

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI



NESFATİN-1'İN SIÇAN DUYUSAL
NÖRONLARINDA KALSİYUM
SİNYALLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep Betül GÖK

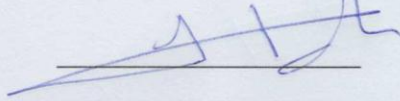
2016

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

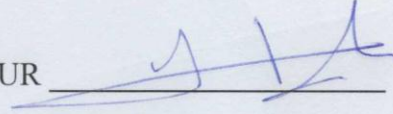


Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

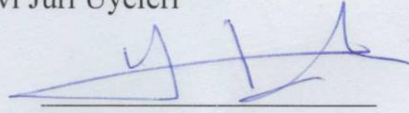
Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR



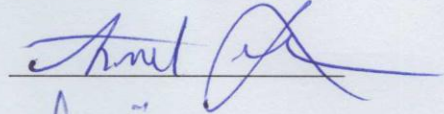
Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

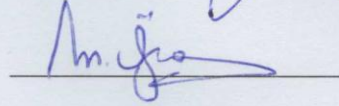
Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR



Prof. Dr. Ahmet AYAR



Doç. Dr. Mete ÖZCAN



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkı sağlayan danışmanım Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a en içten şükranlarımı sunarım.

Tez çalışması süresince her türlü yardımını benden esirgemeyen Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mete ÖZCAN'a, Fizyoloji Anabilim Dalında Araş. Gör. Nazife ÜLKER'e, Araş. Gör. Ahmet YARDIMCI'ya, biricik kardeşim Dr. İsmail Burak GÖK'e ve bana katlanan aileme teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRAC.....	2
3. GİRİŞ	3
3.1. İyon Kanalları ve Membranın Elektriksel Özellikleri	3
3.2. İyon Kanallarının İyon Seçiciliği ve Açık-Kapalı Haller Arasındaki Değişimi	3
3.3. Nernst Denklemi ve İyon Akışı	7
3.4. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları (VKKK).....	9
3.4.1. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının Moleküler Özellikleri.....	9
3.4.2. Yüksek Voltaj ile Aktive Olan Ca^{+2} Kanalları (YVAKK).....	10
3.4.2.1. L- Tipi Kanallar	10
3.4.2.2. N- Tipi Kanallar.....	11
3.4.2.3. Diğer YVA Kalsiyum Kanalları: P-, Q- ve R- Tipleri.....	15
3.4.2.4. R- Tipi Kanallar	17
3.5. Kalsiyum Kanallarının Alt Birimler	18
3.5.1. α -1 Alt Birimi.....	18
3.5.2. α 2 δ Alt Birimi	19
3.5.3. β Alt Birimi	19
3.5.4. γ Alt Birimi.....	20
3.6. Ağrı Duyusu.....	22
3.6.1. Hücresel Ağrı Modelleri.....	23
3.7. Nesfatin-1	24

4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
4.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinin Primer Kültürü	31
4.1.1. Kültür İçin Kullanılan Kimyasal Ajanlar ve Solüsyonlar	31
4.1.2. Kültür Vasatı	32
4.1.3. Kültür İçin Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri	32
4.1.4. Diseksiyon Malzemeleri.....	33
4.1.5. Diğer Ekipmanlar	33
4.1.6. Dorsal Kök Gangliyonu (DKG) Hücre Kültürü Hazırlarken Uygulanan Genel Prensipler	33
4.1.7. Dorsal Kök Gangliyonu Hücre Kültürü Protokolü.....	34
4.2. Hücre İçi Kalsiyum Görüntüleme ve Görüntü Analizleri.....	35
4.2.1. Floresan Kalsiyum Görüntüleme.....	35
4.3. Nesfatin-1 Uygulanması	36
4.4. İstatistik.....	37
5. BULGULAR.....	38
6. TARTIŞMA	45
7. KAYNAKLAR	47
8. ÖZGEÇMİŞ.....	60

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1: Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanal Alt Üniteleri	21
Tablo 5.1: Nesfatin-1 Uygulanmasına Cevap Veren ve Vermeyen Hücreler	38
Tablo 5.2: Nesfatin-1 Uygulanmasını Takiben DRG Nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ miktarı artışı.....	39



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1: Kapalı ve açık konformasyonu gösterilen tipik bir iyon kanalı	4
Şekil 3.2: Farklı uyaranların iyon kanalları üzerine etkileri	5
Şekil 5.1: A) DKG nöronlarına uygulanan farklı dozlardaki Nesfatinin (1nM, 10 nM ve 100 nM) $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri. B) Nesfatin-1'in (1nM, 10 nM ve 100 nM) sıçan dorsal kök gangliyon hücre kültürlerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisini gösteren orijinal resim.....	40
Şekil 5.2: DKG nöronlarına uygulanan nesfatinin (100 nM) $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine artışı Gi/o proteinleri aracılığıyla meydana getirmesi.....	41
Şekil 5.3: DKG nöronlarına uygulanan nesfatinin (100 nM) $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine artışında hücre içi kalsiyum depolarının rolü.....	42
Şekil 5.4: DKG nöronlarına uygulanan nesfatinin (100 nM) $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine artışında PKC'nin rolü	43

KISALTMALAR LİSTESİ

NUCB2	: Nükleobindin 2
DKG	: Dorsal Kök Gangliyonu
[Ca⁺²]_i	: Hücre İçi Kalsiyum
PKC	: Protein Kinaz C
Na⁺	: Sodyum İyonu
K⁺	: Potasyum İyonu
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
Cl	:Klor İyonu
H⁺	: Hidrojen İyonu
ΔG	: Gibbs Serbest Enerji Değişimi
V_K	: K ⁺ 'un Denge Potansiyeli
V_m	: Herhangi Bir Membran Potansiyeli
V_{Na⁺}	: Na ⁺ Denge Potansiyeli
VKKK	: Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları
DVA	: Düşük Voltaj Aktiviteli
YVA	: Yüksek Voltaj Aktiviteli
pS	: pico Siemens
YVAKK	: Yüksek Voltaj Aktiviteli Ca ⁺² Kanalları
DHP	: 1,4,-dihidropiridin
ω-Aga IIIA	: ω-Agatoxin IIIA
PTX	: Pertussis Toksin
TG	: Thapsigarjin
mM	: Mili Molar
μM	: Mikro Molar
nM	: Nano Molar
mV	: Mili Volt
Ba⁺²	: Baryum İyonu
BAPTA	:1,2-bis(o-aminofenoksi)etan-N,N,N',N'-tetra asetik asit – kalsiyum spesifik amino polikarboksilik asit
ω-CgTx	: ω-konotoksin GVIA

PSS	: Periferik Sinir Sistemi
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
Ach	: Asetilkolin
SKK	: Sinir-Kas Kavşağı
FTX	: Funnel Spider Toxin
ω-Aga IVA	: ω -Agatoxin IVA
ω-CgTx MVIIC	: ω -konotoksin MVIIC
IC₅₀	: Medyan İnhibisyon Konsantrasyonu
Ms	: Mili Saniye
Cd⁺²	: Kadminyum İyonu
Ni⁺²	: Nikel İyonu
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
kD	: Kilo Dalton
IASP	: Uluslararası Ağrı Araştırmaları Teşkilatı
PVN	: Paraventriküler Nükleus
SON	: Supraoptik Nükleus
LHA	: Lateral Hipotalamik Alanda
ICV	: Intracerebroventricular
TRH	: Tirotropin Salgılayıcı Hormon
CRH	: Kortikotropin Salgılayıcı Hormon
GHRH	: Büyüme Hormonu Salgılayıcı Hormon
POMC	: Pro-opiomelanocortin
NPY	: Nöropeptit Y
AgRP	: Agouti-related protein
CART	: Cocaine-and amphetamine-regulated transcript
ARC	: Arkuat Nükleus
NTS	: Nucleus of the solitary tract
PC	: Prohormone Convertase
CCK	: Kolesitokinin
LH	: Lüteinleştirici Hormon
PBS	: Tamponlanmış Fosfat Tuzu
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü

1. ÖZET

Nesfatin-1; son yıllarda keşfedilen, nükleobindin 2 (NUCB2) 'nin postranslasyonel işlenmesinden elde edilen anoreksijenik hipotalamik bir polipeptittir. Birçok çalışma nesfatin-1'in, enerji metabolizmasına ek olarak ağrı sinyalleri de dahil olmak üzere somatosensorial ve visseral transmisyonunda rol aldığını göstermektedir. Bu çalışmanın amacı; neonatal sıçanların kültüre edilmiş dorsal kök gangliyon nöronlarında (DKG) nesfatin-1 'in intrasellüler kalsiyum seviyeleri ($[Ca^{+2}]_i$) üzerine etkilerini araştırarak, periferik nöronal sinyallerin iletiminde olası rolünü keşfetmektir. Nesfatin-1'in DKG nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ üzerine etkileri in vitro kalsiyum görüntüleme sistemi kullanılarak araştırıldı. DKG nöronları; 1-2 günlük neonatal Wistar sıçanlarından alınan ganglionların enzimatik ve mekanik ayrıştırma işlemini takiben primer kültürde yetiştirildi. Bu tez çalışması ile fura-2 bazlı kalsiyum görüntüleme sistemi tekniği kullanılarak, nesfatin-1 'in $[Ca^{+2}]_i$ üzerine etkileri ve protein kinaz C (PKC) aracılı yolağının rolü incelendi. Nesfatin-1 kültüre DKG nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ 'i artırdı. Hücreler nesfatin-1 uygulaması öncesinde pertussis toksin ile muamele edildiğinde $[Ca^{+2}]_i$ meydana gelen artış ortadan kalktı. Protein kinaz C inhibitörü chelerythrine chloride, nesfatin-1 ile indüklenmiş $[Ca^{+2}]_i$ daki artışı baskılamıştır. Bu tez çalışmasının sonuçları; nesfatin-1'in kültüre edilmiş DKG nöronlarında protein kinaz C aktivasyonuna bağlı olarak, G-protein bağlantılı reseptör ile etkileştiğini ve bu sayede $[Ca^{+2}]_i$ artışına sebep olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Nesfatin; Duyusal Nöronlar; Kalsiyum Sinyalleşmesi; Protein Kinaz C; G Protein; Ağrı

2. ABSTRACT

The effect of nesfatin-1 On calcium signalling in rat Dorsal sensorial neurons

Nesfatin-1 is a recently identified anorexigenic hypothalamic polypeptide derived from the posttranslational processing of nucleobindin 2 (NUCB2). Several studies have indicated that this neuropeptide may be participated in somatosensory and visceral transmission including pain signals in addition to energy metabolism. The aim of this study was to explore the possible role of nesfatin-1 in the transmission of peripheral neural signals by investigating the effects of nesfatin-1 on intracellular free calcium levels ($[Ca^{2+}]_i$) in cultured neonatal rat dorsal root ganglion (DRG) neurones. The effects of nesfatin-1 on $[Ca^{2+}]_i$ in DRG neurons were investigated by using an in vitro calcium imaging system. DRG neurons were grown in primary culture following enzymatic and mechanical dissociation of ganglia from 1-or 2-day-old neonatal Wistar rats. Using the fura-2-based calcium imaging technique, the effects of nesfatin-1 on $[Ca^{2+}]_i$ and role of the protein kinase C (PKC)-mediated pathway in nesfatin-1 effect were assessed. Nesfatin-1 elevated $[Ca^{2+}]_i$ in cultured DRG neurons. The response was prevented by pretreating the cells with pertussis toxin. The protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride suppressed nesfatin-1-induced rise in $[Ca^{2+}]_i$. The result shows that nesfatin-1 interacts with a G protein-coupled receptor, leading to an increase of $[Ca^{2+}]_i$, which is linked to protein kinase C activation in cultured rat DRG neurons.

Key words: Nesfatin; Sensory neurons; Calcium signalling; Protein Kinase-C; G Protein; Pain

3. GİRİŞ

3.1. İyon Kanalları ve Membranın Elektriksel Özellikleri

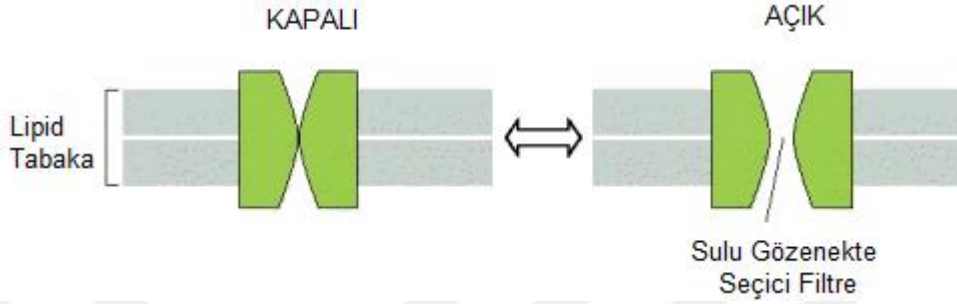
Taşıyıcı proteinlerin aksine kanal proteinleri membran boyunca hidrofilik bir yapı oluştururlar. Kanal proteinlerinin bir sınıfı; hemen hemen bütün hayvanlarda, iki komşu hücre arasında her iki hücrenin de eşit olarak katıldığı sitoplazmalarının bağlandığı gap bağlantıları adı verilen açıklıklar oluştururlar. Bakteri, mitokondri ve kloroplastların dış membranlarının kanal oluşturan proteinleri gap bağlantıları ve porinler; büyük ve seçici geçirgen porlara sahiptir.

Hayvan ve bitki hücrelerindeki sitozölü hücre dışına bağlayan plazma membranındaki kanal proteinleri çok küçük, yüksek seçici geçirgendir ve açınıp kapanabilir. Bu proteinler büyük oranda özellikle inorganik iyon taşınması ile ilgili olduğundan iyon kanalları olarak adlandırılırlar. Bu kanallar taşıma konusunda yüksek bir verimliliğe sahiptir; her saniye açık tek bir kanaldan 100 milyon iyon geçebilir. Bu bilinen herhangi bir taşıyıcı protein aracılığıyla gerçekleştirilen en hızlı taşıma işleminden yaklaşık 10^5 kat daha hızlıdır. Ancak kanallar bir enerji kaynağı ile bağlantı kurup aktif taşıma yapamadığından bu taşıma işleri her zaman pasiftir (çok yoğunundan az yoğununa doğru). Böylelikle iyon kanalları; belirli inorganik iyonların –özellikle Na^+ , K^+ , Ca^{+2} veya Cl^- lipid çift katman boyunca elektrokimyasal gradyan yönünde difüzyonuna izin verir. Bu kanallardan iyon akışını kontrol etmek birçok hücre fonksiyonu için esastır. Özellikle sinir hücreleri (nöronlar) bu iyon kanallarını; sinyallerin iletimi, sinyal alımı ve sinyalleşme gibi birçok çeşitlilikle kullanırlar (1).

3.2. İyon Kanallarının İyon Seçiciliği ve Açık-Kapalı Haller Arasındaki Değişimi

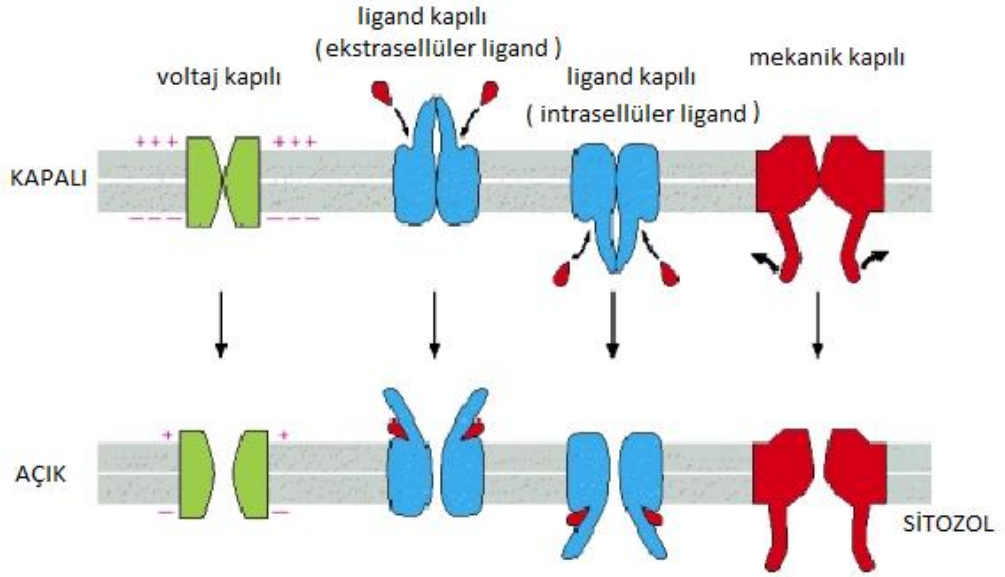
İki önemli özellik iyon kanallarını su porlarından ayırır. Birincisi; iyon kanalları bazı inorganik iyonların geçmesine izin verirken bazılarına izin vermeyen iyon seçici özellik gösterirler. Bu özellik bize bu kanalların çok dar olmasına rağmen kanal duvarları ile etkileşime geçen iyonların uygun yükte ve uygun boyutta olması gerektiğini gösterir. Genellikle tek sıra halinde geçmesine

izin verilen iyonlar kanalın geçirgenlik filtresi adı verilen en dar kısmından geçebilmek için kendilerine bağlı su moleküllerinden kurtulmalıdır. Böylelikle iyon konsantrasyonları arttıkça kanaldan geçen iyon akışı da orantılı olarak artar ancak maksimum seviyede doygunluğa ulaşır.



Şekil 3.1: Kapalı ve açık konformasyonu gösterilen tipik bir iyon kanalı

İyon kanallarını basit su porlarından ayıran ikinci önemli özellik iyon kanallarının sürekli açık olmamasıdır. Bunun yerine, kısa bir süreliğine açılan ve sonra hemen kapanan kapılara sahiptirler. Birçok durumda kapılar belirli bir uyarana cevap olarak açılırlar. İyon kanallarının açılmasını sağladığı bilinen ana uyarıcı çeşitleri; membran boyunca voltajda değişim (voltaj kapılı kanallar), mekanik bir stres (mekanik kapılı kanallar) ve bir ligandın bağlanması (ligand kapılı kanallar) dır. Bu ligand; ekstrasellüler bir mediyatör – özellikle bir nörotransmitter (transmitter kapılı kanallar)- veya bir iyon gibi (iyon kapılı kanallar) ya da bir nükleotid gibi (nükleotid kapılı kanallar) intrasellüler bir mediyatör olabilir.



Şekil 3.2: Farklı uyarıların iyon kanalları üzerine etkileri.

Birçok iyon kanalı protein fosforilasyonu ve defosforilasyonu ile regüle edilir. Buna ek olarak kimyasal veya elektriksel uzatılmış uyarı ile birçok kanal uyarı sonlanıncaya kadar refrakter periyottadır ve desensitize veya inaktive halde kapanışa geçer.

Bugüne kadar yüzden fazla iyon kanalı tanımlanmıştır ve yenileri bu listeye zaman geçtikçe eklenmektedir. İyon kanalları; kas hücrelerinde uyarılabilirlikten ve sinir sistemindeki birçok elektriksel sinyalleşme formlarını düzenlemekten sorumludurlar. Genellikle tek bir nöron, plazma membranının farklı noktalarında yer alan on veya daha fazla iyon kanalına sahiptir. Ancak iyon kanalları sadece elektriksel olarak uyarılabilen hücrelere özgü değildir. Hayvan hücrelerinin tümünde, bitki hücrelerinde ve mikroorganizmalarda da bulunmaktadır. Örneğin *mimosa pudica* bitkisindeki yaprak kapanma etkisinin yayılmasını ve *Paramecium* adı verilen tek hücreli canlının bir çarpışmadan sonra ters yöne dönmesini sağlar.

En çok bilinen türdeki iyon kanalları başlıca K^+ , Na^+ , Ca^{+2} ve Cl^- a geçirgen olan kanallardır. Aynı zamanda membran potansiyeli membranın iki tarafındaki elektrik yükünde bir fark olduğunda ortaya çıkar. Bu tür farklılıklar aktif elektrojenik pompadan ve pasif iyon difüzyonundan kaynaklanır. Mitokondrinin membran potansiyelinin çoğu mitokondri iç membranında bulunan

elektrojenik H^+ pompası tarafından üretilir. Elektrojenik pompalar ayrıca bitkilerde ve mantarlarda plazma membranı boyunca olan elektriksel potansiyelin çoğunu üretir. Ancak tipik hayvan hücrelerinde plazma membranı boyunca olan elektriksel potansiyele en büyük katkıyı pasif iyon hareketleri sağlar.

Bilindiği üzere $Na^+ - K^+$ pompası intrasellüler Na^+ konsantrasyonunu düşük tutarak hayvan hücresi membranı boyunca ozmotik dengenin korunmasını sağlar. Hücre içinde Na^+ az olduğundan ve hücrenin negatif yüklü organik molekülleri (sabit anyonlar) dışarı çıkamadığından dengenin kurulması için diğer katyonlardan bolca olmak zorundadır. Bu dengeleme rolü büyük oranda; $Na^+ - K^+$ pompası ile aktif bir şekilde hücre içine pompalandığından ve plazma membranındaki K^+ sızdıran kanallarda içeriye veya dışarıya rahatça hareket edebildiğinden K^+ tarafından gerçekleştirilir. Bu kanalların varlığı yüzünden K^+ neredeyse denge durumuna yaklaşır ve negatif yüklerin aşırılığı yüzünden oluşan elektriksel bir kuvvet K^+ 'u hücre içine çekerek K^+ 'un konsantrasyon yoğunluğuna doğru akma eğilimini dengeler. Membran potansiyeli bu elektriksel kuvvetin tezahürüdür. Denge durumu K^+ konsantrasyon gradiyentinin piki ile hesaplanabilir. Daha açıklayıcı olmak gerekirse;

Plazma membranı boyunca hiçbir voltaj gradiyenti olmadığını (membran potansiyeli = 0) ama K^+ konsantrasyonunun hücre içinde yüksek hücre dışında düşük olduğunu düşünün. K^+ konsantrasyon gradiyenti yüzünden K^+ sızdıran kanallardan hücreden çıkma eğilimi gösterecektir. K^+ dışarıya çıktıkça içeride geriye dengelenmemiş negatif yük bırakır. Dolayısıyla daha fazla K^+ 'un dışarıya akışına karşı olan elektriksel bir alan veya membran potansiyeli yaratır. Membran potansiyeli; K^+ üzerindeki elektriksel hareket kuvveti, konsantrasyon gradiyentinin etkisini dengelediği değere ulaştığında K^+ 'un net akışı durur. Bu anda K^+ 'un elektrokimyasal gradiyenti sıfırdır. Aynı zamanda Cl^- iyonları da membran boyunca denge sağlamasına rağmen, membran potansiyeli bu iyonların çoğunu yükleri negatif olduğundan hücre dışında tutar.

Denge durumu, idealleştirilmiş hücrenin dinlenim membran potansiyelini tanımlar. Basit ama önemli bir formül olan Nernst Denklemi denge durumunu

sayısal olarak betimler. Bu sayede iç ve dış iyon konsantrasyonlarının oranları bilinmesi teorik dinlenme membran potansiyelini hesaplamayı mümkün kılar.

3.3. Nernst Denklemi ve İyon Akışı

Bir membran kanal proteininden geçen herhangi bir iyonun akışına o iyonun elektrokimyasal gradiyenti sebep olur. Bu gradient; voltaj gradienti ve membran boyunca iyonun konsantrasyon gradienti olmak üzere iki etkinin kombinasyonunu temsil eder. Bu iki etki ne zaman ki birbirini dengeler, o vakit; iyonun elektrokimyasal gradienini sıfır olur ve kanaldan net iyon akışı olmaz. Bu denge durumundaki voltaj gradientine iyon için denge potansiyeli denir. Aşağıdaki Nernst denklemi adı verilen denklem ile hesaplanabilir.

Nernst Denklemi;

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{Co}{Ci}$$

V = Volt cinsinden denge potansiyeli (iç potansiyel – dış potansiyel)

Co ve Ci = İyonun dış ve iç konsantrasyonları (sırasıyla)

R = Gaz sabiti ($2 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)

T = Mutlak sıcaklık (Kelvin)

F = Faraday sabiti ($2,3 \times 10^4 \text{ cal V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

z = İyonun değeri

$\ln$ = e bazına göre logaritma

Nernst denklemi şu şekilde açıklanabilir:

Bir çözeltideki moleküller denge durumu oluşması kadar rastgele hareketlerle yüksek konsantrasyonlu bölgeden düşük konsantrasyonlu bölgeye doğru ilerler. Bunun sonucunda düşük konsantrasyona olan hareket uygun serbest enerji değişimi ($\Delta G < 0$) ile olurken yüksek konsantrasyona olan hareket uygun olmayan serbest enerji ($\Delta G > 0$) ile olur. Plazma membranı (ΔG_{kons}) boyunca her mol çözünen için olan serbest enerji değişimi $-RT \ln Co/Ci$ 'ye eşit olur. Eğer

çözünen iyon ise; hücre içi hücre dışına voltaj V göreceli bir hücre membranı boyunca hareket etmesi (her çözünen mol başına) ek bir serbest enerji değişimine ($G_{\text{volt}}=zFV$) sebep olacaktır.

Bu noktada konsantrasyon ve voltaj gradientleri dengelenecektir. $\Delta G_{\text{kons}} + \Delta G_{\text{volt}} = 0$ ve membran boyunca iyon hareketi dengeye ulaşacaktır.

$$\text{Bu sebeple } zFV - RT \ln \frac{C_o}{C_i} = 0$$

$$\text{ve } V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i} = 2,3 \frac{RT}{zF} \log_{10} \frac{C_o}{C_i}$$

Tek değerlikli bir iyon için

$$20^\circ\text{C} \text{ 'de } 2,3 \frac{RT}{F} = 58 \text{ mV ve } 37,5^\circ\text{C} \text{ 'de } 61,5 \text{ mV}$$

Bu şekilde; 37°C deki bir iyon $\frac{C_o}{C_i} = 1$ için $V=0$ iken $\frac{C_o}{C_i} = 10$ için $V=+61,5 \text{ mV}$ 'tur.

Örnek vermek gerekirse K^+ 'un denge potansiyeli (V_K) $61,5 \log_{10} ([K^+]_o/[K^+]_i)$ milivolttur. (tipik bir hücre için $[K^+]_o = 5\text{mM}$ ve $[K^+]_i = 140 \text{ mM}$ -89 mV). V_K durumunda membran boyunca net K^+ akışı yoktur. Benzer olarak membran potansiyeli, Na^+ 'un denge potansiyeli $61,5 \log_{10} ([Na^+]_o/[Na^+]_i)$ olduğunda Na^+ 'un net akışı yoktur.

Herhangi bir membran potansiyeli için V_m belli bir iyon tipini hücre dışına iten net kuvvet; V_m ile o iyon için denge potansiyeli arasındaki fark ile orantılıdır. Örneğin;

$$K^+ \text{ için } V_m - V_{K^+} \text{ dır,}$$

$$Na^+ \text{ için } V_m - V_{Na^+} \text{ dır.}$$

Yük katmanını oluşturan iyon sayısı hücre içindeki iyon sayısına göre çok küçüktür. Örneğin; $1\mu\text{m}^2$ membran boyunca 6000 Na^+ iyonun hareketi membran potansiyelini yaklaşık 100 mV kadar değiştirebilecek güce sahiptir. Tipik bir hücrede ($1\mu\text{m}^3$ hacminde sitoplazma) yaklaşık 3×10^7 Na^+ iyonu olduğundan bu tür bir yük hareketi membran boyunca olan iyon konsantrasyonu gradientleri üzerinde ihmal edilebilir bir etkiye sahip olacaktır.

3.4. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları (VKKK)

İntrasellüler kalsiyum; ikincil haberci yolları, kas kasılması, nöronlardan nörotransmitterlerin salgılanması, hücre proliferasyonu, apoptozis vs. gibi birçok farklı fizyolojik süreçte önemli bir rol oynar. Birçok enzim kofaktör olarak kalsiyuma gerek duyar. Ekstrasellüler kalsiyum ise uyarılabilen hücre membranları boyunca potansiyel fark oluşturması açısından önemlidir. (2, 3). Normal durumda hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu hücre dışındakinden daha düşüktür. Hücre içi Ca^{+2} un artırılması; ligand kapılı veya voltaj kapılı kalsiyum kanalları ile hücre dışından hücre içine Ca^{+2} girmesi ile ya da hücre içi depolardan Ca^{+2} salıverilmesi ile sağlanır (4).

3.4.1. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının Moleküler Özellikleri

Nöron, kas ve endokrin hücrelerinden alınan elektrofizyolojik kayıtlar voltaj ile aktive olan kalsiyum (Ca^{+2}) akışlarının ayırt edici özelliklerini ortaya koymaktadır. Membran potansiyeline dayanarak açılmalarına göre düşük voltaj ile aktive olan (DVA) ve yüksek voltaj ile aktive olan (YVA) olmak üzere Ca^{+2} kanalları iki ana sınıfa ayrılırlar. DVA (veya T-tip) kanallar genellikle küçük bir iletkenliğe sahiptir (8-12 pico Siemens (pS)). Dinlenim membran potansiyelindeki ufak değişiklikler ile açılırlar ve hızlıca inaktive olurlar. Bunun aksine YVA kanallar daha yüksek bir iletkenliğe sahiptir (15-25 pS). Daha güçlü depolarizasyonlar ile aktive olurlar ve değişken inaktivite kinetikleri gösterirler. Günümüze kadar; tek kanal iletkenliği, kinetik, farmakoloji ve hücresel dağıtım gibi kriterlere dayanarak birçok YVA Ca^{+2} kanal tipi kategorize edilmiştir (L-, N-, P/Q- ve R- tipi). (5-8)

3.4.2. Yüksek Voltaj İle Aktive Olan Ca^{+2} Kanalları (YVAKK)

3.4.2.1. L- Tipi Kanallar

L- tipi Ca^{+2} kanalları başlangıçta periferik nöronlar ve kardiyak hücrelerde tanımlanmıştır ama bütün uyarılabilen hücrelerde ve birçok uyarılamayan hücrelerde de bulunduğu gözlemlenmiştir (8). Bazı hücrelerde L- tipi kanallar özelleşmiş subsellüler bölgelerde lokalize olmuştur. Örneğin; nöronal L- tipi kanallar öncelikli olarak hücre gövdelerinde ve proksimal dendritlerde konsantre olmuşken (9), iskelet kaslarının kasılmasından sorumlu olan L- tipi kanallar transvers tübül membranında (10) yoğunlaşmıştır. L- tipi kanallar Ca^{+2} un kardiyak, iskelet ve düz kaslara girmek için kullandığı primer yoldur (5). İskelet kası L- tipi kanalları; membran depolarizasyonunu intrasellüler depolardan Ca^{+2} salınımı ile birleştirerek iskelet kaslarındaki kasılma gevşeme için voltaj sensörü olarak davranır. Bu kanaldan Ca^{+2} girişi iskelet kasının kasılmasının başlaması için gerekli olmasa da iç depoların tekrar doldurulması için bir Ca^{+2} kaynağı oluşturabilir (6,8,11,12). L- tipi kanalların endokrin hücrelerden ve bazı nöronlardan ekzositotik salgılarda görev aldığına dair kanıtlar mevcuttur (13-17). Hücre soması (9) üzerindeki L- tipi kanalların lokalizasyonu bu kanalların gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol aldığını göstermektedir (18-20).

L- tipi kanalların farmakolojik özellikleri hakkında birçok şey bilinmektedir. Organik L- tipi kanal blokörlerinin üç ana sınıfı fenilalkilaminler (verapamil), benzothiazepinler ve 1,4,-dihidropiridinler (DHPler) (örneğin nitrendipin, nifedipin, nimodipin) dir. DHP antagonistleri, depolarizasyon durumunda aktif konformasyondaki kanallara bağlanırlar (depolarize potansiyellerde daha potent inhibisyon meydana getirirler). Birçok DHP antagonisti geliştirilmiştir. (-)-Bay K 8644, açılma zamanını ve tek kanal iletkenliğini yükselttiği için en çok değerlendirilen üründür. L- tipi kanalları ayrıca, huni yuvalı örümcek *Agelenopsis aperta* 'nın zehrinden izole edilmiş ω -agatoxin IIIA (ω -Aga IIIA) gibi bazı doğal peptit toksinleri tarafından da bloke edilirler (20-21). ω -Aga IIIA, DHP lerin aksine zaman akışını etkilemeden akım amplitüdünü düşürür. ω -Aga IIIA inhibisyonu voltajdan bağımsızdır ve L- tipi kanalları bütün potansiyellerde bloke eder (6).

Baryum (Ba^{+2}) iyonu taşınacak yük olarak kullanıldığında (110 nM) L- tipi kanalların 20 pS ‘den 27 pS ‘e kadar değişen iletkenliği vardır. Bu kanallar genellikle pozitif değerlerden -10 mV a kadar olan potansiyellerde açılmaya başlar. Ancak kromaffin hücrelerinde, duyu nöronlarında ve kardiyak hücrelerde çok daha negatif potansiyellerde aktive olabilmektedir. Taşınacak yük Ba^{+2} olduğunda L tipi kanallar bir kere açıldığında, özellikle depolarizasyon sırasında yüzlerce milisaniye boyunca inaktive olmaz (4,5,21). Ba^{+2} akışları ile karşılaştırıldığında taşınacak yük Ca^{+2} iken L- tipi akımları daha küçüktür ve hızlıca inaktive olurlar. Bu Ca^{+2} bağımlı inaktivasyonun birkaç karakteristik özelliği vardır. İçeriye akan Ca^{+2} ‘a dayandırılabilen inaktivasyon; kanaldan geçen Ca^{+2} ‘un maksimum olduğu depolarizasyon sırasında en yüksek halindedir (22). BAPTA (1,2-bis(o-aminofenoksi)etan-N,N,N',N'-tetra asetik asit – kalsiyum spesifik amino polikarboksilik asit) ve diğer Ca^{+2} şelatörlerinin eklenmesiyle inaktivasyon yavaşlasa da tam olarak ortadan kalkmaz. Ancak Ca^{+2} bağımlı inaktivasyon tripsinin intrasellüler uygulanması ile elimine olur. Bu da kanalı inaktive etmek için hareket eden Ca^{+2} ‘un; kanalın parçası olması gerektiğini ya da kanala yakın olması gerektiğini gösterir (4,5,23,24). Ca^{+2} bağımlı inaktivasyon seviyesi kanal yoğunluğu ile değişmediğinden; Neely ve arkadaşları (1994) (24) “yerel etki alanı” hipotezini sunmuşlardır. Bu hipotezde Ca^{+2} ‘un sadece girdiği kanalı etkilediği savunulmaktadır. Dahası, günümüz modelleri; kalmodulinin (kalsiyum bağlayıcı bir haberci protein) esas olarak C-terminus (bir amino asit zincirinin karboksil sonu) ‘a bağlı olarak Ca^{+2} algılama bölgesinin bir parçasını oluşturduğunu düşünmektedir. Nihayetinde Ca^{+2} bağımlı inaktivasyonun sinyal transdüksiyonuna kılavuzluk etmektedir (25).

3.4.2.2. N- Tipi Kanallar

Civciv dorsal kök gangliyonundan (DKG) alınan kayıtlar; L- tipi (25pS) ve T- tipi (8pS) Ca^{+2} kanallarına ek olarak 13 pS (110 mM Ba^{+2}) iletkenliğinde üçüncü bir tip Ca^{+2} kanalı ortaya çıkarmıştır (3,4,21,26,27). Bu iletkenlik; hem T- hem de L- tipi kanallarla bazı genel elektrofizyolojik karakteristikleri paylaşırsa da her iki gruba da dahil edilemedi. Sonuç olarak bu kanal N (neither)- tipi olarak adlandırıldı.

N- tipi kanallar ilk olarak civciv DKG nöronlarında tanımlansa da ayrıca; memeli DKG hücrelerinde (28-31), memeli ve amfibi sempatik nöronlarında (32-35) ve periferik ve merkezi sinir sistemlerinin diğer hücrelerinde de saptanmıştır (36-41). N- tipi kanallar sadece nöronal dokuda eksprese ediliyor (33,42) gibi görünse de sıçan tiroid C- hücre dizininde bir N- tipi bildirilmiştir (43). Elektrofizyolojik olarak N- tipi kanallar inaktivasyon özellikleri bakımından rahatlıkla L-tipi kanallardan ayrılabilir. L- tipi kanalları aksine N- tipi kanallar zaman bağımlı inaktivasyon gösterirler (charge carrier olarak Ba^{+2}). N- tipi akıntılar; bir zaman sabiti (τ) ile 50-100 ms arasında bozulurlar. DVA T- tipi kanalların hızlı inaktivasyonundan ($\tau = 20-50$ ms) önemli ölçüde yavaştır. Ayrıca inaktive olmayan L- tipi kanallardan daha hızlıdır. Civciv DKG nöronlarında N- tipi akım 140 ms test depolarizasyonunda neredeyse tamamen bozulmuşken aynı sürede L- tipi akım küçük bir inaktivasyon göstermektedir (3). Ancak N- tipi akımlar her zaman hızlıca inaktive olmazlar. Sempatetik nöronlarda N- tipi akımların bozulma oranı çok daha yavaştır ($\tau = 500 - 800$ ms) ve bir saniyeden daha fazla süren depolarizasyonlarda bile tamamlanamayabilir (4,43,44). Böylelikle N-tipi akım inaktivasyonunda en az iki farklı bileşen olduğu görülmektedir. İnaktivasyon kinetiklerindeki bu farklılıklar N-tipi kanalların farklı alt birimleri olduğunu göstermektedir. Tek bir N- tipi kanal; yavaş ve hızlı inaktivasyon durumları arasında değişerek her iki akımı da destekleyebilir (42,45).

Zaman bağımlı parametresine ek olarak N- tipi kanal inaktivasyonunun voltaj bağımlı yönü de vardır (3,26,27,31). Hücre membranı potansiyellerini -60 ve -40 mV arasında tutmak N-tipi akımının kayda değer inaktivasyonu ile sonuçlanır ve kanalları tekrar başlatmak için fazlasıyla negatif potansiyeller gerekir. N- tipi kanallar potansiyeli inaktivasyonda tutmanın etkilerine L- tipi kanallara göre daha hassastır. -20 mV dinlenim membran potansiyellerinde L- tipi kanallar açılmaya müsait durumda iken N-tipi kanallar tamamen inaktive olurlar.

Teorik olarak N- ve L- tipi kanallarının farklı inaktivasyon özellikleri; iki kanal tipinin bütün hücre YVA akımına katkı oranlarının incelenmesi için iki parametre sağlamaktadır (4,26). İlk yaklaşım inaktivasyon hızlarının farklı olmasını kullanır. Uzamış bir depolarizasyon sırasında bütün hücre akımı inaktive

olan N- tipi kanallar ile açıklanabilir. Bu sırada inaktive olmayan kısım L- tipi akım olarak tanımlanabilir. İkinci yaklaşım voltaj bağımlı inaktivasyonu ele alır. Her iki tipin bütün hücre akımına katkısı, -40 ve -90 mV dinlenim potansiyellerinden depolarizasyonlar ile elde edilmiş bütün hücre akımı farklılıklarının analizi ile belirlenebilir. Çünkü L- tipi kanallar; potansiyeli inaktivasyonda tutmanın etkilerine daha dirençlidir. N- tipi kanallar depolarize membran potansiyellerinde inaktive olurlar. Bu iki koşuldaki farklılıklar N- tipi kanalların tüm hücre akımına katkısını gösterir. Ancak her iki yaklaşım da bu akımları düzgünce ayırt etmekte yeterli olmayabilir. Ayrıca N- tipi kanalların voltaj bağımlı inaktivasyonu yüksek derecede değişken olabilir (26,27). Eğer tüm hücre N- tipi kanallardan oluşsa idi tamamıyla inaktive olmamış N- tipi kanallardaki rezidüel akım önemli olabilirdi. Bu yüzden sadece bu kriterlere dayanmış N- ve L- tipi akım tanımlamaları geçerli değildir.

Farmakolojik olarak N- tipi kanallar; *Conus* türündeki yırtıcı deniz salyangozlarının zehrinde bulunan (13-29 amino asit) doğal bir peptit toksini sınıfı olan ω -konotoksinler ile inhibe olurlar (46,47). Bütün bilinen ω -konotoksinler N- tipi Ca^{+2} kanallarını inhibe ederler. Ancak bloke etme değerleri ile özellikleri değişkenlik gösterir. Günümüzde; *Conus geographus* tan elde edilen 27 amino asitlik ω -konotoksin GVIA (ω -CgTx) N-tipi kanal inhibisyonunda en spesifik ω -konotoksin peptididir. ω -CgTx; yaklaşık olarak 100 nM – 1 μ M konsantrasyonlarında DKG, hipokampal, sempatetik ve duyu nöronlarındaki N- tipi akımların tam ve geri döndürülemeyen inhibisyonuna neden olur (48-50). Daha yüksek konsantrasyonlarda (5-15 μ M) ω -CgTx ayrıca L- ve T- tipi akımları da inhibe eder ancak N- tipi kanalların aksine etkiler tamamlanmamış ve geri döndürülebilir (48-53).

ω -CgTx bağlanma bölgeleri (dolaylı olarak N- tipi Ca^{+2} kanalları da) korteks, hipokampus, olfaktör soğan ve serebellar korteksi de içeren PSS ve MSS boyunca dağılmıştır. Ve özellikle yüksek sinaptik yoğunluk bölgelerinde konsantre olmuştur (4,54-59). N-tipi kanalları ilk olarak DKG nöronlarının hücre gövdelerinde tek kanal kayıtlarında tanımlanmış olsa da (3) dentritlerde ve akson uçlarında lokalize olmuşlardır. Kaslarda ω -CgTx bağlanması postsinaptik asetilkolin (Ach) reseptörleri ile aynı uzaysal düzeyde presinaptik hücrelerin aktif

bölgelerinde olmaktadır. N- tipi kanallar ayrıca hipokampal CA1 nöronlarında sinaptik temas olan bölgelerde bir araya gelmiş bir şekilde gözlenmiştir (55).

Presinaptik membranda N- tipi kanalların varlığı; bu kanallardan Ca^{+2} içeriye girişinin nörotransmitter salınımını tetiklenmesinden sorumlu olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada (60) ω -CgTx 'nın kurbağa SKK'ından (sinir kas kavşağı) elektriksel indüklü salınımı bloke ettiği bulunmuştur. Ayrıca yapılan birçok çalışma ω -CgTx uygulamasının merkezi ve periferik sinir sisteminde nörotransmitter salınımını inhibe ettiğini ortaya koymuştur (61-68). Biyokimyasal çalışmalar N- tipi kanalların; ekzositotik düzeneğin bir parçası olan sinaptotagmin ve sintaksin gibi proteinler ile fiziksel olarak etkileştiğini göstermektedir (69-71). N- tipi kanallarla düzenlenen nörotransmisyonunda türlere ve hücrelere göre farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin; ω -CgTx kuşlarda ve amfibilerdeki NMJ da nörotransmisyonu tamamıyla yıkıma uğratsa da memeli motor sinir sistemi üzerinde hiçbir etkisi yoktur (60,66,72-74). Ayrıca bu toksinin nörotransmisyonu inhibe etmesi yeteneği verilen türlerdeki sinaps tiplerine göre de değişiklik göstermektedir (53,66-68). Örneğin; hipokampal CA1 nöronlarındaki inhibitör sinaptik transmisyon ω -CgTx uygulanması ile güçlü bir şekilde düşerken, eksitator transmisyonları daha az bir şekilde bloke eder. Ek olarak ω -CgTx sıçanlarda hem otonom hem de merkezi nöronlardan Ach salınımını inhibe eder (merkezi nöronlardan salınımı yaklaşık 20 kat daha az hassastır) (66). ω -CgTx uygulanması ile ortaya çıkan N- tipi kanalların tam ve geri döndürülemeyen inhibisyonu sadece nörotransmitter salınımının bir parçasını engellemektedir. Bu da hem merkezi hem periferik nöronlardan nörotransmitter salınımına diğer Ca^{+2} kanal tiplerinin de katkısı olduğunu göstermektedir (59,75,76). Periferik nöronlardan transmitter salınımının düzenlenmesi büyük oranda N- tipi kanalları içerse de; merkezi sinir sistemindeki salınım, hem ω -CgTx 'den hem de DHP lerden etkilenmeyen diğer Ca^{+2} kanallarının kontrolündedir (77,78). Sinapslar dışındaki bölgelerdeki N- tipi kanalların varlığı bu kanalların nörotransmitter salınımına ek olarak başka fonksiyonlarının da olduğunu göstermektedir. Dentrit dallarında lokalize olmuş N- tipi kanallar; bu kanalların nöral inputların tamamlanmasında veya yükseltilmesinde görev aldıklarını gösteriyor olabilir (57). Postmitotik serebellar granül hücrelerinde

bulunan N- tipi kanallar, sinir sistemi gelişiminde bir rollerinin olduğunu gösteriyor olabilir. Bu hücreler sadece N-tipi kanalların varlığından sonra göçlerine başlarlar ve ω -CgTx bu göçün kesilmesine sebep olur (79).

3.4.2.3. Diğer YVA Kalsiyum Kanalları: P-, Q- ve R- Tipleri

Kalsiyum kanallarının orijinal sınıflandırma sistemi bütün Ca^{+2} iletkenliği çeşitlerini tanımlamada yetersiz kalmaktadır. L- ve N- tipi kanalları hedef alan bloklama ajanlarının varlığı; bu sisteme göre açıklanamayan diğer YVA akımlarını ortaya çıkarmıştır (38,39,47,80-82). Bu yeni kanal tipleri, elektrofizyolojik karakteristikleri yerine ayırt edici farmakolojik özelliklerine göre P, Q ve R- olarak adlandırılmıştır.

P- tipi akım; genellikle L- ve N- tipi kanalları inhibe eden ajanlara karşı duyarsız olan Purkinje hücrelerinde bir YVA akımı olarak tanımlanmıştır (83). Bu kanallar serebellar Purkinje hücrelerinin dentritlerindeki Ca^{+2} bağımlı aksiyon potansiyellerini desteklemektedir. DHP ler ve ω -CgTx 'den etkilenmezler ama huni yuvalı örümcek türü olan *Agelenopsis aperta* 'nın zehrinin bileşenleri ile güçlü bir şekilde bloke olurlar (83-86).

Purkinje hücrelerinden elde edilen tüm hücre kayıtları; bir YVA akımının -30 ve -20 mV voltajlarda zirveye ulaştığını ve depolarizasyon boyunca yavaşça inaktive olduğunu göstermektedir (39,53,82,87). P- tipi kanallarının tek kanal analizi N- ve L- tipi kanallarına benzer iletkenlik aralığına sahiptir. P- tipi kanallar için Purkinje hücre somaları ve dendritlerinde 110 mM Ba^{+} 'da çoklu iletkenlik seviyeleri 9, 14, 19 pS olarak bulunmuştur (88). Hipoglossal (dil altı) motor nöronlarındaki P- tipi akımın iletkenliği 20 pS dir (41).

Huni yuvalı örümceğin zehri, koni salyangozundaki gibi; sinaptik düzenin farklı ögelerini hedef alan bir toksin kokteylidir. Başlangıçta; bu zehrin (arjinin poliamin ve FTX, sFTX'in sentetik analogu) peptit olmayan bileşeni FTX'in spesifik olarak P- tipi kanalları bloke ettiği belirtilmiştir (5,83,84). Ancak daha sonradan P- tipi blokenin yanında diğer Ca^{+2} akımlarının inhibisyonuna da yol açtığı gösterilmiştir (5,47).

A. aperta 'nın zehrinde bulunan başka bir toksin ω -Aga IVA, 48 amino asitli bir peptit olup P- tipi Ca^{+2} kanallarını güçlü bir şekilde inhibe eder (53,85,87). Purkinje hücrelerinde komple inhibisyon 200 nM 'ın altındaki

konsantrasyonlarda, yarım maksimal bloke ise 2-10 nM konsantrasyonlarda gözlenir. İnhibisyon hızlıdır, uygulamanın iki dakikası içerisinde meydana gelir ve yıkama ile başarısız bir şekilde geri dönüşüm olurken yüksek depolarizasyon serileri ile geri döndürülebilir (+70 mV). Diğer nöronlarda P- tipi akımların ω -Aga IVA ile blokesi Purkinje hücrelerindeki neredeyse benzerdir ancak kinetikler kısmen değişiklik gösterebilir. Örneğin; omurilik internöronları ve görsel korteksteki nöronlarda P- tipi akımların inhibisyonu Purkinje hücrelerindeki gibi hızla gerçekleşse de; blokenin hızı CA1 ve CA3 hipokampal nöronlardakinden birkaç kat daha yavaştır (87).

Conus magus koni salyangozundan izole edilen peptit bir toksinin de P- tipi kanalları inhibe ettiği gösterilmiştir (89). Bu toksin (ω -CgTx MVIIC), P- tipi kanalları 1-10 μ M IC₅₀ (yarım maksimal inhibitör konsantrasyonu) ile bloke eder. Ayrıca ω -CgTx MVIIC N-, Q- ve O- tipi akımları da inhibe eder (89).

P- tipi kanallar nöronlarda DHP ve ω -CgTx ' e dayanıklı akım olarak kabul edilmezler. Çünkü nöronlara DHPler, ω -CgTx ve ω -Aga IVA doygün konsantrasyonlarda bile uygulansa azımsanamayacak miktarda akım etkilenmeden kalır. Sıçan serebellar granül kültüre hücreleri L-, N- ve P- tipi kanalları bloke eden konsantrasyonlarda bu inhibitörlerden etkilenmeyen bir YVA akımı gösterirler (47,90,91). Bununla birlikte bu yeni akımı (Q- tipi olarak adlandırılır) destekleyen kanallar P- tipi inhibisyon için gerekenden 10-100 kat daha fazla konsantrasyonlarda ω -Aga IVA ile kısmen bloke olurlar. ω -CgTx MVIIC (IC₅₀= 30 - 300 nM) ile tamamen bloke olurlar. Bu toksinlere olan duyarlılığa ek olarak Q- tipi kanallar toksin yıkanmasından dakikalar sonra ω -Aga IVA indüklü inhibisyondan kısmen geri dönerler. Ayrıca Q- tipi kanallar P- tipi kanallardan daha farklı elektrofizyolojik özellikler gösterirler. P- tipi akımlar Purkinje hücrelerinde ve serebellar granül hücrelerinde 100 ms test depolarizasyonunda inaktivasyon göstermezler. Ancak granül hücrelerindeki Q- tipi akımlar aynı süre içerisinde pik akımın yaklaşık % 65 'i kadar bozulurlar.

O- tipi kanallar, ω -CgTx MVIIC bağlantı bölgelerine yüksek afinite göstermektedirler (92). Bu kanallar diğer ω -CgTx MVIIC 'a duyarlı kanallara göre toksine daha duyarlıdır (47). P-, Q- ve O- tipi kanalların; α_1 alt ünitesi geninin alternatif ayrılması ve/veya yedek alt ünitelerin farklı tümleyenleri

sonucunda kısmen farklı farmakolojik ve elektrofizyolojik özellikler gösteren aynı kanal ailesine mensup olması olasıdır. O- tipi kanallar immünohistokimyasal olarak keşfedilmemiş olsa da, bağlanma çalışmalarından elde edilen veriler memeli MSS'inde geniş bir şekilde dağıldığını göstermektedir (47).

Birçok çalışma P-, Q- ve O- tipi kanalların nörotransmitter salınımında görev aldığını iddia etmektedir (47). N- tipi kanallar memeli MSS'indeki bazı sinapslarda salınımı düzenlese de, ω -Aga IVA duyarlı P- ve Q- tipi kanallar daha önemli bir rol oynarlar (53,93). ω -Aga IVA, sinaptozomlara Ca^{+2} girişini güçlü bir şekilde bloke eder ve sinaptozomlardan dopamin ve glutamat salınımını kısmen inhibe eder (94,95). Periferel sinir sisteminde ω -Aga IVA 'nin, otonom sinir sistemi üzerine küçük bir etkisi vardır veya hiç etkisi yoktur (96). Ancak P- tipi kanallar büyük ihtimalle memeli sinir-kas kavşağında nörotransmitter salınımından sorumludur (97,98). ω -Aga IVA, P- ve Q- tipi kanalların her ikisini de bloke ettiğinden bu iki kanal tipinin de nörotransmisyon ile ilgili olduğu söylenebilir. Son olarak; O- tipi kanallar da bazı sinapslarda nörotransmisyonu düzenlemektedir (47).

3.4.2.4. R- Tipi Kanallar

Serebellar granül hücrelerindeki YVA akımının bir parçası nimodipin, ω -CgTx , ω -Aga VIA ve ω -CgTx MVIIC uygulamalarından sonra bile değişmeden kalmaktadır. Bu akım bu tür hücrelerdeki YVA akımlarının yaklaşık olarak %15'ini oluşturur ve R (residual veya resistant)- tipi kanal olarak adlandırılır (90). R- tipi akım tek bir kanal tipinden ziyade, benzer farmakolojik ve elektrokimyasal karakteristiklere sahip moleküler olarak bağımsız kanal ailesini betimler.

R- tipi akımlar -40 mV civarlarında aktive olur ve 0mV 'ta pik yaparlar. Akım hızlı bir şekilde inaktive olur ve yük taşıyıcı olarak Ca^{+2} ile inaktive hızının artması bize; R- tipi akımları destekleyen kanalların kalsiyum bağımlı olduğunu gösterir. R- tipi kanallar Cd^{+2} ve Ni^{+2} iyonları tarafından bloke edilmeye eşit derecede duyarlıdır. Bu akımı destekleyen kanalların gerçek doğası henüz bilinmemektedir.

3.5. Kalsiyum Kanallarının Alt Birimleri

Fizyolojik, farmakolojik ve moleküler biyoloji çalışmaları VKKK'nın çeşitli alt tiplerinin olduğunu ortaya koymuştur. Nöronal VKKK moleküler olarak; heteromerik komplekse sahip 3 veya 4 alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar; α_1 , $\alpha_{2\delta}$, β ve muhtemelen γ alt birimleridir. (99)

3.5.1. α_1 Alt Birimi

Nöronal α_1 alt biriminin moleküler kopyalama ile kodlandığında 10 alt tipi belirlenmiştir. En yeni isimlendirilmiş hali; α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1E} , α_{1F} , α_{1G} , α_{1H} , ve α_{1I} dir. Onuncu gen ise sadece iskelet kasından eksprese olan α_{1S} dir. α_1 alt birimi büyük bir transmembran proteindir. Molekül ağırlığı yaklaşık 190-250 kD civarındadır (99). Voltaj saptama özelliği ve Ca^{+2} 'a geçirgen porlarıyla kalsiyum akışının kontrolünü yapar (100). Ayrıca bu alt birim kritik voltaj duyarlılığına da sahiptir. Bu da çoğu farmakolojik ajan için, membran depolarizasyonu ile aktivasyonu mümkün kılar. Yapısal olarak tekrarlayan 4 tane iç bileşenden oluşurlar. Birinci bileşen kanal aktivasyon kinetiklerinden sorumludur. Her bileşen 6 tane α -heliks yapısında transmembran bölge içerir. Bunlardan S4 bölgesi pozitif yüklüdür ve kanalın voltaj sensörünün bir bölümünü oluşturur. S5 ve S6 arasındaki iki ilave bileşen kanalın por bölgesini oluşturur. Verapamil ve nifedipin, III numaralı bileşenin 5 ve 6. helikal bölgelerine ve dördüncü bileşenin 6 numaralı sarmalından sonraki dizeye bağlanır. Bu alt birime bağlanan ilaçlar: dihidropiridinler, verapamil ve benzothiazepinler (101).

Vücuttaki bir çok organda, farklı alt tipleri görülebilir. Tablo 1'de nöronal VKKK'nın α_1 alt birimine göre sınıflandırması ve bulunduğu bölgeler görülmektedir.

3.5.2. $\alpha_{2\delta}$ Alt Birimi

α_1 alt tipinden küçük bir transmembran proteindir. Ekstrasellülerdir ve yüksek oranda glikolize haldedir. YVAKK'nın yüzeyden ekspresyonunda önemli rol oynar. $\alpha_{2\delta}$ alt tipi VKKK fonksiyonel özelliklerini etkileyebilir. Bu nedenle VKKK'nın biyofiziksel ve farmakolojik özelliklerinin belirlenmesine katkıda bulunur (102). $\alpha_{2\delta}$ alt birimi birbirlerine disülfid bağlarıyla bağlanmış iki birim

içerir (α_2 ve δ) (103,104). α_2 ve δ alt birimleri tek bir genden üretilir. Molekül ağırlığı 143 kD olan α_2 ve 27 kD olan δ alt birimleri ancak proteolitik olarak ayrılabilir (105).

$\alpha_2\delta$ alt biriminin 4 alt tipi bulunmaktadır; $\alpha_2\delta$ -1, $\alpha_2\delta$ -2, $\alpha_2\delta$ -3 ve $\alpha_2\delta$ -4. Ancak sadece $\alpha_2\delta$ -1 alt tipi doğal nöronal VKKK ile biyokimyasal olarak ilişkilendirilmiştir (105). Ca^{+2} akımının genliğini artırarak düzenleyici etki yapan bu alt birim epilepside önemli rol oynar. $\alpha_2\delta$ alt biriminin geometrik yeri mutasyona uğratılmış farelerde epilepsi ve ataksi fenotipi bulunmaktadır (106, 107). Hatta etkili bir antiepileptik ilaç olan gabapentin; bu alt birime seçici bağlanarak etki göstermektedir (108). Normal farelerde; serebellumu da içeren beyin bir çok bölgesinden eksprese olan $\alpha_2\delta$ alt birimi ayrıca iskelet kası, kalp, beyin ve ileumda bulunur (109).

3.5.3. β Alt Birimi

Küçük hidrofilik bir proteindir. α_1 alt birimi ile birlikte intrasellüler sıvıda sitoplazmik olarak bulunur. Bu alt birimlerde cAMP bağımlı protein kinaz fosforilasyon bölgeleri bulunur ve Ca^{+2} akışını, voltaj bağımlılığını, aktivasyon ve inaktivasyon durumlarını düzenler. Dolayısıyla bu alt birimler de kanal işlevinde düzenleyici bir rol oynar (110,111). Molekül ağırlığı 52-78 kD olan bu alt birimin 4 alt tipi bilinmektedir (β_{1-4}). Bu alt tiplerin her biri farklı α alt birimleri ile ilişkilidir. ($\beta_1 \rightarrow \alpha_{1S}$; $\beta_{1B} \rightarrow \alpha_{1B}$, α_{1E} ; $\beta_4 \rightarrow \alpha_{1A}$). α_1 alt biriminin biyofiziksel özelliklerini ve yüzeyden salınımını kontrol ederler (112,113). β_1 : İskelet kası, beyin kalp, dalak; β_2 : beyin, kalp, akciğer, aorta; β_3 : bir çok dokuda; β_4 : beyin ve böbrekte bulunur (112).

β_1 alt birimi olmayan mutant farelerde yapılan çalışmalarda bu farelerin doğum sonrasında kısa bir süre içinde öldükleri gözlenmiştir (114). Bunun nedeni, β_1 alt biriminin normal iskelet kası gelişimi için gerekli olmasıdır. Ancak β_2 alt tipi olmayan farelerde bu durum henüz rapor edilmemiştir (115). β_3 alt tipi olmayan farelerde küçük davranış değişikliği ve ağrı duyarlılığında değişiklik belirlenmiştir. Ayrıca β_4 alt birimi mutasyona uğramış farelerde; mutasyon ile epilepsi arasında ilişki olduğu gözlenmiştir (116,117).

3.5.4. γ Alt Birimi

Yıllardan beri nöronal VKKK'nın sadece 3 alt biriminin olduğu bilinmekteydi. Moleküler ve genetik çalışmalardaki ilerlemeler sayesinde dördüncü alt birim olan γ alt birimi keşfedildi (118). γ alt birimi; membranı geçen bir yapıdadır ve sitoplazmik bileşeni yoktur. Molekül ağırlığı 36 kD kadardır. Yapılan çalışmalar γ alt biriminin 8 alt tipinin olduğunu ortaya koymuştur ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \gamma_5, \gamma_6, \gamma_7$ ve γ_8). (119,120). Farklı alt birimleri; beyinde, iskelet kasında, kalpte, karaciğerde, akciğerde ve testiste bulunmaktadır (120). Ca^{+2} akımının pik değeri ile aktivasyon seviyesinde az bir artış yaparak kararlı durum inaktivasyon eğrisini daha fazla hiperpolarize eder, böylece kanal işlevlerini düzenleme görevi yapar (121).

Tablo 3.1: Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanal Alt Üniteleri (Kaynak 122 ‘den değiştirilerek alınmıştır).

Doğal Kanal Tipi	Sınıflandırma	Aktivasyon Özelliği	Farmakolojik Alan	Lokalizasyon Karakteristikleri
P/Q	α_{1A} , (Ca _v 2.1)	YVA	ω -Aga IVA (P-tipi), ω -MVIIC (Q-tipi); DHP lere duyarsızlık	MSS, kalp, hipofiz, bazı hücre gövdeleri, birçok dentritler ve presinaptik uçlar
N	α_{1B} (Ca _v 2.2)	YVA	ω -CgTx GVIA, DHP lere duyarsızlık	MSS, hücre gövdelerinin altkümeleri, dentritler ve presinaptik uçlar
L	α_{1C} (Ca _v 1.2) α_{1D} (Ca _v 1.3) α_{1F} (Ca _v 1.4) α_{1S} (Ca _v 1.1)	YVA	ω -CgTx (geri dönüşümlü; α_{1D}),DHPler benzothiazepinler, fenilalkilaminler	α_{1C} :MSS, düz kas ve kalp kası; α_{1D} : MSS, endokrin hücreleri α_{1F} : iskelet kası; (α_{1C}, α_{1C}) hücre gövdeleri ve proksimal dentritler
R	α_{1E} (Ca _v 2.3)	YVA	Ni ⁺² ; DHP lere duyarsızlık, ω -CgTx, ve w-Aga-IVA	MSS, hücre gövdeleri, bazı distal dentritler ve presinaptik uçlar
T	α_{1G} (Ca _v 3.1) α_{1H} (Ca _v 3.2) α_{1I} (Ca _v 3.3)	DVA	mibefradil, amilorid	MSS, kalp, plasenta, akciğer ve böbrek

3.6. Ağrı Duyusu

Ağrı, uluslararası ağrı araştırmaları teşkilatına (International Association for the Study of Pain=IASP) göre “vücudun bir bölgesinden kaynaklanan; doku harabiyetine bağlı veya başka bir nedenle ortaya çıkan, insanın geçmişteki deneyimleriyle de ilgili, hoş olmayan emosyonel ve sensoryal bir duygudur”. İnsan yaşantısında sıklıkla karşılaşılabildiği hoş olmayan bu duyu ilave olarak doku hasarının gerçekleşmesine karşı koruyucu rol oynar. Bu sayede “fonksiyonel ve canlı kalma” amaçlarında homeostazise yardımcı olur. Ağrının algılanmasını, pek çok faktör etkilemektedir. Bunlar; kişinin deneyimleri, eğitimi, ruhsal olarak içinde bulunduğu durumu, çevresel faktörleri sayılabilir. Bu nedenle ağrılı bir uyarana karşı kişilerin verdikleri cevap birbirinden farklı olabilir. Keza pek çok hasta herhangi bir harabiyet veya fizyopatolojik değişiklik olmadan da ağrı duyduğunu belirtebilir. Bu nedenle bu duyuyu doku harabiyeti ile ortaya çıkan duygudan ayırt etmek çok zordur. Bu sebeple bu tür ağrı duyusunu hemen psikojenik kökenli ağrılar olarak tanımlamak doğru bir yaklaşım değildir. Ağrının önemli bir özelliği duyusal, yani sinir lifleri ile taşınan objektif bir olgu olması, diğer bir özelliği ise emosyonel, yani yukarıda sözü edilen diğer tüm öğelerden etkilenmesidir. Ağrının tüm bu özellikleri, diğer birçok semptomdan farklı hale, yani sübjektif bir olgu şekline getirir (123).

Doku hasarı, beyine ağrı sinyallerinin gitmesini sağlayan sinyalleri başlatan kimyasalların salıverilmesine yol çar. Bu sinyaller, nosiseptörler olarak adlandırılan ve medulla spinaliste dorsal boynuz nöronları ile sinaps yapan, ince, az miyelinli (A-delta) ve miyelinsiz (C) grubu liflerle elektriksel formda taşınırlar. Noksius (hoş olmayan, kötü) uyarılar, hücre gövdeleri dorsal kök gangliyonu (DKG), trigeminal gangliyon ve nodoz gangliyonda yer alan primer duyusal afferentlerle medulla spinalis aracılığı ile üst merkezlere iletilirler.

İnsanların ağrıya karşı gösterdikleri reaksiyon dereceleri çok değişiktir. Bu değişik davranışlar kısmen beynin kendisinin, analjezi sistemi denilen bir ağrı kontrol sistemini kontrol ederek, sinir sistemine giren ağrı sinyallerini bastırabilmesine bağlıdır. Periferik ağrı lifleri ile omurilikteki arka boynuz hücreleri arasındaki kavşak bağlantıları, oldukça önemli plastisite bölgeleridir. Bu nedenle arka boynuz, ağrı dürtülerinin “kapılandığı”, yani ağrı duyusunun

şiddetinin denetlendiği değişikliğe uğradığı yer anlamında olmak üzere, kapı olarak adlandırılır. Ağrının başlatıldığı bir alandan gelen geniş çaplı afferent liflerin uyarılması ile o bölgeden gelen ağrı hafifler.

3.6.1. Hücresel Ağrı Modelleri

Ağrının hücresel ve moleküler mekanizmasının anlaşılması çalışmalarında duyuşal nöronların primer ve kalıcı kültürleri kullanılmaktadır (124). Neonatal ve embriyonik sıçanlardan izole edilen duyuşal nöronların primer kültürleri ağrı çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (125,126). Bu tez çalışmasında da kullanılan DKG'nin primer hücre kültürü, farklı hayvan türlerinden elde edilebilir. Kültüre edilmiş trigeminal ve DKG duyuşal nöronları ile yapılan çalışmalar, bu nöronların *in vivo* duyuşal nöronlarla benzer özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur. Şöyle ki; duyuşal nöronlarla yapılan hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda kapsaisin, bradikinin, P maddesi ve prostoglandine verilen cevapların benzerlik gösterdiği görülmektedir (127-129). Duyuşal nöronların primer kültürü bu nöronların doğuştan kazanılan bir çok özelliğini yansıtmaktadır. Ancak izolasyon prosedürü, hücre sayısının sınırlı olması ve primer kültürün heterojen yapıya sahip olması gibi primer hücre kültürüyle çalışmanın da birçok zorluğu vardır. Bu nedenle endojen duyuşal nöronların özelliklerine sahip olan kalıcı duyuşal hücre dizileriyle çalışılmaktadır. Kalıcı duyuşal hücre dizileri; DKG ile retroviral vektör içeren *v-myc* onkojeni ile insan embriyonik duyuşal nöronlarının ölümsüzleştirilmesiyle elde edilebildiği gibi (130), postmitotik embriyonik veya yetişkin DKG duyuşal nöronlarının fare N18Tg2 neuroblastoma hücreleriyle etkileşimi ile ölümsüzleştirilmiş hücre dizileri olan F11 ve ND ile de oluşturulabilir (131- 132).

DKG duyuşal sinirlere ait hücre gövdelerini ihtiva eder. DKG hücrelerinin çoğu mekanik uyarıya cevap verir ve buna göre bu hücreler geniş bağlamda düşük eşikli mekanoreseptörler ve yüksek eşikli nosiseptörler olarak iki ana gruba ayrılabilir. Mekanik uyarının bu nöronların reseptif uçlarında yer alan mekanosensitif iyon kanallarını direk olarak aktive ettiği sanılmaktadır. Bununla birlikte, bu iyon kanallarının moleküler yapısı, fizyolojik ve farmakolojik özellikleri de henüz tam olarak keşfedilmemiştir.

3.7. Nesfatin-1

Nesfatin-1 OH-I ve arkadaşları tarafından 2006 yılında tanımlanan 82 aminoasitli bir peptittir. Nükleobindin 2 (NUCB2) proteininin N- terminal parçasıdır. İnsanlarda, farelerde ve sıçanlarda bulunmuştur. Bilim insanları nesfatin-1 ürününün ismini; “NUCB2- encoded satiety and fat influencing protein” NUCB2 ile kodlanan tokluk ve yağ etkileyici protein manasındaki kelimelerin harflerinden isimlendirmişlerdir (133). Nesfatin/NUCB2 24 amino asitlik sinyal ve 396 aminoasitten oluşan bir protein oluşumdur (134,135). NEFA/NUCB2 proteininin iştah ile ilgisi dışında fonksiyonları tam bilinmemektedir. NUCB2 proteini Prohormone Convertase (PC, düzenlenmiş salgılama yolları bünyesinde birçok prekürsor proteinlerin proteolitik işlenişinden sorumlu bir serin proteinazdır) ile işlendiğinde; Nesfatin-1 (1-82 amino asit), Nesfatin-2 (85-163 amino asit) ve Nesfatin-3 (166-396 amino asit) isimlerinde 3 ürün ortaya çıkmaktadır (133).

Nesfatin/NUCB2 hipotalamusta iştah düzenlenmesinde görev alan paraventricüler nükleusta (PVN), supraoptik nükleusta (SON), zona incerta nöronlarında ve lateral hipotalamik alanda (LHA) eksprese edilmektedir (133). Buna ek olarak Nesfatin-1’in immünoreaktif olduğu alanlar; vagus dorsal nükleusu ve solitary tract gibi beyin sapı bölgelerinde de saptanmıştır (133, 136).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada açlık sırasında paraventricüler nükleusta Nesfatin/NUCB2 mRNA ‘sının ekspresyonunun düştüğü ve beslenme ile bu düşüşün düzeldiği ortaya koyulmuştur. Diğer hipotalamik nükleuslarda, açlık durumunda gözle görülen bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. İmmunohistokimyasal incelemelerde nesfatin nöron sitoplazmasında da tespit edilmiştir. Nesfatin PC 1/3 ve PC2 ile bir arada bulunmaktadır Erkek Wistar sıçanlarda nesfatin-1’in ICV olarak uygulanmasından 6 saat sonra gıda alımının doz bağımlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Ancak aynı proteinden türeyen nesfatin-2, nesfatin-3 ve nesfatin-2/3 gibi diğer parçaların ICV enjeksiyonunda bu etki görülmemiştir. Buna ek olarak Nesfatin-1’in antikorunun ICV enjeksiyonunun açlığı uyarıcı etkisi varken Nesfatin-3 antikorunun böyle bir etkisi yoktur (137). Yapılan çalışmalar Nesfatin/NUCB2 ‘nin sıçanlarda beslenme düzenlerinin fizyolojik kontrolünde bir rol oynadığını ispatlar niteliktedir (138).

İki farklı araştırmacı tarafından Nesfatin-1'in kan beyin bariyerini doaygunluğa ulaşmadan geçtiği bulunmuştur (139,140). Bu çalışmalarda hem endojen hem de ekzojen verilen nesfatin-1'in beyne geçerek beslenme davranışlarında inhibisyon gösterebileceği ortaya konulmuştur.

Nesfatin-1'in burun içi uygulanmasının erkek sıçanlarda etkisi araştırılmıştır. Bu şekilde uygulananın araştırılmasının sebebi leptin direnci gibi durumlarda oluşan kan beyin bariyerinde oluşan değişikliklerden bağımsız olmasıdır ve bu şekilde nesfatin-1 beyne kolayca giriş yapabilir. Bu deneyde nesfatin-1 sıçanlarda her iki burun içi bölgelerine 10 nmol/sıçan dozunda uygulanmıştır. Uygulanış ertesinde 6 saat süresince gıda alımının azaldığı rapor edilmiştir. Altı saatin sonunda bu anoreksijenik etki ortadan kalkmıştır. İnsanlarda obezitenin tedavisi için ileride burun içi nesfatin-1 uygulanması ihtimali mevcuttur (141).

Obeziteyi engellemek adına kullanılabilecek ilaçların üretimi; nesfatin-1'in aktif segmentlerinin araştırılarak nesfatin-1 analogları üretimine bağımlıdır. Bu araştırmalar sonucunda nesfatin-1'in 3 segmenti bulunmuştur. Bu segmentlerden 1–23 aminoasit dizisini içeren kısım N23, 23–53 aminoasit dizisini içeren kısım M30 ve 53–82 aminoasit dizisini içeren kısım ise C29 olarak adlandırılmıştır. Bu üç segmentin de beslenme davranışları üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırmalar sonucunda sadece orta segmentin, yani M30'un böyle bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (141). İntra peritoneal (IC_{50} = 0,35 nmol/gr vücut ağırlığı) uygulandığında M30 'un anoreksijenik etkisinin doz bağımlı olduğu ortaya konulmuştur (141).

Zucker Fatty sıçanlarda leptin reseptörü mutasyonu oluşturularak nesfatin-1 ile anoreksi indüklenmiştir. Anti-nesfatin-1 antikoru uygulanmış sıçanlarda ise leptin ile indüklenen anoreksi baskılanamamıştır (133). M30'un ip enjeksiyonu, genetik olarak obez (ob/ob), genetik olarak diyabetli (db/db) ve % 45 yağ içeren diyetle beslenen ve leptin direnci şartlarına sahip sıçanlarda, gıda alımını azaltmıştır (141). Bu veriler bize; nesfatin-1'in oluşturduğu anoreksinin, hipotalamik leptin sinyali yolu ile oluşan etki ile aynı olmadığını yani birbirinden bağımsız olduklarını göstermektedir. α -MSH'ın ICV enjeksiyonu PVN'de nesfatin/NUCB2 gen ekspresyonunu artırmıştır. Ayrıca nesfatin-1 ile oluşan

anoreksinin MCR 3/4 antagonisti olan SHU9119 uygulamasıyla ortadan kalktığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, nesfatin-1'in ICV enjeksiyonu ARC 'de POMC gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Bu gözlemler, hipotalamusta nesfatin-1 sinyalizasyon yolu ile melanokortin sinyalizasyon yolunun ilişkili olabileceğini göstermektedir (138).

Nesfatin-1 tarafından baskılanan beslenme davranışında beynin bazı bölgeleri önem arz eder. PVN 'de ve SON 'da nesfatin/NUCB2 ekspresyonu açlık ve tekrar beslenme ile modüle edilmektedir (133,142). Nesfatin-1, PVN'deki nöronların farklı alt popülasyonlarının büyük bölümünde uyarılabilirliğe etki etmektedir (143). PVN ve SON'deki nesfatin-1 nöronları oksitosin ve vazopressin ile koekspresedir (142). Double-labeling immünohistokimyasal çalışmalarda, PVN'deki parvocellular nöroendokrin nöronlarda, tiotropin salgılayıcı hormon (TRH), CRH, somatostatin, nörotensin ve büyüme hormonu salgılayıcı hormon (GHRH) ile magnocellular nöroendokrin nöronlarda, oksitosinin ve vazopressinin nesfatin/NUCB2 ile kolokalizasyonu ortaya konulmuştur. Magnocellular oksitosin nöronları, beslenme ile aktive olurlar ve oksitosin antagonistinin ICV uygulanması gıda alımında artış meydana getirmektedir (144). Bu veri, beslenme davranışının düzenlenmesinde, oksitosinin olası rolüne işaret etmektedir. Bütün bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, hipotalamusta nesfatin-1 ile indüklenen anoreksinin oksitosin ile de ilişkili olabileceği ihtimali mevcuttur (137).

Nesfatin/NUCB2 immünopozitif nöronları, aynı zamanda, ARC'de lokalizedir. Bu nöronlar, POMC/CART nöronları ile kolokalizedir. Ancak NPY/AgRP nöronları ile kolokalizasyonları yoktur (133,136). Bununla birlikte, ARC'de NPY nöronları nesfatin-1 ile hiperpolarize olur ve ATP-duyarlı potasyum iletim antagonisti olan glibenclamide, nesfatin-1'in oluşturduğu hiperpolarizasyonu önlemektedir. Nesfatin-1'in başlattığı anorekside NPY nöronlarında hiperpolarizasyon oluşması önemli bir bulgudur (143). Nesfatin-1'in POMC/CART nöronlarından salınarak, NPY/AgRP nöronal aktivasyonuna etki etmesi ihtimal dahilindedir. Ayrıca, Inhoff ve arkadaşları (145) serbest olarak beslenen sıçanlarda periferik ghrelin uygulamasıyla oluşan oreksijenik etkinin desacyl ghrelin ile inhibisyonunda nesfatin-1'in rolü olabileceğini ileri

sürmüşlerdir. Bu görüşü, eşzamanlı bir şekilde ghrelin ve desacyl ghrelin enjeksiyonları ile ARC’de nesfatin/NUCB2 immünoreaktif nöronlarının aktive olmasından dolayı ileri sürmüşlerdir. Ayrıca bu araştırmacılar ARC’de ghrelin ile NPY/AgRP nöronlarında oluşan aktivasyonun periferik desacyl ghrelin uygulamasıyla bloklanabilmesinin nesfatin-1 pozitif nöronları aracılığıyla meydana geldiğini ve bunun yeni bir yol olabileceğini iddia etmişlerdir.

M30’un ip enjeksiyonundan sonra beyin sapındaki NTS’de c-Fos anlamlı şekilde aktive edilmektedir. Bu duruma 3 saat süresince gıda alımının gözle görülür bir şekilde baskılanması eşlik etmektedir. Ancak böyle bir etki ARC için geçerli değildir. Nesfatin-1’in orta segmentinin enjeksiyonu NTS’nin nükleuslarında POMC ve CART genlerinin ekspresyonlarını önem arz edecek şekilde artırır fakat bu durum ARC’de oluşmaz. Nesfatin/NUCB2 ve CART eksprese eden nöronlar beyin sapının nükleuslarını içeren beyin bölgelerinde kolokalizdir (146). Bu bulgular, M30’un ip enjeksiyonu ile oluşan anoreksinin NTS’deki POMC ve CART nöronlarını aktive etmesinin leptinden bağımsız bir şekilde olabileceğine işaret etmektedir.

Reverse Transcriptase-PCR çalışmalarında, nesfatin/NUCB2 mRNA ‘sının beyin ve adipoz dokuyu kapsayan çeşitli vücut alanlarında varlığı ortaya konulmuştur. Nesfatin/NUCB2, aynı zamanda, Western blot analiziyle sıçanların serum ve serebrospinal sıvılarında belirlenmiştir. Ancak, dolaşımdaki nesfatin-1’in çıkış noktası henüz bulunamamıştır. Çünkü PC vücudun çeşitli dokularında dağılım göstermektedir (137).

Yakın tarihlerde, nesfatin/NUCB2 immünoreaktivitesi sıçan gastrik mukozasında tespit edilmiştir (147). Bu durum, nesfatin/NUCB2 ilişkili peptidlerin gastrointestinal fonksiyonun fizyolojik düzenlenmesinde de rolü olduğu ihtimalini kuvvetlendirmektedir. Ancak, gastrik mukozadaki nesfatin/NUCB2 tarafından nesfatin-1’in işlenmesi gösterilememiştir. Fakat nesfatin-1’in gastrik mukozada üretiliyor olması olasıdır. Çünkü gastrik mukozada PC-1/3 ve PC-2 mRNA’sı oldukça bol şekilde bulunmaktadır (148). Böylece, nesfatin/NUCB2 gen ekspresyonunun beslenme durumu tarafından düzenlenmesi ihtimali giderek artmaktadır. Ayrıca enerji homeostazisinde periferik nesfatin-1’in düzenleyici role sahip olduğu da ileri sürülmektedir.

Gastrik vagal afferent sinirler, açlık durumunda, midede üretilen ghrelin sinyallerinin iletimi için başlıca yoldur (149). Sıçan gastrik mukozasında nesfatin/NUCB2 immünoreaktif hücrelerin kaybının ghrelini koeksprese ettiği rapor edilmiştir (147). Periferal olarak uygulanan nesfatin-1 ve onun orta segmenti olan M30'un oluşturduğu anoreksijenik sinyalin beyin sapına vagal sinirler aracılığıyla, ghrelinin taşınmasına benzer şekilde, taşınması olasıdır. Bu amaçla, önceden sistemik kapsaisin enjekte edilmiş farelere ip M30 enjekte edilerek; M30'un anoreksijenik etkisinin, vagal sinirler ile ilişkisi araştırılmıştır. İp olarak uygulanan M30'un, önceden kapsaisin enjekte edilmiş farelerde anoreksijenik etki oluşturmadığı gözlenmiştir (138). Bu sonuç, ip olarak uygulanan M30'un anoreksiyi başlatabilmesi için vagal sinirlerin önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, muskarinik kolineseptör antagonisti olan atropin metil nitrat ve adrenerjik gangliyon blokeri olan bretylium tosylate uygulamalarıyla birlikte ip M30 uygulandığında, M30'un oluşturduğu gıda alımının baskılanmasının engellenmediği belirlenmiştir. Nikotinik kolinerjik bloker olan hekzametonyum uygulaması ile ip M30 enjeksiyonuyla ise M30 tarafından oluşturulan gıda alımındaki azalmanın, hekzametonyum tarafından ortadan kaldırıldığı tespit edilmiştir. Bu veriler, M30'un oluşturduğu anorekside nikotinik kolinerjik sistemin de yer aldığını ortaya koymaktadır (137).

Nesfatin/NUCB2 immünoreaktif hücreleri hem CD1 farelerin hem de Fischer 344 sıçanların pankreas adacıklarında insülin ile kolokalizdir (150). Pankreasın β hücrelerinin hem PC-1/3 hem de PC-2'yi ekspresse ettikleri iyi bilinmektedir. Nesfatin/NUCB2'nin nesfatin-1'e işlenme sürecinin, pankreasın β hücrelerinde gerçekleşiyor olması kuvvetli bir ihtimal gibi görünmektedir. Pankreasta nesfatin/NUCB2 immünoreaktivitesinin çokluğu ve insülinle kolokalizasyonu bu olasılığı artırmaktadır (137).

Otonomik sinirlerin aktivasyonunun düzenlenmesinde N tipi Ca^{+2} kanalları da rol almaktadır (151). Gangliyonik nöronlarda nesfatin-1'in indüklediği hücre içi kalsiyum ($[Ca^{+2}]_i$) artışının N tipi Ca^{+2} kanalları aracılığıyla meydana geldiği tespit edilmiştir. İzole edilmiş fare gangliyonik nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ artışının nesfatin-1'in 10^{-10} - 10^{-8} M konsantrasyonlarında olduğu belirlenmiştir. İnsanlarda nesfatin-1'in serum konsantrasyonunun 0.2 ng/ml (0.2×10^{-10} M) olduğu

rapor edilmiştir. Sağlıklı insanlarda kahvaltıdan önce nesfatin-1'in plazma düzeyinin 1–10 ng/ml (10^{-10} - 10^{-9} M) aralığında olduğu da ifade edilmektedir (152). Ayrıca PVN'de (133) ve gastrik mukozada (147) NUCB2 ekspresyonunun açlık durumunda, serbest beslenme şartlarına göre, daha düşük olduğu da tespit edilmiştir. Bu veriler nesfatin-1'in dolaşımdaki seviyesinin gıda alımı neticesinde artış gösterdiğine işaret etmektedir. Mide ve pankreas gibi nesfatin-1 üreten dokuların etrafında nesfatin-1 seviyesinin dolaşımdaki düzeyine göre daha yüksek olabileceği ifade edilmektedir. Gangliyonik nöronların aktivasyonunu sağlayabilmek için etkili nesfatin-1 konsantrasyonunun 10^{-10} M düzeyinde olduğu bildirilmektedir (152).

CCK, anoreksijenik bir peptittir. Gıda alımından sonra enteroendokrin I hücrelerinden salınmakta ve vagal sinirler aracılığıyla anoreksijenik etki oluşturmaktadır (153). Konuyla ilgili olarak yapılan çalışmada, fare gangliyonik nöronlarının % 50.2'sinde CCK-8'in $[Ca^{+2}]$ i artırdığı belirlenmiştir. Bu sonucun, daha önceki bir çalışmada, sıçan gangliyonik nöronlarından elde edilen bulgularla (154) uyumlu olduğu ifade edilmiştir. Nesfatin-1'in CCK-8'e duyarlı nöronlarda özellikle $[Ca^{+2}]$ i artırdığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, CCK-8 duyarlı nöronların bir kısmını nesfatin-1 duyarlı nöronların oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir. Buna dayanarak, gangliyonik nöronlarda nesfatin-1 ve CCK-8'in iştah baskılama etkisi ile ilgili eşit paya sahip oldukları da ifade edilmiştir (152). Buna karşın, CCK'nın periferik uygulanmasıyla PVN'de ve beyin sapındaki nesfatin-1 ile ilgili nöronlarda c-Fos ekspresyonunun uyarıldığı da rapor edilmiştir (155). Bu veriler ve diğer çalışmaların sonuçları birlikte ele alındığında, nesfatin-1'in merkezi veya periferik uygulanması neticesinde ortaya çıkan gıda alımındaki azalmanın, periferik CCK yanıtı ile bağlantılı olabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır (152).

Yeni keşfedilen bu tokluk peptidinin obezite ile mücadele yönünden oldukça ümit verici özelliklere sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca enerji dengesi ve üremenin düzenlenmesi bakımından nesfatin-1 ile ilgili olarak 2010 yılında yapılan bir çalışmada (156) pubertal olgunlaşma sürecindeki dişi sıçanlara bu peptidin antisense morpholino oligonucleotid'inin (as-MONs) ICV olarak infüzyonunun hipotalamik NUCB2 seviyesini azalttığı, vajinal açıklık süresini

uzattığı, ovaryum ağırlığını ve LH düzeyini azalttığı belirlenmiştir. Yine aynı araştırma gurubu tarafından insan, sıçan ve fare testislerinde ve sıçan ovaryumunda NUCB2 mRNA ekspresyonunun mevcudiyeti belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, immünohistokimyasal çalışmalar ile de leydig hücrelerinde NUCB2/nesfatin-1 immünoaktivitesi tespit edilmiştir (157). Bütün bunlara dayanarak nesfatin-1'in pubertenin düzenlenmesinde olmazsa olmaz faktörlerden birisi olduğu ileri sürülmüştür (156).



4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında DKG primer hücre kültürü hazırlanarak, nesfatin-1 'in DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ üzerine etkisi floresan kalsiyum görüntüleme sistemi ile araştırıldı.

4.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinin Primer Kültürü

Bu çalışmada sıçan dorsal kök gangliyonu (DKG) hücreleri mekanik ve enzimsel işlemlere tabi tutularak tek hücreler haline getirildi. Bu hazırlanan hücreler kalsiyum görüntüleme ile yapılan deneylerde kullanıldı. Forda ve Kelly (1985) adlı araştırmacıların ilk olarak geliştirdiği ve bu yazının devamında ayrıntılı bir şekilde anlatılan metoda göre DKG hücrelerinin izolasyonu ve kültürü gerçekleştirildi (158).

4.1.1. Kültür İçin Kullanılan Kimyasal Ajanlar ve Solüsyonlar

A) Steril Su: İki kere distile edilmiş suyun laminar hava akımlı bir güvenlik kabini içerisinde 0.2 μ m çapındaki filtrelerden geçirilmesi ile elde edildi. Otoklavda steril hale getirilmiş cam şişelerde saklandı.

B) Etil Alkol: % 99.7 - % 100 saflıktaki etanol çift distile su ile % 70 'lik olacak şekilde seyreltilti. Hazırlanan etil alkol daha rahat bir kullanım sağlamak amacı ile püskürtmeli ağızlığı bulunan bir şişeye koyuldu.

C) Steril Dulbeco 'nun Tamponlanmış Fosfat Tuzu (PBS) (Amresco, Solon, Ohio, ABD; magnezyum ve kalsiyum içermeyen): Bir PBS tableti 100 ml çift distile suyun içerisinde çözündürüldü. Daha sonra bu çözelti steril bir şişeye 0.22 μ m çapındaki filtreden geçirilerek aktarıldı. Hazırlanan bu PBS +4 °C de iki hafta süresince saklandı ve lüzum halinde kullanıldı.

D) Penisilin/Streptomisin (Sigma; Steinheim, Almanya): 1 ml 'lik stoklar 5000 IU/ml penisilinden ve 5000 μ g/ml streptomisinden olacak şekilde hazırlandı. Kültür medyumunda kullanılıncaya kadar -20 °C 'de saklandı.

E) Kollagenaz (Tip XI) (Sigma; Steinheim, Almanya): Steril su ile %1.25 'lik çözeltiler hazırlandı ve 1 ml 'lik kısımlara ayrılarak -20 °C 'de saklandı.

F) Tripsin (Tip I) (Sigma; Steinheim, Almanya): Steril PBS çözeltisi ile %2.5 'luk olacak şekilde seyreltildi ve 1 ml 'lik kısımlara ayrılarak -20 °C 'de saklandı.

G) Deoksiribonükleaz (DNAz, Tip IV) (Sigma; Steinheim, Almanya): Steril PBS ile 1600 Kunitz/ml konsantrasyonlarında çözeltiler oluşturuldu ve 1 ml 'lik kısımlara ayrılarak -20 °C 'de saklandı.

H) Sinir Büyüme Faktörü (Nerve Growth Factor – NGF, 2.5 S): Sinir büyüme faktörü steril su ile 100 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlandı. Bu solüsyon F14 içerisinde 1 µg/ml olacak şekilde dilüe edildi ve 500 µl 'lik kısımlara ayrılarak -20 °C 'de saklandı.

Sinir büyüme faktörü (NGF), özellikle embriyonik duyuşal ve sempatik nöronlarda yaşamı sürdürme ve farklılaşma etkileriyle karakterize olmuştur. Fazlasıyla geniş bir spektrumda biyolojik fonksiyonlar göstermektedir (159).

4.1.2. Kültür Vasatı

Steril 10 ml B27

Steril 5 ml Glutamaks

5 ml Penisilin/Streptomisin

500 ml NBA (Neurobasal®-A Medyum) içine ilave edildi ve 50 ml 'lik şişelerde kullanılıncaya kadar saklandı.

4.1.3. Kültür İçin Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri

Sterilizasyon için kullanılacak 0.22 µm por çapına sahip filtre

94 x 16 mm boyutlarında steril yuvarlak geniş petri kutusu

35 x 10 mm boyutlarında steril yuvarlak küçük petri kutusu

50 ml 'lik steril polipropilen koni tüp

15 ml 'lik steril polipropilen koni tüp

5 ml 'lik steril polipropilen koni tüp

12 mm boyutunda steril poly-D-lizin ve laminin kaplı lameller

150 mm uzunluğunda cam Pastör pipeti

4.1.4. Diseksiyon Malzemeleri

220 mm 'lik uzunlukta 1 tane büyük makas

80 mm 'lik uzunlukta 1 tane küçük makas

12 mm 'lik ucu olan 1 tane içi yaylı makas

15 cm 'lik uzunlukta 1 tane forseps

Ucu 0.07 x 0.03 mm ve uzunluğu 12 cm olan 1 tane ince uçlu düz forseps

Ucu 0.07 x 0.03 mm ve uzunluğu 12 cm olan 1 tane ince uçlu eğri forseps

4.1.5. Diğer Ekipmanlar

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

Otomatik CO₂ inkübatörü, model: HeraCell (Heraeus; Hanau, Almanya)

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

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

Cam şırınga (1-10 µl)

Şarjlı pipet

4.1.6. Dorsal Kök Gangliyonu (DKG) Hücre Kültürü Hazırlarken Uygulanan Genel Prensipler

Hücre kültürü hazırlarken ve hazırlanan bu kültürlerin saklanmasıyla oluşabilecek kontaminasyonların engellenmesi için gerekli görülen bütün önlemler alındı. Diseksiyon sırasında kullanılan bütün cerrahi ekipmanlar, Pastör pipeti, cam saklama kapları, pipet, pipet uçları otoklav (Nüve, Ankara) yardımıyla sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan malzemelerin hepsi önceden hazırladığımız % 70 'lik alkolle temizlenerek laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine yerleştirildi. Steril halde satın alınan plastik malzemelerin dış paketlemeleri % 70 'lik alkolle sterilize edildikten sonra laminar hava akımlı güvenliğine diğer cam malzemelerin ve cerrahi ekipmanların yanına yerleştirildi ve kullanım anında paketlerinden çıkarıldı. Laminar hava akımlı güvenlik kabini; hücre kültürü hazırlanmadığı vakitlerde içerisindeki ultraviyole ışık kaynağı ile sterilize edildi. Cerrahi malzemeler ve cam malzemeler her kültür hazırlama öncesinde sterilize

edildi. Hücre kültürünün hazırlandıktan sonra koyulacağı inkübatörün nem, gaz, sıcaklık düzeylerine dikkat edildi ve belirli periyotlarda temizliği yapıldı.

Hücre kültürü hazırlama sırasında kullanılan bütün solüsyon kaplarının ve cam saklama kaplarının üzerine sırasıyla içeriğinin ismi, hazırlandığı tarihi ve hazırlayan kişinin isminin baş harfleri yazıldı.

Kültür hazırlama işlemleri sırasında; çalışan kişinin eldivenleri gerekli aralıklarda % 70 'lik alkolle sterilize edildi.

4.1.7. Dorsal Kök Gangliyonu Hücre Kültürü Protokolü

Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi 'nden (FÜDAM) temin edilen 1-2 günlük Wistar cinsindeki sıçanlar dekapite edilerek geniş bir petri kutusuna yerleştirildi. Küçük makasla vertebral kolon çıkarıldı. Spinal kolonun içi kaudal uçtan başlayarak boyuna kadar yaylı küçük bir makasla açıldı. Bu izole edilen spinal kolon petri kutusuna alınarak PBS ile 3 defa yıkandı. Diseksiyon mikroskopu altında forsepsler yardımıyla dikkatli bir şekilde bütün DKG 'ler, daha önceden kültür vasatı koyulmuş küçük bir petri kutusuna alındı.

İzole edilen DKG 'ler petri kutusunun yuvarlak hareketlerle sallanması sonucunda bir araya toplanarak kültür medyumunu Pastör pipeti ile uzaklaştırıldı. 37 °C 'de inkübe edilmiş 900 µl kültür vasatı ve 100 µl kollagenaz (% 0.125) eklenerek hassas bir şekilde çalkalanıp 13 dakika inkübatörde tutuldu. Sonrasında inkübatörden çıkarılıp hızla 3 defa PBS ile yıkandı. Yıkanan hücrelere 900 µl ılık PBS ve 100 µl tripsin (% 0.25) ilave edilip hafifçe çalkalandı ve 6 dakika süreyle inkübe edildi. Bu süre sonunda hücreler 15 ml 'lik steril plastik bir tüpe alınarak üzerine 4 ml inkübe edilmiş kültür vasatı eklendi. Gangliyonlar tüpün dibine çöktürüldükten sonra kültür vasatı Pastör pipeti ile uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Daha sonra 100 µl DNaz ve 900 µl kültür medyumunu ilave edilip steril bir Pastör pipet ile hızla çelip boşaltma işlemi yapılarak gangliyonların mekanik olarak tek tek hücrelere ayrıştırılması sağlandı. Bu mekanik ayrıştırma işlemi birkaç seferde kademeli olarak yapıldı. Her bir kademedede üstte kalan süspansiyon alınarak diğer gangliyonlarla tritasyon işlemine devam edildi. İşlemlerden sonra bu hücre karışımına 200 ng/ml NGF eklendi. Hücreler +4°C den alınan Poly-D-lizin ve laminin kaplı lamellere (BD Biocoat, ABD) ekilerek, hücrelerin iyice

yapışması için 4-6 saat %5 CO₂ ve %95 O₂ karışımı içeren 37 °C nem oranı olan bir inkübatörde bekletildi.

4.2. Hücre İçi Kalsiyum Görüntüleme ve Görüntü Analizleri

Lamel üzerine ekilip yapışması için 4-6 saat inkübatörde bekletilen hücreler kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanıldı. Canlılığı devam etmekte olan hücrelerin aksonal ve dentritik uzantılarının gelişmesi floresan kalsiyum görüntüleme hesaplamalarını etkileyebileceğinden hazırlanan hücreler aynı gün içerisinde kullanıldı.

Kültüre DKG hücreleri; 45 dakika süresince, Fura-2 AM içeren NaCl esaslı hücre dışı kayıt solüsyonunda (135 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 11.5 mM glikoz, 11.6 mM HEPES) tutuldu. Deney öncesinde; hücre dışı kayıt solüsyonunun pH 'ı NaOH kullanılarak 7.4 'e, ozmolaritesi ise sükröz kullanılarak 310-320 mOsm 'a ayarlanmıştı. Hücreler 45 dakika inkübasyonun ardından taze hücre dışı kayıt solüsyonu ile 20 dakika aralıklarla 3 kez yıkanarak hücre dışındaki Fura-2 AM boyası uzaklaştırıldı. Böylece hücre içi kalsiyuma duyarlı bu boyanın de-esterifikasyonu sağlanmış oldu.

4.2.1. Floresan Kalsiyum Görüntüleme

Kalsiyuma duyarlı floresan boya ile yüklenen hücreleri içeren lameller, mikro inkübasyon kayıt çemberine (Warner Instruments, ABD) aktarıldı. Mikro inkübasyon - perfüzyon sistemi arasındaki bağlantı ince silikon hortum vasıtasıyla sağlandı. İlaç uygulaması esnasında perfüzyon sisteminden (Warner Instruments, ABD) (1 ml/dakika) kayıt çemberine ilaç içeren NaCl esaslı hücre dışı solüsyonunun akışı yerçekimi kuvvetiyle sağlandı. Deneylere başlamadan önce kayıt solüsyonlarının akacağı yükseklik tespit edildi. Bütün deneyler oda sıcaklığında (20 - 25 °C) gerçekleştirildi. Bütün deneysel işlemler hücrelerin floresan işaretleyici ile yüklenmesinden sonra maksimum iki saat içerisinde gerçekleştirildi.

Fura-2 AM floresanı bir xenon ışık kaynağından (LS- Sutter Instr, ABD) gönderilen UV ışınının hızlı bir otomatize filtre sürücüsüne (Lambda-2, Sutter Instr, ABD) yerleştirilen fura-2 filtre seti 340 nm ve 380 nm filtrelerden (Chroma,

ABD) gönderilerek mikroskop optikleri (Nikon TE 2000 S, S-flour 40X objektif, NA=1.4) aracılığı eksitasyon ve 510 nm'de emisyon gerçekleştirildi. Floresan görüntüleri yüksek hızlı soğutmalı dijital bir CCD kamera (ORCA 285, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japonya) aracılığı ile görüntülendi ve veri kazanım - yazılım programı (sPCI, ComPix) aracılığı ile de bilgisayar hafızasına kayıt edildi.

Floresan oranı analizleri offline olarak, cevap veren hücrelerde ilgili alanların seçimleri yapılarak, yazılım programı (sPCI, ComPix) aracılığıyla gerçekleştirildi. $[Ca^{+2}]_i$ 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.

4.3. Nesfatin-1 Uygulanması

Nesfatin-1 ayrıntısı yukarıda belirtilen NaCl esaslı hücre dışı kayıt solüsyonunda çözdürüldü ve her uygulama öncesi taze olarak hazırlandı. Son konsantrasyonlar 1 nM, 10 nM ve 100 nM olacak şekilde nesfatin-1 DKG nöronlarının bulunduğu kayıt çemberine uygulandı. başlangıçta kayıt çemberi içerisine hücreleri içeren lameller yerleştirildikten sonra perfüzyon sisteminin ince hortumu kayıt çemberi üzerine sabitlendi ve kayıt çemberi 600µl hücre dışı kayıt solüsyonuyla dolduruldu. Öncelikli olarak bazal seviyeyi belirlemek için en az 5'er dakika kayıtlar alındı. Nesfatin-1'in uygulamasını takiben kayıtlar alındı. Daha sonra nesfatin-1'in bu hücreler üzerine olan etkisinin, G proteini aracılığı olup olmadığını belirlemek amacıyla, Gi/o protein inhibitörü pertussis toksin (PTX) (100nM) ve nesfatin (100 nM) birlikte uygulandı. Bu uygulamayı takiben hücre içi kalsiyum depolarının bu etkideki rolünün ortaya konulması amacıyla thapsigarjin (TG), (1µM) 1 saat süreyle bu hücreler muamele edildi ve bu muamelenin ardından 100 nM nesfatin uygulandı. Son olarak nesfatin-1'in protein kinaz C (PKC) aracılığı etkinliğinin olup olmadığını belirleme amacıyla PKC inhibitörü şelettrin klorit (10µM) ve 100 nM nesfatin-1 birlikte kayıt çemberine eklendi.

4.4. İstatistik

Veriler SPSS 16.0 istatistik programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Grafikler de ise Sigma Plot 8.0 grafik programından yararlanıldı. Bütün veriler ortalama $\pm$ SS olarak sunuldu. Nesfatin-1'in (1 nM, 10 nM ve 100 nM) konsantrasyonlarının $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi üzerine olan doz bağımlı etkisini değerlendirmek amacıyla çift yönlü varyans analizi kullanıldı. Nesfatin-1'in gruplar arasındaki farklılığı ortaya koyabilmek ve PTX, TG ve PKC inhibitörü uygulamalarının Nesfatin-1'in $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla post hoc test olarak Tukey HSD testi kullanıldı ve istatistiksel olarak $p<0.05$ anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

Bu tez çalışması ile nesfatinin ağrının hücresel modeli olan DKG nöronlarında nesfatin-1'in $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi üzerine etkisinin olup olmadığı ilk defa incelendi. Nesfatin-1'in sıçan duyuşal nöronlarının hücre kültürlerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi üzerine etkileri ve $[Ca^{+2}]_i$ 'nin değişimi üzerine rol oynayan hücreşel yolakların rolü irdelendi.

Floresan kalsiyum görüntüleme yöntemi ile mevcut deney koşullarında bulunan fura-2 AM ile yüklenmiş bazal istirahat floresan sinyalleri veren DKG hücrelerinden 5-10 dakika bazal floresan sinyalleri kayıt edildi.

Bu çalışmada, DKG hücrelerinde nesfatin-1'in $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkisi olup olmadığı incelendi. Nesfatin-1 uygulaması öncesi (yaklaşık 5-10 dakika) 340/380 nm floresan oranı yaklaşık olarak 0.65 ve 0.75 arasındaydı. Nesfatin-1'in 3 farklı konsantrasyonunu (1nM, 10nM ve 100nM) uygulandı ve bu hücrelerde meydana gelen $[Ca^{+2}]_i$ artışının doz bağımlı olarak meydana gelip gelmediğı incelendi. Uygulanan nesfatinin $[Ca^{+2}]_i$ miktarında artışa sebep olduğı ancak bu artışın tüm hücrelerde benzer şekilde olmadığı belirlendi (Tablo 5.1).

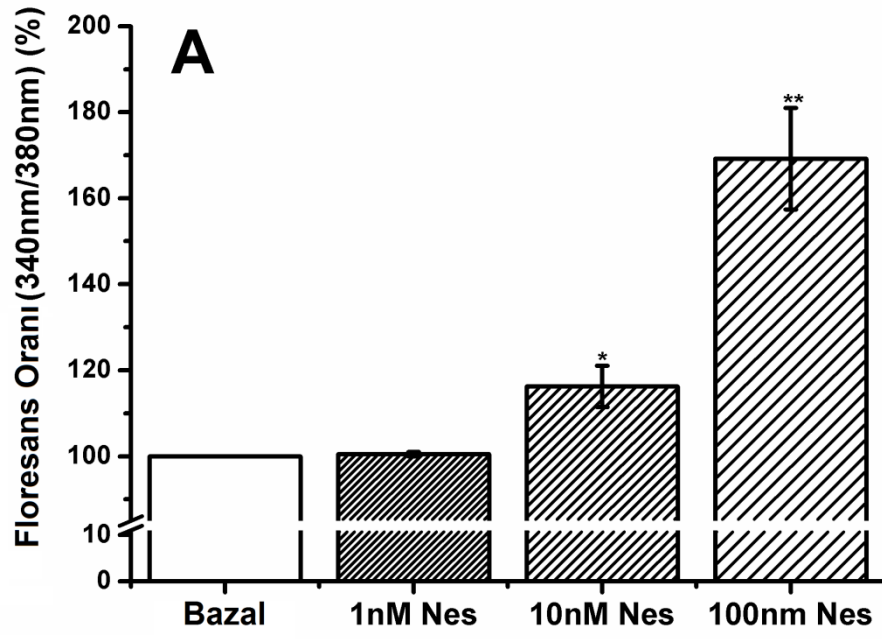
Tablo 5.1: Nesfatin-1 uygulamasını takiben duyuşal hücrelerin tamamında $[Ca^{+2}]_i$ miktarı artmamaktadır.

Nesfatin-1	Cevap Veren Hücre	Cevap Vermeyen	Toplam
	Sayısı (%)	Hücre Sayısı (%)	
1 nM	0 (%0)	52 (%100)	52
10 nM	18 (36.7)	31 (63.3)	49
100 nM	25 (32.9)	51 (67.1)	76

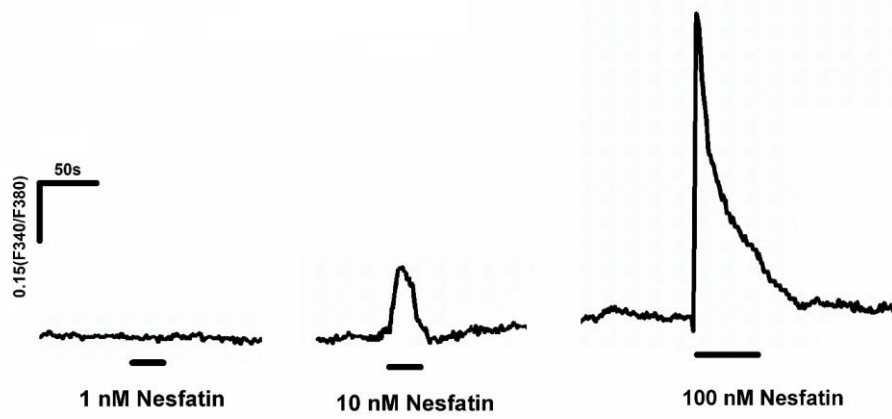
DKG hücrelerinde nesfatinin $[Ca^{2+}]_i$ üzerine etkileri Şekil 5.1 A-B de gösterilmiştir. 1 nM nesfatin $[Ca^{2+}]_i$ seviyelerinde gözle görülür herhangi bir değişikliğe yol açmazken; 10 ve 100 nM nesfatin $[Ca^{2+}]_i$ seviyelerinde önemli yükselmelere sebep olmuştur. 10 nM nesfatin kalsiyum konsantrasyonunu taban seviyesinden (% 100) DKG nöronlarının % 36.7 (18/49) 'sinde % 116.3 ± 4.8 yükseltmiştir ($p < 0.01$). 100 nM nesfatin benzer şekilde kalsiyum konsantrasyonunu taban seviyesinden (% 100) DKG nöronlarının % 32.9 (25/76) 'unda % 169.2 ± 11.8 yükseltmiştir ($p < 0.001$).

Tablo 5.2: Nesfatin-1 uygulamasını takiben duyuşal hücrelerin meydana gelen $[Ca^{+2}]_i$ miktarı artışı

Nesfatin-1	Bazal Seviye	Floresan Oranı (340nm/380nm)	Cevap veren hücre sayısı (n)
1 nM	100±0	100.2±2.8	0
10 nM	100±0	116.3±4.8	18
100 nM	100±0	169.2±11.8	25

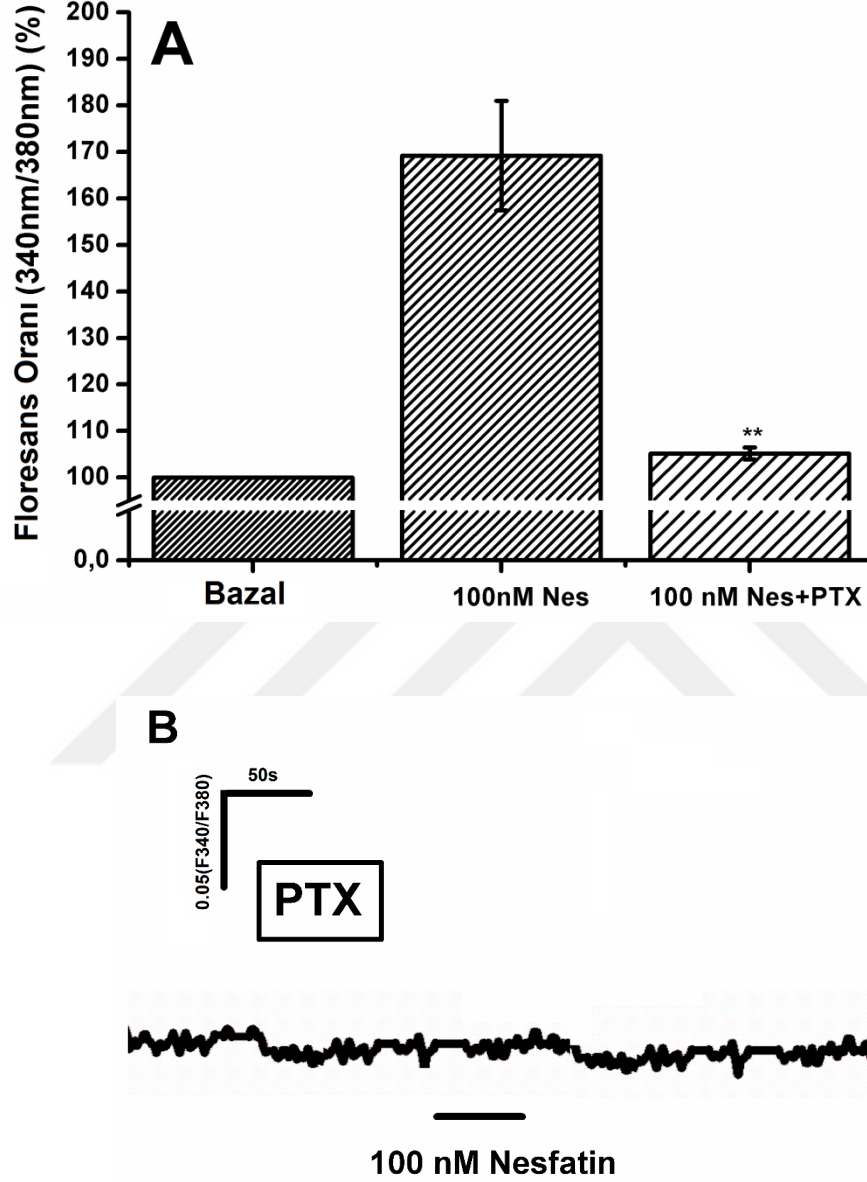


B



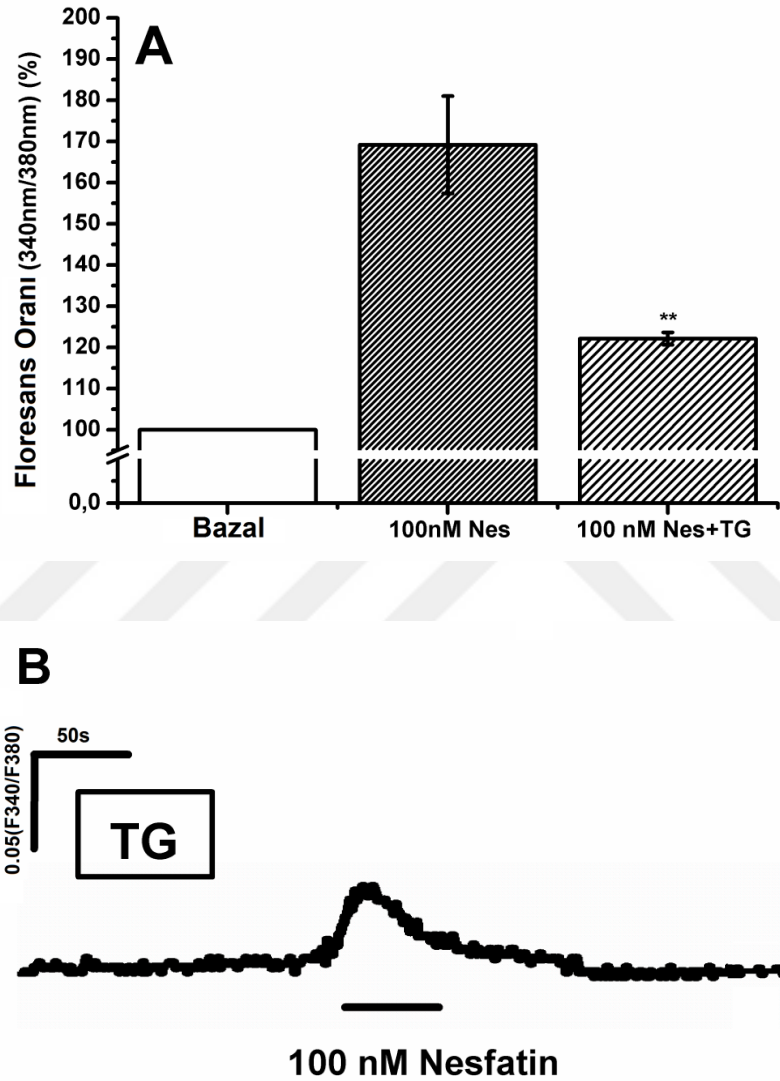
Şekil 5.1: A) DKG nöronlarına uygulanan farklı dozlardaki Nesfatinin (1nM, 10 nM ve 100 nM) $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri. B) Nesfatin-1'in (1nM, 10 nM ve 100 nM) sıçan dorsal kök gangliyon hücre kültürlerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine etkisini gösteren orijinal resim. * $p < 0.001$, ** $p < 0.0001$

DKG nöronlarında nesfatin -1 ile indüklenmiş kalsiyum geçişleri; pertussis toksin (100 nM), Gi/o protein inhibitörü ile neredeyse tamamen bloke edilmiştir (n=44, % 105.1±1.5, Şekil 5.2, p<0.001).



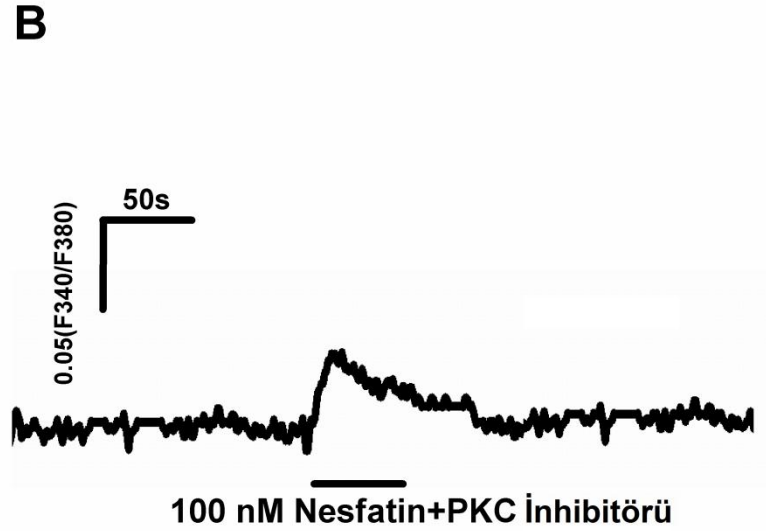
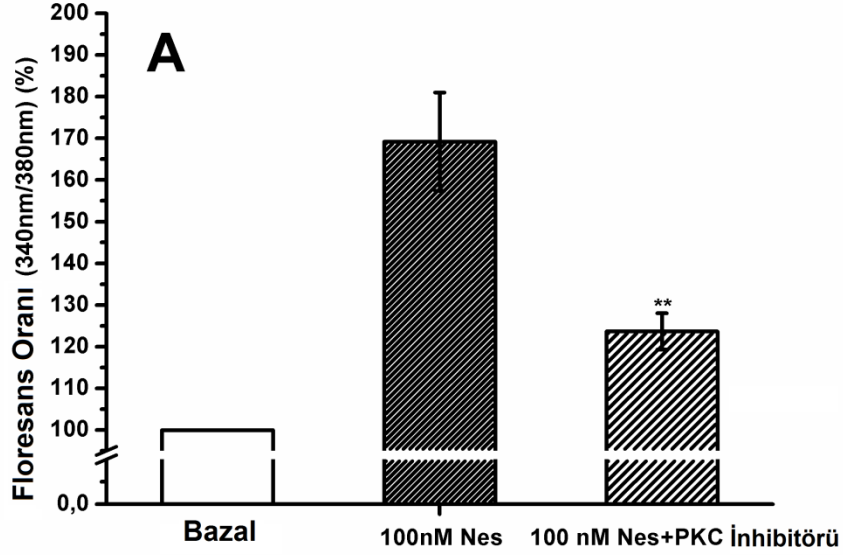
Şekil 5.2: DKG nöronlarına uygulanan nesfatinin (100 nM) $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine artışı Gi/o proteinleri aracılığıyla meydana getirmektedir. A) Bar grafikte nesfatin-1'in G proteini aracılığıyla meydana getirdiği etki görülmektedir B) Pertussis toksin uygulaması nesfatinin (100 nM) sıçan dorsal kök gangliyon hücre kültürlerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine meydana getirdiği artışı ortadan kaldırdığını gösteren orijinal resim ** p<0.0001.

DKG nöronları; intrasellüler Ca^{2+} depolarının boşaltılması için thapsigargin (1 μm , 60 dakika) uygulanıp ön inkübasyona tabi tutuldu. Bu durumda, 100 nM nesfatin uygulaması ile meydana gelen artış, thapsigargin (1 μm , 60 dakika) ön muamelesi sonrasında önemli ölçüde azaldı. (% 122.1 ± 1.5 , $n=16$, Şekil 5.3, $p < 0.001$).



Şekil 5.3: DKG nöronlarına uygulanan nesfatinin (100 nM) $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyine artışında hücre içi kalsiyum depolarının rolü. A) Bar grafikte nesfatin-1'in hücre içi kalsiyum depoları etki yüzdesi B) TG uygulaması nesfatinin (100 nM) sıçan dorsal kök gangliyon hücre kültürlerinde $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeylerine meydana getirdiği artışı etkilediğini gösteren orijinal resim ** $p < 0.0001$.

$[Ca^{2+}]_i$ geçişlerindeki nesfatinin uyarıcı etkileriyle PKC'nin ilişkisi olup olmadığını araştırmak için; PKC inhibitörü chelerythrine chloride uygulandı. 10 μ M PKC inhibitörü uygulandığında nesfatine (100 nM) pik $[Ca^{2+}]_i$ cevabı önemli bir şekilde % 123.7 ± 4.4 'e ($n=54$, $p<0.001$) düşmüştür.



Şekil 5.4: DKG nöronlarına uygulanan nesfatinin (100 nM) $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine artışında PKC'nin rolü. A) Bar grafikte nesfatin-1'in PKC inhibitörü uygulandığında etki etme yüzdesi B) PKC inhibitörü uygulaması nesfatinin (100 nM) sıçan dorsal kök gangliyon hücre kültürlerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerine meydana getirdiği artışı baskıladığını gösteren orijinal resim ** $p<0.0001$.

Tüm bu bulgular nesfatin-1'in duyuşal nöronlarda doz bağımlı olarak $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini artırdığı ve nesfatin-1'in indüklediğı bu artışın PKC-aracılı sinyal yolağı aracılığıyla olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmanın bir diğeri önemli bulgusu ise yüksek doz nesfatin-1'in uygulaması (100nM) ağrı iletiminden sorumlu olan nosiseptif (küçük ve orta çapa sahip DKG) nöronlardan ziyade büyük çapa sahip olan propriyoseptif nöronları etkilemektedir.



6. TARTIŞMA

Bu tez çalışması ile ilk defa nesfatin-1'in sıçan kültüre DKG nöronlarında intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunu arttırdığını ispatlamaktadır. $[Ca^{+2}]_i$ üzerindeki etkisi doza bağımlı bir şekildedir. Verilen cevabın pertussis toksin ile ortadan kalkması, Gi/o protein bağlı reseptörün katılımını göstermektedir. İntrasellüler Ca^{+2} depolarını boşaltmak için DKG nöronlarının thapsigargin ile ön inkübasyonu nesfatin-1 indüklü kalsiyum yükselmesinin düşük olmasına yol açmıştır. Peptidin, ekstrasellüler ve intrasellüler kaynaklardan Ca^{+2} akışı ile sitozolik Ca^{+2} 'un yükselmesini aktive ettiğini belirtmektedir. DKG nöronlarında nesfatin-1 ile indüklenmiş $[Ca^{+2}]_i$ yükselmesinin PKC inhibitörü ile ciddi bir şekilde azalması; protein kinaz C bağımlı bir mekanizmanın dahil olduğunu göstermektedir.

Nesfatin-1'in merkezi sinir sistemindeki nöronal aktiviteleri incelenirken özellikle enerji metabolizması üzerine pek çok çalışma mevcutken, periferik sinir sistemindeki rollerini araştıran çalışma sayısı sınırlıdır. Nesfatin-1'in N- tipi kanallardan Ca^{+2} akışını stimüle ederek vagal afferent nöronları aktive ettiği; periferik nesfatin-1'in beyne sinyal ilettiğine dair bir kanıttır (152). Nesfatin-1 ile indüklenmiş kalsiyum artışının L- ve P/Q tipi Ca^{+2} kanallarına bağıllığı sıçan hipotalamik kültüre nöronlarında gösterilmiştir (136). Bu cevabın yaptığımız çalışmada görüldüğü gibi pertussis toksin ile ortadan kalkması; nesfatin-1'in merkezi hipotalamik ve periferik DKG kültüre nöronlarında, G protein bağlı reseptörün farmakolojik karakteristiklerini gösteren bir reseptör ile etkileştiğini ortaya koymaktadır. Hipotalamik nöronlarda nesfatin-1 indüklü $[Ca^{+2}]_i$ yükselmesi protein kinaz A inhibitörü ile gözle görülür bir şekilde düşerken (136), bu çalışmada protein kinaz C inhibitörünün DKG nöronlarında nesfatin-1 ile indüklenmiş kalsiyum artışını ortadan kaldırması; merkezi ve periferik nöronlarda farklı akış etkileyicileri olduğunu gösterir.

Nesfatin-1'in ve prekürsörü nükleobindin2 (NUCB2) 'nin merkezi lokalizasyonu, beyin sapında ve hipotalamusun otonomik çekirdeklerinde kapsamlı olarak araştırılmıştır (136,146,160,161). Nesfatin-1'in paraventriküler nükleustan izole edilen oksitosin nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ 'u arttırdığı gösterilmiştir

(162). Nesfatin-1'in paraventricüler nükleustan izole edilen kortikotropin salgılayıcı faktör (CRF) immünoreaktif nöronlarında sitozolik $[Ca^{+2}]_i$ 'u arttırması (163); nesfatin-1'in beyin CRF/CRF1 sinyal yolları ile sıçan modelinde visseral hipersensitiviteye katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır. Deneysel visseral hipersensitiviteye maruz bırakılan sıçanlarda serum nesfatin-1 seviyelerinin önemli derecede yüksek (163) olması da nesfatin-1'in visseral hipersensitivite ile olan ilişkisini göstermektedir. Visseral duyuşal nörotransmisyon sürecinde bağırsaklardan omuriliğe duyuşal verileri aktaran nöronlar DKG nöronlarıdır. Bu psödounipolar nöronların; bağırsağa kadar uzanan periferik bir aksonu ve omuriliğin dorsal boynuzundaki duyuşal nöronlara yönelen merkezi bir aksonu vardır (164). Bu çalışmada DKG nöronlarındaki nesfatin-1 kaynaklı $[Ca^{+2}]_i$ değışiklikleri; CRF/CRF1 sinyal yollarına ek olarak visseral hipersensitivitenin oluşumu ve gelişmesine katkıda bulunabilir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında elde edilen veriler; nesfatin-1'in kültüre dorsal kök gangliyon nöronlarında kalsiyum akışını, G protein bağı reseptör ve protein kinaz C bağımlı mekanizma kullanılarak stimüle ettiğini ilk defa göstermiştir. Bu çalışmadan elde ettiğimiz verilerin fizyolojik önemlerinin ortaya çıkarılması hala devam ediyor olsa da; sonuçlarımız nesfatin-1'in sıçan kültüre duyuşal nöronlarında PKC mekanizmaları aracılığıyla nosiseptif uyarımında dahil olduğu somatosensöriyel transmisyonu modüle ettiğini göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

- 1- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
- 2- Brini, Marisa; Ottolini, Denis; Cali, Tito; Carafoli, Ernesto (2013). "Chapter 4. Calcium in Health and Disease". In Astrid Sigel, Helmut Sigel and Roland K. O. Sigel. Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. Metal Ions in Life Sciences 13. Springer. 81–137.
- 3- Brini, Marisa; Call, Tito; Ottolini, Denis; Carafoli, Ernesto (2013). "Chapter 5 Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling". In Banci, Lucia (Ed.). Metallomics and the Cell. Metal Ions in Life Sciences 12. Springer.
- 4- Ashcroft FM. Ion Channels And Disease. 1. Baskı ed. San Diego, California: Academic Press; 2000.
- 5- Nowycky MC, Fow AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. Nature. 1985;340:233–236.
- 6- Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. Annu Rev Physiol. 1989;51:367–384.
- 7- Scott RH, Pearson HA, Dolphin AC. Aspects on vertebrate neuronal voltage-activated calcium currents and their regulation. Progress Neurobiol. 1991;36:485–520.
- 8- Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA. Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels. TIPS. 1991;12:349–354.
- 9- Hell JW, Westenbroek RE, Warner C. et al. Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel α_1 subunits. J Cell Biol. 1993;123(4):949–962.
- 10- Tanabe T, Takeshima H, Flockerzi V. et al. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. Nature. 1987;328:313–318.
- 11- Tanabe TK, Beam G, Powell JA. et al. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. Nature. 1988;336:134–139.
- 12- Miller RJ. Voltage-sensitive Ca^{2+} channels. J Biol Chem. 1992;267(3):1403–1406.

- 13- Perney TM, Hirning LD, Leeman SE. et al. Multiple calcium channels mediate neurotransmitter release from peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83(17):6656–6659.
- 14- Cazalis M, Dayanithi G, Nordmann JJ. Hormone release from isolated nerve endings of the rat neurohypophysis. *J Physiol (London)* 1987;390:55–70.
- 15- Rane SG, Holz GG 4th, Dunlap K. Dihydropyridine inhibition of neuronal calcium current and substance P release. *Pflugers Arch*. 1987;409(4-5):361–366.
- 16- Lemos JR, Nowycky MC. Two types of calcium channels co-exist in peptide releasing vertebrate nerve terminals. *Neuron*. 1989;2(5):1419–1426.
- 17- Wang X, Wang G, Lemos R. et al. Ethanol directly modulates gating of a dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channel in neurohypophysial terminals. *J Neurosci*. 1994;14(9):5453–5460.
- 18- Murphy TH, Worley PF, Baraban JM. L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron*. 1991;7:625–635.
- 19- Sutton KG, McRory JE, Guthrie H. et al. P/Q-type channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A. *Nature*. 1999;401:800–804.
- 20- Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K. et al. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*. 2001;294:333–339.
- 21- Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV. et al. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *TINS*. 1988;11(10):431–438.
- 22- Imready JP, Yue DT. Mechanism of Ca^{2+} -sensitive inactivation of L-type channels. *Neuron*. 1994;12:1301–1318.
- 23- Charner P, Bourinet E, Dubel SJ. et al. Calcium currents recorded from a neuronal α_{1C} L-type channel in *Xenopus* oocytes. *FEBS Letts*. 1994;344:87–90.
- 24- Neely A, Olcese R, Wei S. et al. Ca^{2+} -dependent inactivation of a cloned cardiac Ca^{2+} channel α_1 subunit (α_{1C}) expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys J*. 1994;66:1895–1903.
- 25- Erickson MG, Alseikhan BA, Peterson BZ. et al. Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca^{2+} channels revealed by FRET in single living cells. *Neuron*. 2001;31(6):973–985.

- 26- Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW. Kinetics and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurons. *J Physiol (Lond)* 1987;394:149–172.
- 27- Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW. Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurons. *J Physiol (Lond)* 1987;394:173–200.
- 28- Gross RA, Macdonald RL. Dynorphin A selectively reduces a large transient (N-type) calcium current of mouse dorsal root ganglion neurons in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(15):5469–5473.
- 29- Green KA, Cottrell GA. Actions of baclofen on components of the Ca-current in rat and mouse DKG neurons in culture. *Br J Pharmacol*. 1988;94(1):235–245.
- 30- Petersen M, Wagner G, Pierau FK. Modulation of calcium currents by capsaicin in a subpopulation of sensory neurones of guinea pig. *Nauyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1989;339(1-2):184–191.
- 31- McCarthy RT, TanPiengco PE. Multiple types of high-threshold calcium channels in rabbit sensory neurons: high-affinity block of neuronal L-type by nimodipine. *J Neurosci*. 1992;12(6):2225–2234.
- 32- Wanke E, Ferroni A, Malgaroli A. Activation of a muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca^{2+} current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(12):4313–4317.
- 33- Plummer MR, Logothetis DE, Hess P. Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron*. 1989;2(5):1453–1463.
- 34- Jones SW, Marks TN. Calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. I. activation kinetics and pharmacology. *J Gen Physiol*. 1989;94(1):151–167.
- 35- Carrier GO, Ikeda SR. TTX-sensitive Na^+ channels and Ca^{2+} channels of the L- and N-type underlie the inward current in acutely dispersed coeliac-mesenteric ganglia neurons of adult rats. *Pflugers Arch*. 1992;42(1):7–16.
- 36- Doerner D, Pitler TA, Alger BE. Protein kinase C activators block specific calcium and potassium current components in isolated hippocampal neurons. *J Neurosci*. 1988;8(11):4069–4078.

- 37- Williams PJ, MacVivar BA, Pittman QJ. Electrophysiological properties of neuroendocrine cells of the intact rat pars intermedia: multiple calcium currents. *J Neurosci.* 1990;10(3):748–756.
- 38- Mogul DJ, Fox AP. Evidence for multiple types of Ca^{2+} channels in acutely isolated hippocampal CA1 neurones of the guinea-pig. *J Physiol (Lond)* 1991;433:259–281.
- 39- Regan LJ, Sah DWY, Bean BP. Ca^{2+} channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and ω -conotoxin. *Neuron.* 1991;6:269–280.
- 40- Baux G, Fossier P, Trudeau LE. et al. Presynaptic receptors for FMRFamide, histamine and buccalin regulate acetylcholine release at a neuro-neuronal synapse of *Aplysia* by modulating N-type Ca^{2+} channels. *J Physiol (Paris)* 1992;86(1-3):3–13.
- 41- Umemiya M, Berger AJ. Single channel properties of four calcium channel types in rat motoneurons. *J Neurosci.* 1995;15(3):2218–2224.
- 42- Plummer MR, Hess P. Reversible uncoupling of inactivation in N-type calcium channels. *Nature.* 1991;351:657–659.
- 43- Biagi BA, Enyeart JJ. Multiple calcium currents in a thyroid C-cell line: biophysical properties and pharmacology. *Am J Physiol.* 1991;260:C1253–C1263.
- 44- Jones SW, Elmslie KS. Separation and modulation of calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. *Can J Physiol Pharmacol.* 1992;70(Suppl):S56–S63.
- 45- Wang X, Treistman SN, Lemos JR. Single channel recordings of N- and L-type Ca^{2+} currents in rat neurohypophyseal terminals. *J Neurophysiol.* 1993;70(4):1617–1628.
- 46- Olivera BM, Gray WR, Zeikus R. et al. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science.* 1985;230:1338–1343.
- 47- Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J. et al. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: The ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:823–867.
- 48- Kasai H, Aosaki T, Fukuda J. Presynaptic Ca-antagonist omega-conotoxin irreversibly blocks N-type Ca-channels in chick sensory neurons. *Neurosci Res.* 1987;4(3):228–235.
- 49- McCleskey EW, Fox AP, Feldman DH. et al. Omega-conotoxin; direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84(12):4327–4331.

- 50- Aosaki T, Kasai H. Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca-channel currents in chick sensory neurons. Differential sensitivity to dihydropyridines and omega-conotoxin GVIA. *Pflugers Arch.* 1989;414(2):150–156.
- 51- Wang X, Treistman SN, Lemos JR. Two types of high threshold calcium currents inhibited by omega-conotoxin in nerve terminals of rat neurohypophysis. *J Physiol (Lond)* 1992;445:181–199.
- 52- Williams ME, Feldman DH, McCue AF. et al. Structure and functional expression of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron.* 1992;8(1):71–84.
- 53- Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ. Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. *TINS.* 1995;18(2):89–98.
- 54- Wagner JA, Snowman AM, Biswas A. et al. Omega-conotoxin GVIA binding to a high-affinity receptor in brain: characterization, calcium sensitivity, and solubilization. *J Neurosci.* 1988;8(9):3354–3359.
- 55- Jones OT, Kunze DL, Angelides KJ. Localization and mobility of ω -conotoxin-sensitive Ca^{2+} channels in hippocampal CA1 neurons. *Science.* 1989;244:1189–1193.
- 56- Takemura M, Kiyama H, Fukui H. et al. Distribution of the omega-conotoxin receptor in rat brain. An autoradiographic mapping. *Neuroscience.* 1989;32(2):405–416.
- 57- Fortier LP, Trembley JP, Raftari J. et al. A monoclonal antibody to conotoxin reveals the distribution of a subset of calcium channels in the rat cerebellar cortex. *Brain Res Mol Brain Res.* 1991;9(3):209–215.
- 58- Catterall WA, De Jongh K, Rotman E. et al. Molecular properties of calcium channels in skeletal muscle and neurons. *Ann NY Acad Sci.* 1993;681:342–355.
- 59- Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. Roles of N-type and Q-type calcium channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science.* 1994;264:107–111.
- 60- Kerr LM, Yoshikami D. A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature.* 1984;308:282–284.
- 61- Dooley DJ, Lupp A, Hertting G. et al. Omega-conotoxin GVIA and pharmacological modulation of hippocampal noradrenaline release. *Eur J Pharmacol.* 1988;148(2):261–267.
- 62- Lundy PM, Frew R. Evidence of omega conotoxin GVIA-sensitive Ca^{2+} channels in mammalian peripheral nerve terminals. *Eur J Pharmacol.* 1988;156(3):325–330.

- 63- Dutar P, Rascol O, Lamour Y. Omega-conotoxin GVIA blocks synaptic transmission on the CA1 field of the hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 1989;174(2-3):261–266.
- 64- Herdon H, Nahorski SR. Investigations of the roles of dihydropyridine and omega-conotoxinsensitive calcium channels in mediating depolarization-evoked endogenous dopamine release from striatal slices. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1989;340(1):36–40.
- 65- Takemura M, Kishino J, Yamatodani A. et al. Inhibition of histamine release from rat hypothalamic slices by omega-conotoxin GVIA, but not by nilvadipine, a dihydropyridine derivative. *Brain Res.* 1989;496(1-2):351–356.
- 66- Wessler I, Dooley DJ, Werhand J. et al. Differential effects of calcium channel antagonists (omega-conotoxin GVIA, nifedipine, verapamil) on the electrically-evoked release of [3H] acetylcholine from the myenteric plexus, phrenic nerve and neocortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1990;341(4):288–294.
- 67- Horne AL, Kemp JA. The effect of omega-conotoxin GVIA on synaptic transmission within the nucleus accumbens and hippocampus of the rat in vitro. *Br J Pharmacol.* 1991;103(3):1733–1739.
- 68- Potier B, Dutar P, Lamour Y. Different effects of omega-conotoxin GVIA at excitatory and inhibitory synapses in rat CA1 hippocampal neurons. *Brain Res.* 1993;616(1-2):236–241.
- 69- Leveque C, Hoshino T, David P. et al. The synaptic vesicle protein synaptotagmin associates with calcium channels and is a putative Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89(8):3625–3629.
- 70- Leveque C, el FarO, Martin-Moutot N. et al. Purification of the N-type calcium channel associated with syntaxin and synaptotagmin. *J Biol Chem.* 1994;269(9):6306–6312.
- 71- Sheng Z-H, Rettig J, Takahashi M. et al. Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. *Neuron.* 1994;13:1303–1313.
- 72- Sano K, Enomoto K, Maeno T. Effects of synthetic omega-conotoxin, a new type of Ca^{2+} antagonist, on frog and mouse neuromuscular transmission. *Eur J Pharmacol.* 1987;141(2):235–241.
- 73- Protti DA, Szczupak L, Scornik FS. et al. Effects of omega-conotoxin GVIA on neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *Brain Res.* 1991;557(1-2):336–339.

- 74- Adams ME, Olivera BM. Neurotoxins: Overview of an emerging research technology. *TINS*. 1994;17(4):151–155.
- 75- Wu LG, Saggau P. Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapse of the hippocampus. *J Neurosci*. 1994;14(9):5613–5622.
- 76- Turner TJ, Lampe RA, Dunlap K. Characterization of presynaptic calcium channels with omega-conotoxin MVIIC and omega-granmotoxin SIA: Role for a resistant calcium channel type in neurosecretion. *Mol Pharmacol*. 1995;47(2):348–353.
- 77- Burke SP, Adams ME, Taylor CP. Inhibition of endogenous glutamate release from hippocampal tissue by Ca^{2+} channel toxins. *Eur J Pharmacol*. 1993;238(2-3):383–386.
- 78- Luebke JI, Dunlap K, Turner TJ. Multiple calcium channel types control glutaminergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron*. 1993;11(5):895–902.
- 79- Komuro H, Rakic P. Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science*. 1992;257:809–806.
- 80- Bean BP. Pharmacology of calcium channels in cardiac muscle, vascular muscle, and neurons. *Am. J Hypertens*. 1991;4:406S–411S.
- 81- Randall RD, Raabe W. A non-T-, N-, or L-type calcium channel mediates release of transmitter from cerebellar granule cells in tissue culture. Abstract presented at the 22nd meeting of the Society for Neuroscience. 1992;18:429.
- 82- Regan LJ. Voltage-dependent calcium currents in Purkinje cells from rat cerebellar vermis. *J Neurosci*. 1991;11(7):2259–2269.
- 83- Llinas R, Sugimori M, Lin JW. et al. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(5):1689–1693.
- 84- Lin J-W, Rudy B, Llinas R. Funnel-web spider venom and a toxin fraction block calcium current expressed from rat brain mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:4538–4542.
- 85- Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM. et al. P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω -Aga-VIA. *Nature*. 1992;355:827–829.
- 86- Bindokas VP, Brorson JR, Miller RJ. Characteristics of voltage sensitive calcium channels in dendrites of cultured rat cerebellar neurons. *Neuropharmacology*. 1993;32(11):1213–1220.

- 87- Mintz IM, Adams ME, Bean BP. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron*. 1992;9:85–95.
- 88- Usowicz MM, Sugimori M, Cherskey B. et al. P-type calcium channels in the somata and dendrites of adult cerebellar Purkinje cells. *Neuron*. 1992;9(6):1185–1199.
- 89- Hillyard DR, Monje VD, Mintz IM. et al. A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca^{2+} channels. *Neuron*. 1992;9:69–77.
- 90- Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT. et al. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal calcium channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology*. 1993;32(11):1075–1088.
- 91- Randall A, Tsien RW. Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J. Neurosci*. 1995;15(4):2995–3012.
- 92- Adams ME, Myers RA, Imperial JS. et al. Toxotyping rat brain calcium channels with ω -toxins from spider and cone snail venoms. *Biochem*. 1993;32:12566–12570.
- 93- Luebke JI, Dunlap K, Turner TJ. Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron*. 1993;11(5):895–902.
- 94- Turner TJ, Adams ME, Dunlap K. Calcium channels coupled to glutamate release identified by omega-Aga-IVA. *Science*. 1992;258:310–313.
- 95- Turner TJ, Adams ME, Dunlap K. Multiple Ca^{2+} channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(20):9518–9522.
- 96- Lundy PM, Frew R. Effect of omega-agatoxin-IVA on autonomic neurotransmission. *Eur J Pharmacol*. 1994;261(1-2): 79–84.
- 97- Uchitel OD, Protti DA, Sanchez V. et al. P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:3330–3333.
- 98- Bowersox S, Ko C-P, Sugiura Y. et al. Omega-conopeptide SNX-230 (MVIIC) blocks calcium channels in mouse neuromuscular junction nerve terminals. Abstract presented at the 23rd annual meeting of the Society for Neuroscience. 1993;Vol19:p1478.
- 99- Structure and function of neuronal Ca^{2+} channels and their role in neurotransmitter release. Catterall WA. *Cell Calcium*. 1998 Nov-Dec;24(5-6):307-23.

- 100- Mitterdorfer J, Grabner M, Kraus RL et al. Molecular basis of drug interaction with L-type Ca^{2+} channels., 1998 Aug;30(4):319-34.
- 101- Cosford ND, Meinke PT, Stauderman KA et al. Recent advances in the modulation of voltage-gated ion channels for the treatment of epilepsy. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2002 Feb;1(1):81-104.
- 102- Gurnett CA, Campbell KP. Transmembrane auxiliary subunits of voltage-dependent ion channels. *J Biol Chem.* 1996 Nov 8;271(45):27975-8.
- 103- Kim HL, Kim H, Lee P et al. Rat brain expresses an alternatively spliced form of the dihydropyridine-sensitive L-type calcium channel alpha 2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 15;89(8):3251-5. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Jun 15;89(12):5699.
- 104- Miller RJ. The control of neuronal Ca^{2+} homeostasis. *Prog Neurobiol.* 1991;37(3):255-85.
- 105- De Jongh KS1, Warner C, Catterall WA. Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *J Biol Chem.* 1990 Sep 5;265(25):14738-41.
- 106- Gao B, Sekido Y, Maximov A et al. Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta auxiliary subunit gene (CACNA2D2). *J Biol Chem.* 2000 Apr 21;275(16):12237-42.
- 107- Barclay J, Balaguero N, Mione M et al. Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the *Cacna2d2* gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells., *J Neurosci.* 2001 Aug 15;21(16):6095-104.
- 108- Marais E, Klugbauer N, Hofmann F. Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and Gabapentin binding. *Mol Pharmacol.* 2001 May;59(5):1243-8.
- 109- Klugbauer N, Lacinová L, Marais E et al. Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci.* 1999 Jan 15;19(2):684-91.
- 110- Ruth P, Röhrkasten A, Biel M et al. Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science.* 1989 Sep 8;245(4922):1115-8.
- 111- Castellano A, Wei X, Birnbaumer L et al. Cloning and expression of a third calcium channel beta subunit. *J Biol Chem.* 1993 Feb 15;268(5):3450-5.
- 112- Brust PF, Simerson S, McCue AF et al. Human neuronal voltage-dependent calcium channels: studies on subunit structure and role in channel assembly. *Neuropharmacology.* 1993 Nov;32(11):1089-102.
- 113- De Waard M, Campbell KP. Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca^{2+} channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 1995 Jun 15;485 (Pt 3):619-34.
- 114- Gregg RG, Messing A, Strube C et al. Absence of the beta subunit (*cchb1*) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 26;93(24):13961-6.

- 115- Namkung Y, Smith SM, Lee SB et al. Targeted disruption of the Ca²⁺ channel beta3 subunit reduces N- and L-type Ca²⁺ channel activity and alters the voltage-dependent activation of P/Q-type Ca²⁺ channels in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 29;95(20):12010-5.
- 116- Burgess DL, Biddlecome GH, McDonough SI et al. Beta subunit reshuffling modifies N- and P/Q-type Ca²⁺ channel subunit compositions in lethargic mouse brain. *Mol Cell Neurosci*. 1999 Apr;13(4):293-311.
- 117- Burgess DL, Jones JM, Meisler MH et al. Mutation of the Ca²⁺ channel beta subunit gene *Cchb4* is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse., Noebels JL. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):385-92.
- 118- Jay SD, Ellis SB, McCue AF et al. Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*. 1990 Apr 27;248(4954):490-2.
- 119- Letts VA, Felix R, Biddlecome GH et al. The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit. *Nat Genet*. 1998 Aug;19(4):340-7.
- 120- Klugbauer N, Dai S, Specht V et al. A family of gamma-like calcium channel subunits. *FEBS Lett*. 2000 Mar 24;470(2):189-97.
- 121- Philipp S, Hambrecht J, Braslavski L et al. A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J*. 1998 Aug 3;17(15):4274-82.
- 122- Molecular Properties of Voltage-Gated Calcium Channels Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.
- 123- Zelman DC, Howland EW, Nichols SN et al. The effects of induced mood on laboratory pain. *Pain*. 1991 Jul;46(1):105-11.
- 124- Wang LX, Wang ZJ. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 Aug 28;55(8):949-65.
- 125- Ayar A, Martin DJ, Ozcan M et al. Melatonin inhibits high voltage activated calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci Lett*. 2001 Nov 2;313(1-2):73-7.
- 126- Hingtgen CM, Vasko MR et al. Prostacyclin enhances the evoked-release of substance P and calcitonin gene-related peptide from rat sensory neurons. *Brain Res*. 1994 Aug 29;655(1-2):51-60.
- 127- Southall MD, Vasko MR. Prostaglandin E(2)-mediated sensitization of rat sensory neurons is not altered by nerve growth factor. *Neurosci Lett*. 2000 Jun 16;287(1):33-6.
- 128- Burgess GM, Mullaney I, McNeill M et al. Activation of guanylate cyclase by bradykinin in rat sensory neurones is mediated by calcium influx: possible role of the increase in cyclic GMP. *J Neurochem*. 1989 Oct;53(4):1212-8.
- 129- Baccaglini PI, Hogan PG et al. Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Jan;80(2):594-8.

- 130- Raymon HK, Thode S, Zhou J et al. Immortalized human dorsal root ganglion cells differentiate into neurons with nociceptive properties. *J Neurosci*. 1999 Jul 1;19(13):5420-8.
- 131- Platika D, Boulos MH, Baizer L et al. Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 May;82(10):3499-503.
- 132- Wood JN, Bevan SJ, Coote PR et al. Novel cell lines display properties of nociceptive sensory neurons. *Proc Biol Sci*. 1990 Sep 22;241(1302):187-94.
- 133- Oh-I S, Shimizu H, Satoh T et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*. 2006 Oct 12;443(7112):709-12. Epub 2006 Oct 1.
- 134- Barnikol-Watanabe S, Gross NA, Götz H et al. Human protein NEFA, a novel DNA binding/EF-hand/leucine zipper protein. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA, isolation and characterization of the protein. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1994 Aug;375(8):497-512.
- 135- Miura K, Titani K, Kurosawa Y et al. Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992 Aug 31;187(1):375-80.
- 136- Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E et al. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology*. 2007 Oct;148(10):5088-94.
- 137- Shimizu H, Oh-I S, Okada S et al. Nesfatin-1: an overview and future clinical application. *Endocr J*. 2009;56(4):537-43.
- 138- Shimizu H, Ohsaki A, Oh-I S et al. A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides*. 2009 May;30(5):995-8.
- 139- Pan W, Hsueh H, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides*. 2007 Nov;28(11):2223-8.
- 140- Price TO, Samson WK, Niehoff ML et al. Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides*. 2007 Dec;28(12):2372-81.
- 141- Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K et al. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology*. 2009 Feb;150(2):662-71. doi: 10.1210/en.2008-0598.
- 142- Kohno D, Nakata M, Maejima Y et al. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology*. 2008 Mar;149(3):1295-301.
- 143- Price CJ, Hoyda TD, Samson WK et al. Nesfatin-1 influences the excitability of paraventricular nucleus neurones. *J Neuroendocrinol*. 2008 Feb;20(2):245-50.
- 144- Douglas AJ, Johnstone LE, Leng G. Neuroendocrine mechanisms of change in food intake during pregnancy: a potential role for brain oxytocin. *Physiol Behav*. 2007 Jul 24;91(4):352-65.

- 145- Inhoff T, Mönnikes H, Noetzel S et al. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides*. 2008 Dec;29(12):2159-68. doi: 10.1016/j.peptides.2008.09.014.
- 146- Foo KS, Brismar H, Broberger C. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience*. 2008 Oct 15;156(3):563-79. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.07.054.
- 147- Stengel A, Goebel M, Yakubov I et al. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology*. 2009 Jan;150(1):232-8. doi: 10.1210/en.2008-0747.
- 148- Macro JA, Dimaline R, Dockray GJ. Identification and expression of prohormone-converting enzymes in the rat stomach. *Am J Physiol*. 1996 Jan;270(1 Pt 1):G87-93.
- 149- Date Y, Murakami N, Toshinai K et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*. 2002 Oct;123(4):1120-8.
- 150- Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S. Pancreatic beta cells colocalize insulin and pronesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Apr 17;381(4):643-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.02.104.
- 151- Serone AP, Angus JA. Role of N-type calcium channels in autonomic neurotransmission in guinea-pig isolated left atria. *Br J Pharmacol*. 1999 Jun;127(4):927-34.
- 152- Iwasaki Y, Nakabayashi H, Kakei M et al. Nesfatin-1 evokes Ca²⁺ signaling in isolated vagal afferent neurons via Ca²⁺ influx through N-type channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Dec 18;390(3):958-62. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.085.
- 153- Raybould HE. Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. *Curr Opin Pharmacol*. 2007 Dec;7(6):570-4.
- 154- Simasko SM, Wiens J, Karpel A et al. Cholecystokinin increases cytosolic calcium in a subpopulation of cultured vagal afferent neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Dec;283(6):R1303-13.
- 155- Noetzel S, Stengel A, Inhoff T et al. CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem. *Regul Pept*. 2009 Oct 9;157(1-3):84-91. doi: 10.1016/j.regpep.2009.06.009
- 156- García-Galiano D, Navarro VM, Roa J et al. The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat. *J Neurosci*. 2010 Jun 9;30(23):7783-92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5828-09.2010.
- 157- García-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F et al. Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol*. 2010 Nov;45(5):281-90. doi: 10.1677/JME-10-0059.

- 158- Forda S, Kelly JS. The possible modulation of the development of rat dorsal root ganglion cells by the presence of 5-HT-containing neurones of the brainstem in dissociated cell culture. *Brain Res* 1985;354(1):55-65.
- 159- Levi-Montalcini R, Dal Toso R, della Valle F et al. Update of the NGF saga. *J Neurol Sci* 1995;130(2):119-27
- 160- Fort P, Salvert D, Hanriot L et al. The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* 2008;155:174-81.
- 161- Goebel M, Stengel A, Wang L et al. Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci Lett* 2009;452:241-6.
- 162- Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S et al. Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab.* 2009;10:355-65.
- 163- Jia FY, Li XL, Li TN et al. Role of nesfatin-1 in a rat model of visceral hypersensitivity. *World J Gastroenterol.* 2013;19:3487-93.
- 164- Qian A, Song D, Li Y et al. Role of voltage gated Ca²⁺ channels in rat visceral hypersensitivity change induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid. *Mol Pain* 2013;28:9-15.

8. ÖZGEÇMİŞ

29.03.1988 tarihinde Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Elazığ'da tamamladım. 2010 yılında Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden mezun oldum. 2011 yılından beri Elazığ'da eczacısı ve mesul müdürü bulunduğum Gökler Eczanesi'nde mesleğime devam etmekteyim. Halen İstanbul Üniversitesi AUZEF Sağlık Kurumları İşletmeciliği 2. Sınıfı okumaktayım. Yüksek lisans tezim “Nesfatin-1 Increases Intracellular Calcium Concentration By Protein Kinase C Activation in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurons” ismi ile makale olarak uluslararası Neuroscience Letters dergisinde yayınlanmak üzere kabul edilmiştir, şu an basım aşamasındadır.