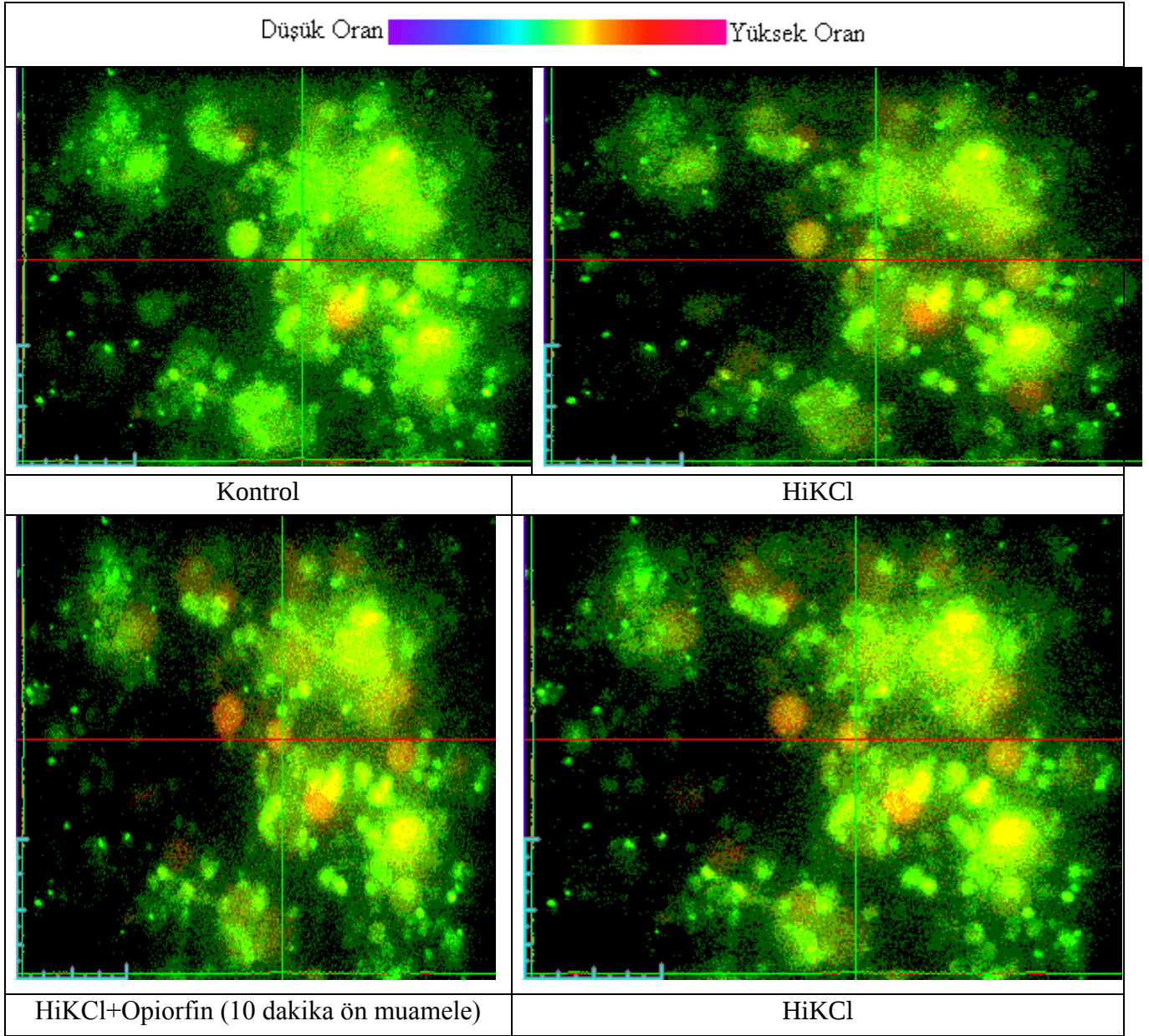
Yüksek K^+ ’un sıçan dorsal kök gangliyon (DKG) hücre kültürlerinde $[Ca^{2+}]_i$ düzeylerine etkisi.

Akut opiorfin uygulaması DKG hücrelerinde KCl (30 mM) ile tetiklenen hücre içi kalsiyum artışı üzerine 5, 10, 15 dakikada test edilen hiçbir doz için anlamlı bir etki etmedi (şekil1-3). Ancak 30 dakikalık ön muamele sonrasında opiorfinin 100 mikromolar dozları bile KCl cevaplarını anlamlı ölçüde inhibe etti (Şekil4, 5).

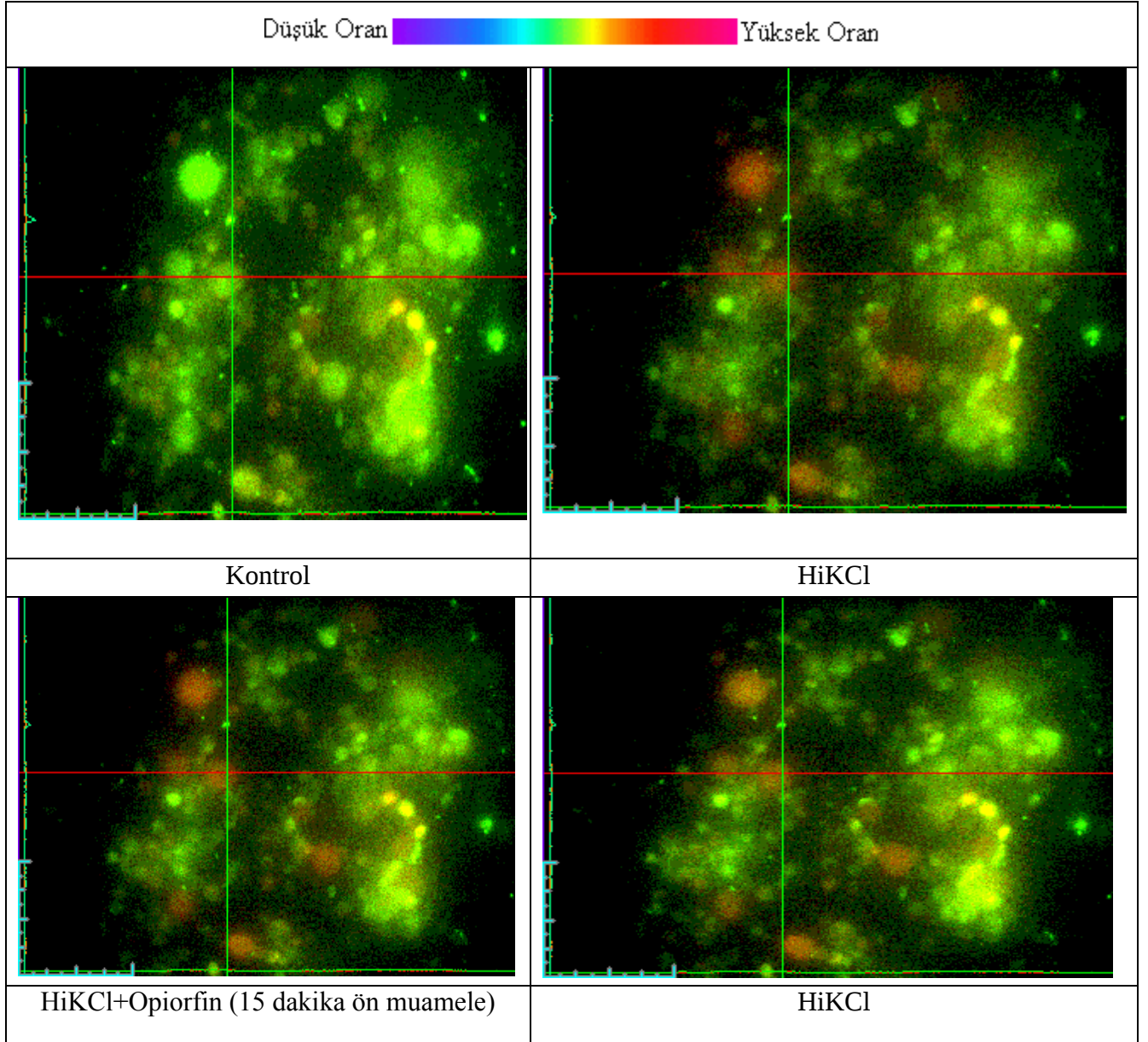
Fura-2 ile yüklenmiş DKG hücrelerinde kontrol koşullarında (bazal, sol sütun) ve KCl (30 mM) ile süperfüzyon esnasında flüoresan oranını gösteren orijinal resimler.



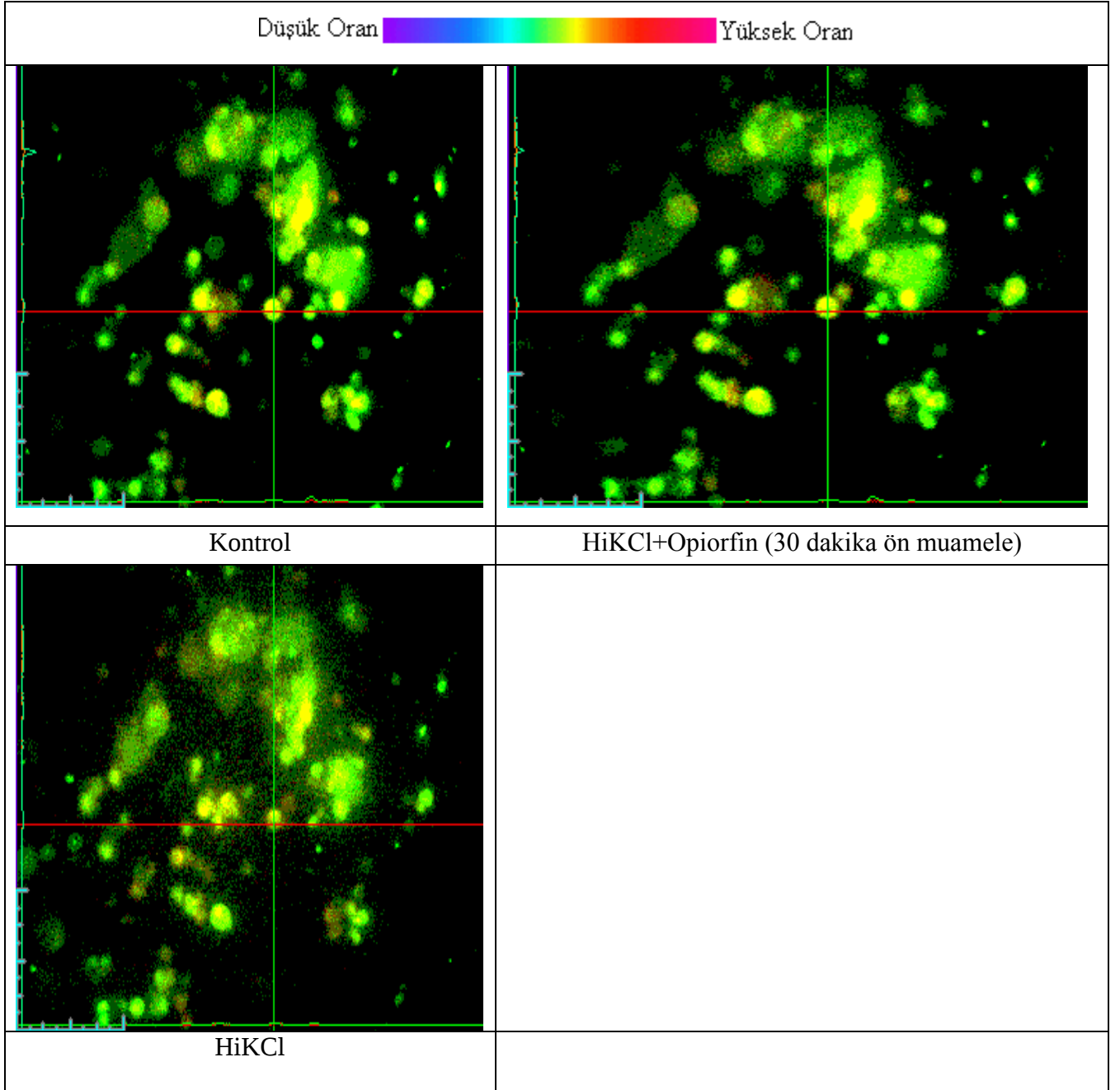
Şekil 1. $[Ca^{2+}]_i$ düzeyleri, fura-2 AM boyası kullanılarak, Non spesifik depolarizasyon meydana getiren KCl indüklenmesini takiben farklı konsantrasyonlarda opiorfinin (10 μ M, 100 μ M, 1mM ve 10 mM) 5 dakika ön muamelesini takiben KCl uygulanması ve ardından tekrar KCl uygulaması ile ortaya çıkan sitoplazmik serbest kalsiyum konsantrasyonu görülmektedir.



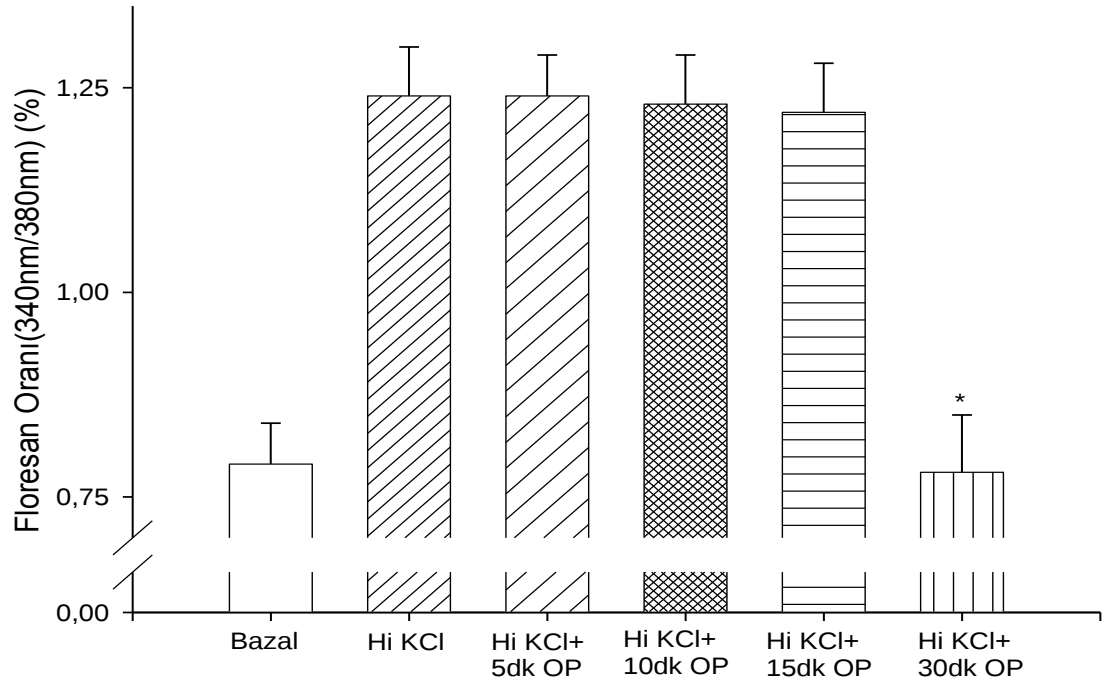
Şekil 2. $[Ca^{2+}]_i$ düzeyleri, fura-2 AM boyası kullanılarak, Non spesifik depolarizasyon meydana getiren KCl indüklenmesini takiben farklı konsantrasyonlarda opiorfinin ($10\mu M$, $100\mu M$, $1mM$ ve $10mM$) 10 dakika ön muamelesini takiben KCl uygulanması ve ardından tekrar KCl uygulaması ile ortaya çıkan sitoplazmik serbest kalsiyum konsantrasyonu görülmektedir.



Şekil 3. $[Ca^{2+}]_i$ düzeyleri, fura-2 AM boyası kullanılarak, Non spesifik depolarizasyon meydana getiren KCl indüklenmesini takiben farklı konsantrasyonlarda opiorfinin (100 μ M)+ KCl'nin 10 dakika süreyle uygulanması ve ardından tekrar KCl uygulaması ile ortaya çıkan sitoplazmik serbest kalsiyum konsantrasyonu görülmektedir.



Şekil 4. $[Ca^{2+}]_i$ düzeyleri, fura-2 AM boyası kullanılarak, Non spesifik depolarizasyon meydana getiren KCl indüklenmesini takiben farklı konsantrasyonlarda opiorfinin ($100\mu M$)+ KCl'nin 30 dakika süreyle uygulanması ve ardından tekrar KCl uygulaması ile ortaya çıkan sitoplazmik serbest kalsiyum konsantrasyonu görülmektedir. Opiorfinin 30 dakika ön uygulaması KCl'ün meydana getirdiği artışı geri dönüşümsüz bir şekilde baskılamaktadır



Şekil 5. Opiorfinin ($100\mu\text{M}$) uygulamasının $[\text{Ca}^{2+}]_i$ düzeyleri üzerine meydana getirdiği etkinin zaman bağımlı olarak incelenmesi görülmektedir.

7. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında opiorfinin antinoseptif etkisi, DKG hücre kültürlerinde hücre içi Ca^{2+} görüntüleme tekniği kullanılarak incelendi. DKG hücreleri trigeminal hücreler ile birlikte primer duysal nöronlardır. Bu nöron grupları somatosensoryal yolağın ilk basamağını oluştururlar. DKG nöronları Ca^{2+} kanalları, Na^+ kanalları, ağrı iletiminde rol alan fonksiyonel reseptörler gibi pek çok ağrı bileşenini içerir. DKG nöronları ayrıca, günümüzde ağrı kesicilerin hedef noktalarından biri olan opioid reseptörleri de içerir. Normal koşullarda sessiz olan DKG nöronları ağrılı bir uyarı ile uyarıldığında, hücre içi haberci sistemleri devreye girer ve hücre içi serbest Ca^{2+} seviyelerinde artış görülür.

Kültüre DKG nöronları da ağrı iletiminde rol alan birçok reseptör ve iyon kanalını içerir. DKG nöron kültürünün sağladığı bu avantajlar, bu nöron gruplarının nosisepsiyon ile alakalı *in vitro* çalışmalarda yaygın olarak kullanılmasına neden olmaktadır (72). Bu tez çalışmasının deney protokollerinde uyarılan DKG nöronlarında hücre içi serbest Ca^{2+} miktarının, bağlı Ca^{2+} miktarına olan oranı yarım saatlik kayıtlar altında gözlemlendi. Kullanılan uyarı büyük, orta ve küçük çaplı DKG nöronlarında non-selektif depolarizasyona neden olan ve buna bağlı olarak voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarını açan KCI oldu. Verilen uyarıcı ajan DKG nöronlarında desensitizasyona neden olmaması için 30 sn süreyle uygulandı. Bu süre sonunda hücre dışı kayıt solüsyonuyla hücreler yıkandı. Deney protokolünde 30 mM KCI uygulanarak nöronlarda hücre içi serbest Ca^{2+} miktarında artışa neden olundu, 30 sn sonunda hücreler yıkanarak preparata 10 mM opiorfin uygulandı. Opiorfin akut fazda hücre içi serbest Ca^{2+} düzeyinde anlamlı bir düşüşe neden olmadı. En belirgin düşüş 20 dk dan sonra gözlemlendi. Yarım saatlik kayıtların sonlarına doğru hücre içi serbest Ca^{2+} düzeyinin neredeyse başlangıçtaki düzeylere kadar düştüğü gözlemlendi. Yarım saatlik sürenin sonunda hücreler tekrar KCI ile uyarıldı. Uyarılma sonucu hücre içi Ca^{2+} düzeyinde bir artış gözlenmesine rağmen opiorfin öncesi KCI uygulanmasına oranla çok daha küçük bir artış gözlemlendi.

Hücre yüzeyinde bulunan ektopeptidazlar, nöral ve hormonal sinyalleşme üzerinde önemli etkilere sahiptir ve bu ektopeptidazlar duysal enformasyonun işlenmesinde de rol almaktadır. Sinir sistemi ve sistemik dokularda hücre yüzeyine lokalize olmuş şekilde bulunan ektopeptidazlar, nöropeptitlerin ve düzenleyici

peptitlerin katalizlenmesinde veya sekresyon sonrası süreçte görev alır. Özellikle reseptör-bağımlı etki gösteren tehdit edici ve stres doğuran çevresel uyaranlara adaptasyonu sağlayan P maddesi ve enkefalinlerin metabolizmasında önemli rol oynarlar. P maddesi ve enkefalinler, spinal seviyede nosiseptif süreçte duysal ve motivasyonel cevapların oluşumunda da etkin rol oynar. Bir heptapeptid olan ve bovin spinal kordundan izole edilen spinorfinin enkefalin yıkıcı ektoenzimler olan NEP (nötral endopeptidaz) ve APN (aminopeptidaz) aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Yine fare tükürüğünden izole edilen sialorfinin ağrı algılanmasında baskılayıcı etki gösterdiğinin ortaya çıkması aynı etkiye sahip bir peptidin insanda olabileceği fikrini ortaya çıkarmış ve insan tükürüğünde de opiorfinin keşfi ile karşılaşmıştır. Opiorfini ilk kez keşfeden Anne Wisner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HEK293 (human embriyonic kidney 293 cell) hücreleri kullanılmış ve opiorfinin NEP ve APN üzerine olan etkisi araştırılmıştır (2). Deney protokolünde NEP in substratı olan Mca-BK2 ve APN nin substratı olan L-alanin-*p*-nitoanilid kullanılmıştır. Sentetik NEP inhibitörü olan tiorfan(0.5 mM), 83% oranında Mca-BK2 yıkımını önlemiş. Ortama 10 dan 90 mM a kadar opiorfin eklenmesi de benzer etki görülmüş. Opiorfinin etkisinin doza bağımlı olduğu ve en etkin dozun 33 mM olduğu belirtilmiştir. APN inhibitörü olan bestatin (50 mM), L-alanin-*p*-nitoanilid yıkımını 89% oranında engellemiş, yine 10 dan 90 mM a kadar uygulanan opiorfinde benzer etkiyi göstermiştir. Bu protokolde de opiorfin doza-bağımlı etki göstermiş ve en etkin dozun 65 mM olduğu belirtilmiştir. Bu veriler ışığında opiorfinin NEP ve APN nin doğal inhibitörü olduğu belirtilmiştir. Yine aynı araştırmacı grubun opiorfinin, analjezik etkisini araştırmak üzere yaptığı çalışmada bir ağrı araştırma modeli olan formalin test uygulanmıştır. Opiorfin (1 mg/kg) belirgin bir şekilde analjezik etki göstermiş ve bu etkinin aynı zaman periyodunda morfine (3 mg/kg) göre daha etkin olduğu belirtilmiştir (2). Daha önce yapılan çalışmalarda Ca^{2+} kanal blokerlerinin, morfinle indüklenmiş analjezik etkinliği arttırdığı belirtilmiştir (73). Opiorfinin, analjezik etkinliği bilinen morfin ile benzer analjezik etki göstermesi bu tez çalışmasının verileri ile örtüşmektedir. Ca^{2+} un ağrıdaki rolü göz önüne alındığında morfin gibi analjezik etkinliği bilinen ve Ca^{2+} sinyalleşmesine etkisi olan bir ajana benzer etki gösteren opiorfinin de analjezik bir madde olduğu hem daha önce yapılan çalışmaların verileri ile hem de bu tez çalışmasının verileri ile örtüşmektedir. Başka bir çalışmada, 1.25 den 10 μ g/kg a kadar farklı dozlarda uygulanması, davranışsal ağrı

modeli olan kuyruk immersion test de belirgin bir şekilde ağrı eşiklerinin düşmesine sebep olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada opiorfin hem doz hem de zaman bağımlı etki göstermiştir (70). Davranışsal ağrı ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, opiorfinin deney hayvanlarında ağrı eşiğini azalttığı ve belirgin bir analjezik etki gösterdiği gösterilmiş, bu analjezik etkinin, diğer bazı ağrı kesiciler gibi bağımlılık oluşturmadığı ve deney hayvanlarında anksiyete vb durumların oluşmadığı ortaya konulmuştur (74).

Opiorfinle ilgili yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, opiorfinin analjezik etkisini opioid reseptörler üzerinden gerçekleştirdiği ve bu süreçte kappa (κ) ve mu (μ) opioid reseptörlerinin rol aldığı kullanılan opioid reseptör antagonistleriyle ortaya konulmuş bulunmaktadır. Ancak bu etkinin opiorfinin direkt olarak bu reseptör alt tiplerine bağlanarak değil, ortamda bulunan enkefalinlerin yoğunluğunu koruyarak ortaya çıkardığı vurgulanmaktadır. Yine sunulan veriler arasında opiorfinin maksimum etki gösterdiği sürenin enjeksiyondan sonra 10-20.dk da ortaya çıktığı ve 20.dk dan sonra kaybolduğu belirtilmektedir.

Sonuç olarak; gerek daha önce yapılan çalışmalar gerek bu tez çalışmasının verileri endojen bir peptid olan opiorfinin analjezik etki gösterdiğini sunmaktadır. Bu tez çalışmasında, opiorfinin ağrı oluşumunda kritik role sahip hücre içi serbest Ca^{2+} seviyesinde baskılama göstermesi tezin amacı ile örtüşmektedir. Hücresel ağrı modeli çalışılan bu tez çalışması, opiorfinin ileriye dönük çalışmaları için ışık tutmaktadır. İleriye dönük araştırmalarda ki hedef, opiorfinin bu etkiyi hangi reseptörler üzerinden gösterdiği, hücresel mekanizmanın derin bir şekilde incelenmesi ve verilerle sunulan analjezik etkisinin ne gibi modülasyonlarla daha güçlü ve uzun süreli olabileceğidir.

8. KAYNAKLAR

1. Chu LF, Clark DJ, Angst MS: Opioid tolerance and hyperalgesia in chronic pain patients after one month of oral morphine therapy: a preliminary prospective study. *J Pain*; 7: 43-8, 2006.
2. Wisner A, Dufour E, Messaoudi M, Nejdı A, Marcel A, Ungeheuer MN: Human opiorphin, an atural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, pp. 17979-17984, 2006.
3. Konner R: Pain Management Secrets. Ağrının Sırları. Çeviren: Özyalçın N, Dinçer Ş Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Sti. İstanbul, 2005.
4. Daniel B, Carr MD: Pain Control: The New 'Whys' and 'Hows'. International Assosiation for The Study of Pain, 1, 1993.
5. Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* 137(3):473–477, 2008.
6. Raymond SS, Oscar A, Eugene RV, Ginsberg B: Acute Pain Management. Cambridge University Pres, 2009.
7. Ignatavicius DA, Workman ML: Medical-Surgical Nursing/Critical Thinking for Collaborative Care. 5th ed. Philadelphia, PA: Saunders:66–67, 2006.
8. Treede RD: Peripheral acute pain mechanisms. *Ann Med* 27(2):213–6, 1995.
9. Turk D.C, Okifuji A, Loeser D. Butler S.H, Chapman JJ: Pain terms and taxonomies. Bonica's management of pain (3 ed.). Lippincott Williams & Wilkins. pp. 18–25 2001.
10. Coda BA, Bonica JJ: "General considerations of acute pain". Bonica's management of pain (3 ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
11. Bogduk N, Merskey H: Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms (second ed.). Seattle: IASP Press. p. 212 1994.
12. Spanswick CC, Main CJ: Pain management: an interdisciplinary approach. Edinburgh: Churchill Livingstone. P.93.p.163, 2000.
13. Anthony KP, Jones MB: Pain, its Perception and Pain Imaging (Ed: Charles B. Bedre). Technical Corner from IASP Newsletter, 1997.
14. Sherrington C: The Integrative Action of the Nervous System. Oxford: Oxford University Pres, 1996.

15. Jessell A, Thomas MK, Eric RS, James H: Principles of neural science. Norwalk CT: Appleton & Lange. s472–479, 1991.
16. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A, McNamara JO White LE: Neuroscience. Fourth edition. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. Print, 2008.
17. Chakour MC, Gibson SJ, Bradbeer M, Helme RD: The effect of age on A delta-and C fibre thermal pain perception. *Pain* 64(1): 143–152, 1996.
18. Helms EJ, Baron CP: Physiology and treatment of pain. *Crit Care Nurse*, 28(6):38-49, 2008.
19. Lux EA, Juncker U: Opiates in the treatment of tumor related pain. *MMW Fortschr Med*. 153(20):50-1, 2011.
20. Smith EM, Bakitas MA, Homel P, Piehl M, Kingman L, Fadul CE, Bookbinder M: Preliminary Assessment of a Neuropathic Pain Treatment and Referral Algorithm for Patients with Cancer. *J Pain Symptom Manage*, 2011.
21. Charlton JE: Core Curriculum for Professional Education in Pain. IASP Press, Seattle, 2005.
22. Santoro D, Savica V: Development of the concept of pain in history. *J Nephrol*. 24: S133-6, 2011.
23. Price SA, Wilson LM: Pathophysiology, clinical concepts of disease process, 5th ed. pp. 819–848. St. Louis: Mosby-Year Book Inc, 1997.
24. Ertekin C: Ağrının Nöroanatomisi ve Nörofizyolojisi. Ağrı ve Tedavisi. Yapım Matbaacılık, İzmir, 1–18, 1996.
25. Nilesh P: Pain Management. Physiology of Pain. IASP Press, 2009.
26. Heavner JE, Willis WD: Pain pathways: Anatomy and physiology. In: Raj PP (ed). Practical Management of Pain. 3 ed. St Louis: Mosby Inc. 107–45, 2000.
27. Dubin AE, Patapoutian A: Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 120(11):3760–72, 2010.
28. Zhong YQ, Li KC, Zhang X: Potentiation of excitatory transmission in substantia gelatinosa neurons of rat spinal cord by inhibition of estrogen receptor alpha. *Molecular Pain*. 6(92), 2010.
29. Min Zhuo: Central inhibition and placebo analgesia. *Molecular Pain* 1(21), 2005.

30. Carrier-Kohlman V, Lindsey AM, West CM: Pathophysiologic phenomena in nursing: Human response to illness 3rd ed. pp. 235–254, 2003.
31. Nuwer MO, Picchione KE, Bhattacharjee A: PKA-Induced Internalization of Slack KNa Channels Produces Dorsal Root Ganglion Neuron Hyperexcitability. *J Neurosci* 30 (42), 2010.
32. Zhang JZ, Karbat I, Cohen L, Yarov-Yarovoy V, Scheuer T, Gordon D, Gurevitz M, Catterall WA: Structure-function map of the receptor site for {beta}-scorpion toxins in domain II of voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem.* 2011
33. Okuse K: Pain signalling pathways: From cytokines to ion channels. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(3) P.490-496, 2007.
34. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science, 2002.
35. Catterall WA: From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26(1):13-25, 2000
36. Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG: The roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of pain. *Pain*: 131(3): 243–257, 2007.
37. Chattopadhyay M, Mata M, Fink DJ: Vector-mediated release of GABA attenuates pain-related behaviors and reduces Na(V)1.7 in DRG neurons. *Eur J Pain.* 2011
38. Matzner O, Devor M: Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels. *J Neurophysiol* 72, 349–359, 1994.
39. Delmas P: SnapShot: ion channels and pain. *Cell*: 134(2):366-366.e1, 2008.
40. Rasband MN, Park EW, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Trimmer JS: Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. Ed: Lily Y. Jan, 2001.
41. MacKinnon R: Potassium channels. *FEBS Lett.* 555, 62– 65, 2003.
42. Gutman G: Compendium of voltagegated ion channels: potassium channels. *International Union of Pharmacology: XLI. Pharmacol. Rev.* 55,583-586, 2003.
43. Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP: Calciumactivated potassium channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 321– 329, 1998.
44. Roosild TP, Le KT, Choe S: Cytoplasmic gatekeepers of K⁺ channel flux: a structural perspective. *Trends Biochem. Sci.* 29, 39– 45, 2004.

45. Gabriel A, Abdallah M, Yost CS, Winegar BD, Kindler CH: Localization of the tandem pore domain K⁺ channel KCNK5 (TASK-2) in the rat central nervous system. *Mol. Brain Res.* 98, 153–16, 2002.
46. Price JT, Cervero F, Gold MS, Hammond DL, Prescott SA: Chloride Regulation in the Pain Pathway. 10.1016/j.brainresrev, 2008.
47. Zamponi GW, Snutch TP: Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Curr Opin Neurobiol* 8: 351–356, 1998
48. Yu-Qing Cao: Voltage-gated calcium channels and pain. *Pain*: 126, 5–9, 2006.
49. Tsien RW, Wheeler DB: Voltage-gated calcium channels. Ed: Carafoli E, Klee CB. *Calcium as a cellular regulator*. New York: Oxford University Press: p. 171–99, 1999
50. Prado WA: Involvement of calcium in pain and antinociception. *Braz J Med Biol Res.* 34: 449-461, 2001.
51. Berridge MJ: Neuronal Calcium Signaling. *Neuron*, 21, 13–26. Cell Press. 2001.
52. Wang H, Kohno T, Amaya F, Brenner GJ, Ito N, Allchorne A, Ji RR, Woolf CJ: Bradykinin Produces Pain Hypersensitivity by Potentiating Spinal Cord Glutamatergic Synaptic Transmission. *J. Neurosci.* 25(35):7986-7992, 2005.
53. Ryglewski S, Pflueger HJ, Duch C: Expanding the Neuron's Calcium Signaling Repertoire: Intracellular Calcium Release via Voltage-Induced PLC and IP3R Activation. *PloS Biol*, 5(4):e66, 2007.
54. Adams A: Untagging Neuronal Calcium Signaling. *The Scientist*, 16(2):36, 2002.
55. Narumiya S, Furuyashiki T: Fever, inflammation, pain and beyond: prostanoid receptor research during these 25 years. *FASEB J*, (3):813-8, 2011.
56. Chong Y, Choo H: 5-HT₃ antagonists under development. *Expert Opin Investig Drugs* (11):1309-19, 2010.
57. Ye Y, Dang D, Zhang J, Viet CT, Lam DK, Dolan J, Gibbs J, Schmidt BL: Nerve growth factor links oral cancer progression, pain, and cachexia. *Mol Cancer Ther.* 2011.
58. Cortright DN, Krause JE, Brom DC: TRP channels and pain. *Biochim Biophys Acta*;1772(8):978-88, 2007.
59. North RA: Surprenant A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 563-80, 2000.
60. Burnstock G: Purinergic receptors and pain. *Curr Pharm Des* 15(15):1717-35, 2009.

61. Camprubí-Robles A, Ferrer-Montiel R: Contribution of Ion Channel Trafficking to Nociceptor Sensitization. *The Open Pain Journal*: 3, 108–11, 2010.
62. Devor M: Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain* 6: S27–S35, 1999.
63. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D: The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824, 1997.
64. Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, Sorkin LS, Stauderman KA, Williams ME, Yaksh TL: Upregulation of Dorsal Root Ganglion $\alpha_2\delta$ Calcium Channel Subunit and Its Correlation with Allodynia in Spinal Nerve-Injured Rats. *J Neurosci* 21(6):1868-1875, 2001.
65. Komuro H, Kumada T: Ca^{2+} transients control CNS neuronal migration. *Cell Calcium*: 387–393, 2005.
66. Ayar A, Scott RH: The actions of ryanodine on Ca^{2+} -activated conductances in rat cultured DRG neurones; evidence for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359(2):81-91, 1999.
67. Xie H, Woods JH, Traynor JR, Ko MC: The spinal antinociceptive effects of endomorphins in rats: behavioral and G protein functional studies. *Anesth Analg* 106: 1873-81, 2008.
68. Erdős EG, Skidgel RA: Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *Lancet*, pp. 1525–1532, 2001.
69. Javelot H, Messaoud M, Garnier S, Rougeot C: Human opiorphin is a naturally antidepressant acting selectively on enkephalin-dependent δ -opioid pathways. *J Physiol Pharmacol*: 61, 3, 355-362, 2010.
70. Tian XZ, Chen J, Xiong W, He T, Chen Q: Effects and underlying mechanisms of human opiorphin on colonic motility and nociception in mice. *Peptides* 30, 7, Pages: 1348–1354, 2009.
71. Forda S, Kelly JS: The possible modulation of the development of rat dorsal root ganglion cells by the presence of 5-HT- containing neurones of the brainstem in dissociated cell culture. *Brain Res* 354(1): 55–65, 1985.
72. Vyklický L, Knotková-Urbancová H: Can sensory neurones in culture serve as a model of nociception? *Physiol Res.* 45(1):1-9, 1996.

73. Kumar R, Mehra RD, Ray SB: L-type calcium channel blockers, morphine and pain. *Indian J Anaesth.* 2010 Mar;54(2):127-31, 2010.
74. Rougeot C, Robert F, Menz L, Bisson JF, Messaoudi M: Systemically active human opiorphin is a potent yet non-addictive analgesic without drug tolerance effects. *J Physiol Pharmacol* 61(4):483-90, 2010.

9.ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik/Pasaport No : 38450108212
Soyadı, Adı : KALKAN, Ömer Faruk
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum tarihi ve yeri : 15.06.1986 Çaykara/TRABZON
Medeni hali : Bekar
Telefon : 05376858261
e-posta : omerfarukkalkan61@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2011
Lisans	Fırat Üniversitesi	2009
Lise	Balakgazi Lisesi	2003

YANANCI DİL

İngilizce