

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

LEPTİNİN HÜCRE İÇİ KALSIYUM
SİNYALLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
SIÇAN DORSAL KÖK GANGLİYON
HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİNEM ORUÇ

2012

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek lisans tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



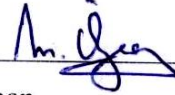
Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK

Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Mete ÖZCAN

Danışman



Yüksek lisans Sınavı Jüri Üyeleri

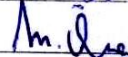
Prof. Dr. Yunus KARAKOÇ

Prof. Dr. Selim KUTLU

Doç. Dr. Mete ÖZCAN

Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK

Yrd. Doç. Dr. İhsan SERHATLIOĞLU



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkı sağlayan, tezimin hazırlanmasında yardım ve desteklerini esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Mete ÖZCAN' a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışması süresince yardımlarını gördüğüm Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK'e, yüksek lisans öğrencisi Nida ASLAN'a, Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR, Prof. Dr. Selim KUTLU, Prof. Dr. Ramazan BAL, Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞ, yüksek lisans öğrencisi Ersen ERASLAN'a ve bütün hayatım boyunca bana destek olan aileme,

Bu tezin gerçekleşmesi için destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Koordinasyon Birimi'ne en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Nöronlarda İstirahat Membran Potansiyeli	6
3.2. Aksiyon Potansiyelinin Oluşumu.....	9
3.3. Membran İyon Kanalları	10
3.3.1. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları	11
3.3.2. Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları	12
3.3.3. Klor Kanalları.....	13
3.3.4. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları	14
3.3.4.1. L tipi kalsiyum kanalları	16
3.3.4.2. N tipi kalsiyum kanalları	17
3.3.4.3. P/Q tipi kalsiyum kanalları	18
3.3.4.4. R tipi kalsiyum kanalları	18
3.3.4.5. T tipi kalsiyum kanalları	19
3.3.5. TRP Kanalları.....	20

3.3.6. Aside Duyarlı İyon Kanalları	22
3.4. Leptin	23
3.5. Ağrı	25
3.5.1. Ağrı Sinyallerinin İletimi	26
3.6. Dorsal Kök Gangliyonu Nöronlarının Sınıflandırılması ve Özellikleri.....	27
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
4.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinin Primer Kültürü.....	30
4.1.1. Kültür İçin Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Ajanlar	30
4.1.2. Kültür Vasatı	32
4.1.3. Kültür İçin Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri	32
4.1.4. Diseksiyon Malzemeleri.....	32
4.1.5. Diğer Ekipmanlar	33
4.1.6. Dorsal Kök Gangliyon Hücre Kültürü Protokolü	33
4.2. Hücre İçi Kalsiyum Görüntüleme ve Görüntü Analizleri	34
4.2.1. Floresan Kalsiyum Görüntüleme	35
4.3. Leptin Uygulaması	36
4.4. İstatistik.....	36
5. BULGULAR.....	38
6. TARTIŞMA	47
7. KAYNAKLAR	51
8. ÖZGEÇMİŞ.....	60

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1: Kalsiyum kanal alt tipleri.	16
Şekil 4.1: Kalsiyum Görüntüleme Sisteminin Genel Görünüşü.	37
Şekil 5.1: DKG nöronlarına uygulanan 0.1 µM leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri	39
Şekil 5.2: DKG nöronlarına uygulanan 1 µM leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri ..	40
Şekil 5.3: DKG nöronlarına uygulanan 10 µM leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri	41
Şekil 5.4: DKG nöronlarına uygulanan 100 µM leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri	42
Şekil 5.5: DKG nöronlarına uygulanan 1 µM leptin ve TG'nin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri.....	44
Şekil 5.6: DKG nöronlarına uygulanan PKC inhibitörü şelettrin klorit ve 1 µM leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri.....	45

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1: Memeli kas hücresinde, Na^+ , K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} iyonlarının hücre içi ve hücre dışı konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlarda elde edilen elektrokimyasal denge potansiyelleri	8
Tablo 3.2: Kalsiyum Kanal Sınıflandırılması.	20
Tablo 5.1: DKG nöronlarında, leptin (0.1, 1, 10 ve 100 μM) uygulamasına, $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzey (340 nm/380 nm floresan oranları) cevapları.....	38

KISALTMALAR LİSTESİ

[Ca⁺²]_i	: Hücre İçi Serbest Kalsiyum
μM	: Mikromolar
AP	: Aksiyon Potansiyeli
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
Cl⁻	: Klor İyonu
DKG	: Dorsal Kök Gangliyonları
DVAKK	: Düşük Voltajla Aktive Olan Kalsiyum Kanalları
IP₃	: İnozitol Trifosfat
K⁺	: Potasyum İyonu
Na⁺	: Sodyum İyonu
NPY	: Nöropeptid Y
OB-R	: Leptin Reseptörü
PKC	: Protein Kinaz C
POMC	: Pro-opiomelanokortin
TG	: Tapsigarjin
VKKK	: Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları
VKPK	: Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları
VKSK	: Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları
YVAKK	: Yüksek Voltajla Aktive Olan Kalsiyum Kanalları

1. ÖZET

Leptinin santral ve periferik olarak uygulanmasının, nosiseptif davranışta önemli rol oynadığı bilindiği halde hücrel mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada leptinin periferik nosisepsiyondaki etki mekanizmasını araştırmak amacıyla, izole edilmiş sıçan dorsal kök gangliyon (DKG) nöronlarında leptinin hücre içi kalsiyum ($[Ca^{+2}]_i$) düzeyine etkileri incelendi.

İzole edilmiş DKG nöronları, 1 μ mol fura-2 AM ile yüklendi ve Ca^{+2} cevapları, oransal ölçüm kullanılarak değerlendirildi. Fura-2 AM ile yüklenmiş DKG nöronları, dijital mikroskop kalsiyum görüntüleme sistemi kullanılarak, 340 nm/380 nm'de eksitasyon ve 510 nm'de emisyon kaydedildi. $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonundaki değişim, DKG nöronlarındaki 340 nm/380 nm floresan oranındaki değişimle belirlendi. Leptin, doz bağımlı olarak $[Ca^{+2}]_i$ miktarında artış meydana getirdi. 340 nm/380 nm oranları, (bazal 100.0 ± 0.0 % vs leptin): % 104.6 ± 0.4 (0.1 μ M leptin, n=42), % 119.5 ± 3.9 (1 μ M leptin, n=31), % 129.4 ± 4.2 (10 μ M leptin, n=29) ve % 187.5 ± 7.6 (100 μ M leptin, n=35) konsantrasyonlarının eklenmesiyle takip edildi. Protein kinaz C (PKC) inhibitörü şeletrin klorit 1 μ M leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde meydana getirdiği artışı baskılamaktadır (% 100.0 ± 0.0 'dan % 56.7 ± 6.4 'e, n=27). Hücre içi depoların tapsigarjin (TG) ile muamelesi sonrasında boşaltılmasını takiben leptin uygulandığında, leptinin meydana getirdiği artış önemli ölçüde azalmaktadır. (TG + 1 μ M leptin = 106.1 ± 2.4 %, n=18).

Bu çalışma ile ilk kez DKG hücre kültüründe leptinin $[Ca^{+2}]_i$ miktarında meydana getirdiği değişimin, periferik nosiseptif sinyalde rol oynayan PKC-

bağımlı mekanizma aracılığıyla olduğu gösterildi. Vücutta enerji dengesi üzerinde etkili olduğu bilinen leptinin, aynı zamanda ağrı algılama sürecinde de rol oynadığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Leptin, Kalsiyum Görüntüleme, Dorsal Kök Gangliyonu, Ağrı, Protein Kinaz C.

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFECTS OF LEPTIN ON INTRACELLULAR CALCIUM SIGNALS IN RAT DORSAL ROOT GANGLION NEURONS

Central and peripheral administration of leptin plays an important role in nociceptive behavior, but the cellular mechanism of this action remains unclear. This study investigate the effects of leptin on intracellular calcium, ($[Ca^{2+}]_i$) levels in isolated rat dorsal root ganglion (DRG) neurons, with the aim of exploring possible involvement of leptin-mediated signaling in peripheral nociception.

Isolated DRG neurons were loaded with 1 μ mol fura-2 AM and Ca^{2+} responses were assessed by using the fluorescent ratiometry. Fura-2 AM loaded DRG cells were excited 340 nm and 380 nm, and emission was recorded at 510 nm by using digital microscopic calcium imaging system. Changes in free intracellular calcium concentrations were determined by the change in 340 nm/380 nm ratio in individual DRG neurons. Leptin caused increase in $[Ca^{2+}]_i$ in a dose dependent manner. The mean 340 nm/380 nm ratios were (baseline 100.0 $\pm$ 0.0 % vs leptin): 104.6 $\pm$ 0.4 % (0.1 μ M leptin, n=42 cells), 119.5 $\pm$ 3.9 % (1 μ M leptin, n=31 cells), 129.4 $\pm$ 4.2 % (10 μ M leptin, n=29 cells) and 187.5 $\pm$ 7.6 % (100 μ M leptin, n=35 cells) following addition of respective concentrations of leptin. The PKC inhibitor chelerythrine chloride significantly decreased the leptin (1 μ M)-induced calcium responses (from 100.0 $\pm$ 0.0 % to 56.7 $\pm$ 6.4 %, n=27 cells). After depletion of thapsigargin-sensitive calcium stores by treatment of cells with thapsigargin (TG) attenuated but not completely blocked the subsequent calcium

responses to 1 μ M leptin (TG + 1 μ M leptin = 106.1 ± 2.4 % (n=18 cells) vs. 1 μ M leptin = 119.5 ± 3.9 (n=23 cells).

We first demonstrated that leptin mediate peripheral nociceptive signalling through mechanism that involves PKC-dependent changes in intracellular calcium levels in rat primary sensory neurons. Results from this study indicates that in addition to mediating the sensing of energy reserves in the body, leptin involved in the sensing process of pain.

Key Words: Leptin, Calcium Imaging, Dorsal Root Ganglion, Pain, Protein Kinase C.

3. GİRİŞ

Canlı organizmanın temel birimi hücredir. Tek hücreli canlılarda olduğu gibi, bir tek hücre de tamamen bağımsız yaşayabilir. Doku yapılarına giren hücreler de, tıpkı bağımsız hücreler gibi açık sistemlerdir. Hücrelerarası sıvı adı verilen ortam içinde bulunan doku ve hücreler, bu ortamdan hücre membranı ile ayrılırlar. Hücre membranının temel işlevi hücre bütünlüğünün korunmasıdır. Hücre membranları, iç ortam özelliklerinin sabit kalmasını, dış ortamdan etkilenmemesini sağlar. Hücrenin çevresi ile seçici madde alış veriş yapması, gereksinim duyulan maddelerin kolaylıkla içeriye alınması, reaksiyonlar sonucu artık ürünlerin dışarıya atılması hücre membranı aracılığı ile gerçekleşir. Biyoelektrik olaylar da hücre membranlarının bir işlevidir.

Hücre membranlarının kalınlıkları 6-10 nm arasındadır. Elektriksel bakımdan yalıtkan özelliklere sahip lipit çift tabakasının dielektrik sabiti 2 ile 3 F/m arasındadır. Hücre membranının, kalınlığının çok küçük olması yüzünden, 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ gibi çok büyük bir sığaya sahiptir. Kapasitif davranış yanında iletkenlik özelliği de gösteren membranların sızıntı direnci 10^2 - 10^5 ohm.cm² arasındadır. Membranın iki tarafı arasında 60 mV'luk bir potansiyel fark var ise membran içinde 10^7 V/m gibi oldukça yüksek şiddetli bir elektriksel alan kurulur. Bu potansiyel fark 150 mV'a çıkarıldığında dielektrik yapı bozulmakta, membrandan büyük bir akım geçmektedir (1).

Hücre dinlenim halinde iken, hücre içi ve hücre dışı ortamlar arasında bir potansiyel fark vardır. Bunun en önemli nedeni, hücre membranının sodyum (Na^+), potasyum (K^+), kalsiyum (Ca^{+2}) ve klor (Cl^-) iyonlarına gösterdiği seçici

geçirgenliktir. Bunun sonucunda bu iyonlar membranın iki tarafında farklı konsantrasyonlarda bulunurlar. Luigi Galvani'nin 1791 yılında kurbağalarda yaptığı deneylerde tanık olduğu elektriksel olayların temelinde de bu potansiyel fark yatar. Galvani'nin "hayvansal elektrik" adını verdiği biyoelektrik potansiyellerle ilgili çalışmalar, daha sonra Hodgkin ve Huxley'in mürekkep balığı dev aksonunda yaptığı çalışmalarla, uyarılabilir hücrelerdeki elektriksel olayların anlaşılmasını ve elektrofizyoloji alanında bir çığır açan patch kenetleme tekniğinin gelişmesine temel basamak teşkil etmiştir (2, 3).

3.1. Nöronlarda İstirahat Membran Potansiyeli

Membranın içinde K^+ konsantrasyonu çok yüksek, dışında ise çok düşüktür. Hücrenin içinin dışına oranla daha büyük bir K^+ konsantrasyon gradyanına sahip olması nedeniyle, K^+ iyonları hücrenin dışına doğru çok güçlü bir difüzyon eğilimi gösterir. Bu durumda, K^+ iyonları membranın dışına geçerek membranın dış yüzünü elektropozitif yapar. K^+ iyonu ile birlikte dışarıya difüze olmayan, geride kalan negatif anyonlar, membranın iç yüzünü elektronegatif yaparlar. Membranın dış yüzünün pozitif, iç yüzünün negatif olmasıyla ortaya çıkan bu yeni potansiyel fark, pozitif yüklü K^+ iyonlarının, dışarıdan içeriye doğru geçişinde etkili olur. Bu potansiyel fark 1 ms içinde, K^+ iyonlarının daha fazla dışarıya geçişini engelleyecek düzeye gelir. Bunlara ek olarak istirahat halinde K^+ 'un hücre membranından, Na^+ 'a göre 50-100 kat daha kolay geçebildiği bilinmektedir (4).

K^+ iyon konsantrasyonuna karşı Na^+ konsantrasyonu ise, membranın dışında çok yüksek iken içinde çok düşüktür. Na^+ iyonlarının içeriye doğru

difüzyonu, membranın dışı negatif, içi pozitif olacak şekilde bir membran potansiyeli yaratır. Membran potansiyeli, saniyeler içinde Na^+ iyonlarının içeriye net difüzyonunu durduracak düzeye yükselir. Böylece yarı geçirgen bir membranın iki tarafındaki iyonların konsantrasyonları arasındaki fark, uygun koşullar altında bir membran potansiyeli meydana getirir. Nernst iyon dengesi olarak ifade edilen, bir iyonun elektriksel olarak denge durumuna gelmesi ve net difüzyonu önleyecek olan potansiyel, membranın iki tarafındaki iyonların konsantrasyonu ile tayin edilir (4).

Bir iyon için denge potansiyeli, Nernst denklemi ile ifade edilir.

$$E_I = \frac{RT}{Z_I F} \ln \frac{[I_{\text{dış}}]}{[I_{\text{iç}}]}$$

E_I = I iyonu için denge potansiyeli

R = Gaz sabiti

T = Mutlak sıcaklık

F = Faraday sabiti

Z_I = I iyonunun değeri

$[I_{\text{dış}}]$ = Hücre dışındaki I konsantrasyonu

$[I_{\text{iç}}]$ = Hücre içindeki I konsantrasyonu

Tablo 3.1: Memeli kas hücresinde, Na⁺, K⁺, Cl⁻ ve Ca⁺² iyonlarının hücre içi ve hücre dışı konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlarda elde edilen elektrokimyasal denge potansiyelleri (Kaynak 1'den değiştirilerek alınmıştır).

İyon Cinsi	Konsantrasyon		Denge Potansiyeli
	Hücre Dışı (μmol/cm ³)	Hücre İçi (μmol/cm ³)	(mV)
Na ⁺	145	12	+66
K ⁺	4,1	150	-96
Ca ⁺²	1,5	10 ⁻⁴	+129
Cl ⁻	118	3,9	-90

Membran birden fazla iyonla geçirgen olduğu zaman membran potansiyeli Goldman Hodgkin-Katz denkleminde göre hesaplanır.

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_d + P_{Na} [Na^+]_d + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_d}$$

V_m = Membran potansiyeli

P_K = Potasyum iyonuna bağlı geçirgenlik

P_{Na} = Sodyum iyonuna bağlı geçirgenlik

P_{Cl} = Klor iyonuna bağlı geçirgenlik

i = İyonun iç konsantrasyonu

d = İyonun dış konsantrasyonu

3.2. Aksiyon Potansiyelinin Oluşumu

Sinir hücreleri, membran potansiyellerindeki hızlı değişimlerden oluşan aksiyon potansiyel (AP) lerini iletir. Her AP, normal sükun negatif potansiyelden pozitif membran potansiyeline ani bir değişme ile başlar ve hemen hemen aynı hızla tekrar negatif potansiyele geri döner. Bir sinir sinyalinin iletisinde AP, sinir lifi boyunca sinir ucuna gelinceye kadar yayılır. Pozitif yüklerin başlangıçta lifin içine aktığı ve sonunda tekrar dışa geri döndüğü görölmektedir. Daha sonra membran potansiyelinde, saniyenin onbinde biri gibi çok kısa sürede birbirini ardına oluşan değişimlerle AP'ler ortaya çıkmaktadır.

Dinlenim Dönemi: Bu dönem AP oluşmadan önceki membran dinlenim potansiyelini belirtir. Bu dönemde büyük bir negatif membran potansiyelinin bulunması nedeniyle membran “polarize” durumdadır.

Depolarizasyon Dönemi: Bu dönemde membran aniden Na^+ 'a karşı geçirgen hale gelerek, çok büyük miktarda pozitif yüklü Na^+ iyonunun aksonun içine alınmasına yol açar. Normalde “polarize” durum, potansiyelin hızla pozitif yönde yükselmesi ile kaybolur. Buna “depolarizasyon” denir. Kalın sinir liflerinde, membran potansiyeli genellikle sıfır düzeyini aşarak pozitif olur, fakat bazı küçük sinir lifleri ve merkezi sinir sistemindeki nöronların çoğunda potansiyel ancak sıfır düzeyine yaklaşır ve pozitif duruma geçmez.

Repolarizasyon Dönemi: Membranın Na^+ 'a geçirgenliği çok fazla arttıktan sonra, saniyenin onbinde biri gibi kısa bir sürede Na^+ kanalları kapanmaya başlar ve K^+ kanalları normaldeki haline göre daha fazla açılır. K^+ iyonlarının dışa doğru hızlı difüzyonu membranın negatif dinlenim potansiyelinin yeniden oluşmasını sağlar. Buna membranın “repolarizasyonu” adı verilir (4).

Hiperpolarizasyon Dönemi: K^+ kapılarının açılmasıyla fazla miktarda K^+ iyonu hücre dışına difüze olur. Hücre içinin dinlenim potansiyelinden daha negatif dinlenim potansiyeline geçtiği bu döneme “hiperpolarizasyon” adı verilir.

3.3. Membran İyon Kanalları

Kanalın yapısını meydana getiren integral membran proteinleri, iç çeperleri polar grup ve yüklü gruplarca kaplanmış içi su dolu bir gözenek oluşturmaktadır. Bu gözenek genellikle bir iyondan daha geniştir. Ancak sınırlı bir bölgesinde atomik boyutlara kadar daralmakta ve bu dar bölge iyon seçici bir filtre olarak davranmaktadır (5).

Kapılı kanalları oluşturan makro moleküllerin açık ve kapalı gibi iki farklı konformasyonu vardır. Bir kapının kısmen açık olması gibi bir ara durum yoktur. Kapının açılıp kapanması için gerekli konformasyon değişiklikleri, yüklü veya dipolar yapıdaki bir voltaj sensörüne etki eden elektriksel kuvvetlerle, nörotransmitter moleküllerin bağlanmasından doğan kimyasal kuvvetlerle veya bazı duyuşal sinir uçlarında gerilme ve basınç gibi mekanik kuvvetlerle yönetilirler. Buna göre de kanallar, voltaj kapılı, ligand kapılı ve mekanik kapılı olarak adlandırılırlar. Günümüzde ise moleküler biyoloji, farmakoloji ve biyofizik alanında yapılan çalışmalar çok sayıda iyon kanalı ve bu kanalların alt tiplerinin olduğunu ortaya koymuştur (1).

Kanalların seçicilikleri oldukça yüksektir ancak bir kanal, göreceli olarak zayıf da olsa, birçok farklı türden iyonu geçirebilmektedir. Uyarının yayılması ile ilgili olan en önemli kanallar Na^+ , K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} kanallarıdır. Bir membranda aynı tür iyonla geçirgen farklı özelliklerde kanallar bulunabilmektedir. Bir nöronun

farklı bölgelerinde kanal dağılımı farklılıklar gösterir. Böylece nöronun farklı bölgeleri farklı işlevler üstlenebilmektedir. Örneğin; Ca^{+2} kanalları sinir son uçlarında çok yoğundur ve bu kanallardan içeri Ca^{+2} girişi ile transmitter madde salınır.

Günümüzde kanalların işlevlerinin incelenmesinde “patch” kenetleme adı verilen yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tekniği geliştirenlerin öncülerinden Erwin Neher ve Bert Sakmann’a 1991 Nobel Tıp ve Fizyoloji Ödülü verilmiştir.

3.3.1. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları

Voltaj kapılı sodyum kanallarının (VKSK) aktivasyonu, tüm nöronların uyarılabilirliği ve iletkenliği için çok önemlidir. VKSK iletkenliği, AP’nin geçici olarak depolarizasyonuna neden olmaktadır. Bu kanallar, α (260 kDa) (Nav1.1-Nav1.9) ve β alt ünitelerinden (33- 45 kDa) (β_1 , β_{1A} , β_2 ve β_3) meydana gelmiştir (6, 7, 8, 9). Önemli fonksiyonları olduğu bilinen, α alt ünitesinin 9 izoformu bulunmaktadır. β alt ünitesi ve diğer sitozolik kanal çiftleri, hücre membranında kanalların açılmasını ve kanalların biyofiziksel özelliklerini düzenlemektedir.

Farmakolojik ve biyofiziksel özelliklerine göre Na^+ kanalları, hızlı tetrodotoksine duyarlı Na^+ kanalları ve yavaş tetrodotoksine duyarlı Na^+ kanalları olmak üzere iki sınıfa ayrılır (10, 11). Na^+ kanalları, istirahat halinde inaktif ve kapalı durumdadırlar. Geçici kanal açılışı, konsantrasyon gradiyentinin düşüşüyle Na^+ iyonlarının akışına izin verir. Böylece, AP oluşumu için eşige yakın olan depolarize nöronlar, içe doğru transmembran akımını oluştururlar. Bazı kanallar,

açılışından birkaç milisaniye sonra hızlıca inaktive olurlar ve böylece konformasyon değişimlerinin inaktivasyonunu geri kazanırlar (12, 13).

Duyusal nöronlarda VKSK, hasarlı bir dokudan periferel sinirlere doğru ortaya çıkan kronik ağrılı nöropatide direk olarak önemli rol oynamaktadır. Bu kanalların antikonvülzanlar, antiaritmikler ve lokal anestezikleri içeren blokörleri nöropatik ağrının tedavisinde etkilidir (13). Nöropatik ağrının altında yatan mekanizmanın araştırılması için VKSK önemli rol oynamaktadır (11).

3.3.2. Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları

Voltaj kapılı potasyum kanalları (VKPK), uyarılabilir (nöronlar ve kalp kası vb.) dokularda AP frekansını regüle etmede ve AP'leri şekillendirmede önemli rol oynamaktadırlar. Presinaptik VKPK, beynin tamamından hem eksitator hem de inhibitör nörotransmitter salınımını düzenler (14).

VKPK, K^+ iyonlarının akışına izin vermesiyle birlikte uyarılabilir hücrelerde repolarizasyona neden olmaktadır (12, 15). VKPK'nın α alt üniteleri, polipeptidden meydana gelmiştir. Her bir polipeptid, 6 transmembran heliks yapıya sahiptir (S1-S6). S5-S6 bölgeleri arasındaki iki ilave bileşen kanalın gözenek bölgesini oluşturur (16, 17, 18). S4 bölgesi ise pozitif yüklüdür ve önemli voltaj sensörü olarak etki etmektedir. S4 dışarı doğru etki ettiği zaman plazma membranı, konformasyon değişimlerine uğrar. S5-S6 ise heliks ve depolarize duruma gelir. Bu nedenle, kapının açılışı ile K^+ iyonları dışarı çıkmaktadır. (16, 17, 18).

Moleküler olarak incelendiğinde α_{1-9} (19, 20, 21, 22, 23) ve β_{1-4} (23) alt birimleri bulunan VKPK, gecikmiş-doğrultucu K^+ kanalları, içeriye yönelik K^+

kanalları, hızlı geçici A tipi K^+ kanalları (K_A) (24, 25, 26, 27), yavaş aktive olan K^+ kanalları, ATP'ye duyarlı K^+ kanalları (K_{ATP}) ve Ca^{+2} ile aktive olan K^+ kanalları şeklinde sınıflandırılmıştır (27, 28). Gecikmiş doğrultucu tipteki kanallar, blokörlerden tetraetilamonyuma duyarlı iken K_A kanalları 4-aminopiridine daha duyarlıdır (27, 29). Gecikmiş doğrultucu ve K_A kanallarının birlikte bulunduğu membranlarda, sabit depolarize edici bir puls akımına çoklu ateşlemeli aksiyon potansiyeli şeklinde yanıtların oluştuğu gösterilmiştir (27, 30). K_{ATP} 'nin, pankreas β hücrelerinde varlığı tespit edilmiştir. Bu kanallar, insülin sekresyonunda rol oynar ve böylece glukoz homeostazisinde çok önemli role sahiptir (31). K_{ATP} , hücrel metabolik değişimlere karşı yanıt oluştururlar. Bu kanallar, ATP ve sulfonilüreler tarafından inhibe edilirler. (32, 33). Ca^{+2} ile aktive edilen K^+ kanalları ise, 2 şekilde tanımlanmıştır. Bunlar; büyük iletkenliğe sahip olan Ca^{+2} ile aktive edilen K^+ kanalları ve küçük iletkenliğe sahip olan Ca^{+2} ile aktive edilen K^+ kanallarıdır. Bu kanalların her ikisi de, homotetramer yapıya sahiptir ve Ca^{+2} 'a duyarlı olan intrasellüler sekans geliştirmişlerdir (34).

3.3.3. Klor Kanalları

Canlılarda bol miktarda bulunan Cl^- iyonlarının zarın iki tarafındaki dağılımı dengededir. Çok farklı tipleri saptanmış Cl^- kanallarının bilinen en önemli işlevi membran potansiyelini stabilize etmektir (1). Bu kanallar, plazma membranında ve çoğu dokunun hücre içi organellerinde bulunmaktadır (35). Cl^- kanalları için yüksek affiniteli ve selektif antagonist çok azdır. Bilinen en selektif ve güçlü antagonistler arasında niflumik asit, 5-nitro-2-benzoat (36), akrep venomunda izole edilen klorotoksin, sezyum ve rubidyum yer almaktadır (1). Cl^-

kanalları memelilerde 9 gen tarafından kodlanmaktadır (35). Çeşitli sinir dokularında üç farklı tipte Cl^- kanalı bulunmuştur. Ligand kapılı Cl^- kanalları (37), voltaj bağımlı Cl^- kanalları (38), Ca^{+2} ile aktive olan Cl^- kanallarıdır (39).

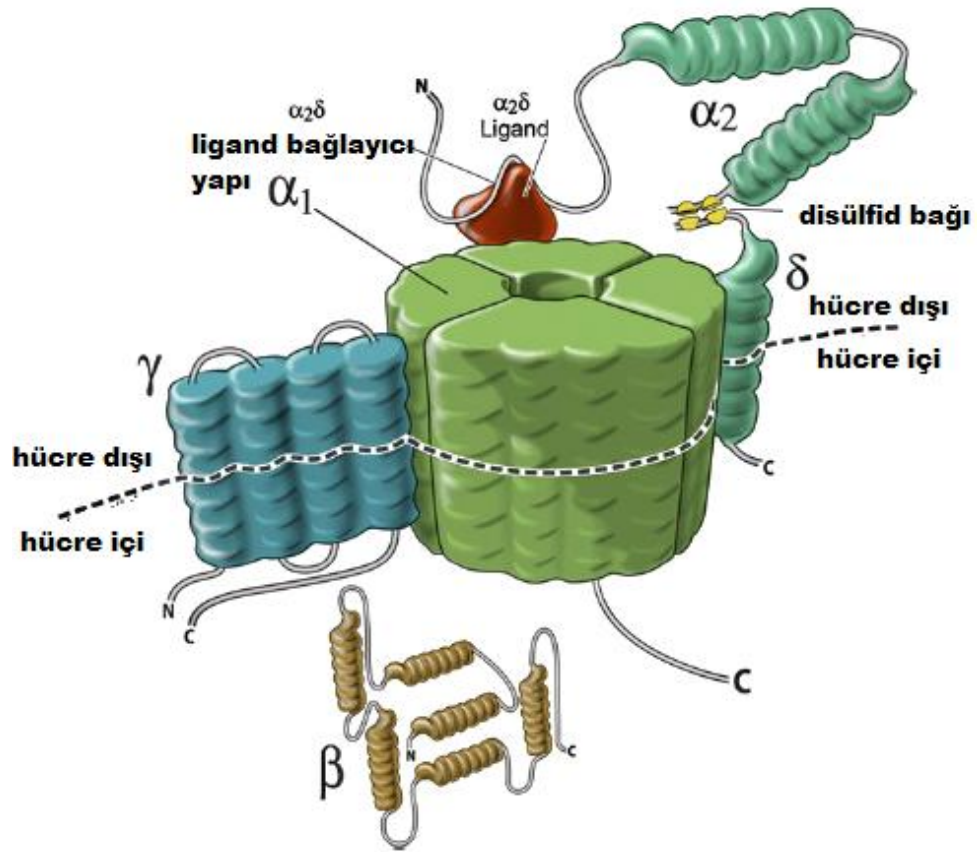
3.3.4. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları

Voltaj kapılı kalsiyum kanalları (VKKK), nöronlarda hücre içine Ca^{+2} girişinin temel düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. Ca^{+2} iyonu çeşitli yollarla hücreye girdikten sonra birçok sahada ikincil mesajcı gibi davranır. Ca^{+2} , kas kontraksiyonunu, nörotransmitter salınımını ve gen ekspresyonunu düzenleme gibi birçok fonksiyonda görev alır. Aşırı hücre içi kalsiyum ($[\text{Ca}^{+2}]_i$) artışı da, nöronal hasara yol açmaktadır. (40, 41). Ca^{+2} düzeyindeki artış, voltaj veya ligand bağımlı Ca^{+2} kanalları aracılığı ile hücre dışından Ca^{+2} girişi ya da hücre içi depolardan (inozitol 1, 4, 5 trifosfat (IP_3) ve ryanodin reseptörü/kalsiyum salıverilme kanalı) Ca^{+2} salıverilmesi ile gerçekleşir.

VKKK'nın, biyofiziksel, farmakolojik ve moleküler olarak 3 ayrı sınıflandırılması yapılmıştır. VKKK moleküler olarak; α_1 , β , γ ve $\alpha_2\delta$ alt birimlerden oluşmaktadır (42, 43, 44) (Şekil 3.1). 190-250 kDa ağırlığındaki α_1 alt ünitesi, geniş bir alt birimdir. α_1 alt ünitesi, ikincil haberciler ile kanal regülasyonunu düzenlemede (45) ve kalsiyum geçiren gözenekleri şekillendirmede görev alır (44, 46). α_1 alt ünitesi, yaklaşık 2000 aminoasitin oluşturduğu 4 homolog bölgeden (I-IV) meydana gelmiştir. α_1 alt ünitesi, 6 transmembran bölgeden oluşan heliks (S1-S6) bir yapıya sahiptir. 10 tane gözenek oluşturuca α_1 alt birimi tanımlanmıştır ve 3 alt sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar; farmakolojik karakterlerine ve α_1 alt ünitesinin yapısal benzerliklerine dayanan

Ca_v1 (L-tipi), Ca_v2 (N, P/Q, R tipi) ve Ca_v3 (T-tipi) olarak tanımlanmaktadır (47). Na⁺, K⁺ ve Ca⁺² kanallarının alt üniteleriyle ilgili yapısal ve fonksiyonel çalışmalar, bu kanalların fonksiyonlarının tanımlanmasına yol göstermektedir (45, 48). S5 ve S6 transmembran segmentleri, P düğümü arasındaki por modülasyonunu sağlamaktadır. S1 ve S4 segmentleri ise voltaj sensörü olarak görev yapmaktadır (45).

İntrasellüler β alt ünitesi, 50-65 kDa ağırlığında hidrofilik bir proteindir. α_2 ve δ alt ünitelerinin disülfid bağı ile birleşmesi sonucu meydana gelen $\alpha_2\delta$ alt ünitesi, tek gen tarafından kodlanır. 4 transmembran segmente sahip γ alt ünitesi ise iskelet kasında, Ca⁺² kanallarının tamamlayıcı bir parçasıdır. Ca⁺² kanallarının yardımcı alt üniteleri, kanal fonksiyonları üzerinde önemli görevlere sahiptirler (45, 49, 50). VKKK'nın β alt üniteleri, α_1 alt ünitelerinin hücre yüzeyindeki ekspresyonunu etkilemekte ve bunların kinetik yapılarını büyük ölçüde artırmaktadırlar. $\alpha_2\delta$ alt üniteleri, α_1 alt ünitelerinin hücre yüzey ekspresyonlarını artırmaktadır ve voltaj bağımlı kapılar üzerindeki etkileri kalıcı değildir (45, 51).



Şekil 3. 1: Kalsiyum kanal alt tipleri. Voltaja duyarlı kalsiyum kanalları 4 alt birimden oluşmuştur. α_1 alt birimi birbirine benzer 4 alandan oluşmuştur ki her biri 6 transmembran segment içerir. β alt birimi intrasellülerdir. γ alt biriminin 4 transmembran segmenti vardır. δ alt biriminin 1 tane transmembran segmenti vardır ve disülfid bağ ile ekstraselüler α_2 alt birimine bağlıdır (Kaynak 40'dan değiştirilerek alınmıştır).

VKKK biyofiziksel olarak; L, P/Q, N, R ve T tipi olarak sınıflandırılmışlardır. Bunlar; voltaj aktivasyonu, kanal iletkenliği, spesifik blokörlere duyarlılık gibi durumlarda özellik bakımından farklılık gösterirler (40, 42) (Tablo 3.2).

3.3.4.1. L tipi kalsiyum kanalları

L tipi VKKK, uyarılabilir hücrelerde kalsiyum girişini regüle eden çok sayıda alt birime sahiptir (52) ve kalp kası, iskelet kası ve sinir hücrelerinde bulunurlar (40). L tipi VKKK, $Ca_v1.1$ (α_{1s}), $Ca_v1.2$ (α_{1c}), $Ca_v1.3$ (α_{1D}) ve $Ca_v1.4$

(α_{1F}) alt birimlerinden meydana gelmiştir (45, 46). $Ca_v1.1$ (α_{1S}), $Ca_v1.2$ (α_{1C}), $Ca_v1.3$ (α_{1D}) alt birimleri, kalp kasında Ca^{+2} regülasyonunda çok önemli fonksiyonlara sahiptir. Kas kontraksiyonunun 2 membran proteini arasındaki etkileşimi, L tipi VKKK ve ryanodin reseptörlerinin hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırması ile meydana gelmektedir (53).

Nöronlarda bulunan L tipi VKKK akımları, nöronal fonksiyonların büyük bir kısmına katkı sağlar. L tipi VKKK, nörotransmitter salınımında, hücre içi fonksiyonlar için gereksinim duyulan Ca^{+2} 'nın sağlanmasında ve Ca^{+2} ile aktive edilen K^+ kanallarının regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Ca_v1 kanalları yüksek eşikte aktive olan kanallar olarak bilinirken, $Ca_v1.3$ ve $Ca_v1.4$ kanalları düşük eşikte aktive olmaktadır (54, 55). L tipi VKKK, hücresel ağrı modeli olan dorsal kök gangliyon (DKG) hücrelerinde ilk keşfedilen Ca^{+2} kanalıdır. $Ca_v1.2$ ve $Ca_v1.3$ alt tipleri de DKG'de yoğun olarak bulunmaktadır (56, 57).

3.3.4.2. N tipi kalsiyum kanalları

N tipi kalsiyum kanalları, nöronların presinaptik sinir terminallerinden transmitter salınması işlevini yürütürler (47, 58). N tipi kalsiyum kanal aktivasyonu, kalsiyum girişine ve nörotransmitter salınımına neden olur ki bu durum sensör eksitabilitesinde değişikliğe ve büyük olasılıkla da ağrı algılamasında değişikliğe yol açar (40, 59, 60). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından 2004 yılında onay alan, N tipi kalsiyum kanal blokörü olan zikonotidin intratekal uygulanması özellikle kanser hastalarında ağrı kesici olarak kullanılmaktadır. (40, 61, 62, 63). Zikonotidin intratekal uygulanmasıyla, sinir hasarı meydana gelmiş farelerde de ağrı yanıtının azaldığı gözlenmiştir (40, 64,

65). N tipi VKKK blokörleri, P maddesinin salınımını azaltmaktadır (40, 66, 67). P maddesinin salınımı ise nöronal hipereksitabiliteyi meydana getirmektedir (40, 68, 69, 70).

3.3.4.3. P/Q tipi kalsiyum kanalları

Güçlü depolarizasyonla aktive olan P tipi kalsiyum kanalları, serebellar purkinje hücrelerinde tanımlanmıştır (71) ve α_{1A} , $\alpha_2\delta$ ve β_{4A} alt birimlerinden oluşmaktadırlar. P tipi kalsiyum kanalları, transmitter salınımından sorumludurlar ve ω -agotoksin IVA ile baskılanırlar (45, 58, 72). P/Q tipi VKKK nakavt farelerde nosiseptif uyarıcılara duyarlılık azaldığı gözlenmiştir (73).

3.3.4.4. R tipi kalsiyum kanalları

Yapılan ilk çalışmalarda R tipi Ca^{+2} kanalları rezistans olarak tanımlanmıştır. R tipi Ca^{+2} kanalları, yüksek eşığe sahip olduklarından ancak güçlü depolarizasyonla aktive olurlar. Bu kanallar, α_{1E} , $\alpha_2\delta$ ve β_{1B} alt birimlerinden oluşurlar (47, 72, 74, 75, 76). R tipi Ca^{+2} kanalları transmitter salınımında sorumludurlar. Ayrıca hipokampal nöronların ateşlemesine ve depolarize edici ard potansiyelin oluşumuna da katkıda bulunurlar (77, 78).

R tipi VKKK, omuriliğin dorsal kök kısmını kapsayan tüm sinir sisteminde bulunur (79). R tipi VKKK'nın, spinal ve supraspinal seviyede hem nosiseptif hemde antinoseptif ağrıyı azaltmış olabileceği düşünülmektedir (40, 80). Ağrı ile ilgili çalışmalarda, R tipi VKKK blokörü olan *Hysteroctrates gigas* venomlarından elde edilmiş SNX-482 kullanılmaktadır (40, 81, 82).

3.3.4.5. T tipi kalsiyum kanalları

T tipi kalsiyum kanalları membran dinlenim potansiyeline yakın depolarizasyonlarla aktive olan düşük eşikçe sahip kanallardır. T tipi VKKK, kalp kası, düz kas, DKG hücre gövdesinde ve serbest sinir uçlarında bulunur (40, 83). Düşük voltajla aktive olan T tipi kalsiyum kanalları, istirahat potansiyeline yakın negatif membran potansiyellerinde aktifleşirler. Bu kanallar, repolarizasyon aktivitesine ve uyarılabilirliğe katkıda bulunarak AP için eşikçe düşürebilirler (40, 84, 85). T tipi VKKK'nin, α_1 alt birimlerine göre 3 alt türü tanımlanmıştır. Bunlar; $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ ve $Ca_v3.3$ tür (86).

T tipi VKKK inhibitörlerinin özel seçici bir alt türleri yoktur. T tipi VKKK blokörlerinden etosuksimid, mibefradil ve (3 β , 5 α , 17 β)-17- hidroksiedtran-3-karbonitril (ECN), hayvan ağrı modellerinde ağrı yanıtını azalttığı gözlenmiştir (40, 86, 87, 88). Talamustaki T tipi VKKK'nin, pacemaker aktivitesini de azalttığı düşünülmektedir (40, 89).

Tablo 3.2: Kalsiyum Kanal Sınıflandırılması (Kaynak 47'den değiştirilerek alınmıştır).

Sınıflandırma	Biyofiziksel veya Farmakolojik tanımlama	Aktivasyon özellği	Bulunduğu Bölge	Özellikler
Ca_v1.1; α_{1S}	L	YVA	İskelet kası	Dihidropiridin
Ca_v1.2; α_{1C}	L	YVA	Kalp, düz kas, akciğer, merkezi sinir sistemi	Dihidropiridin
Ca_v1.3; α_{1D}	L	Orta voltajla aktive	Merkezi sinir sistemi sinoatrial düğüm, endokrin dokular	Dihidropiridin
Ca_v1.4; α_{1F}	L	Orta voltajla aktive	Retina	
Ca_v2.1; α_{1A}	P/Q	YVA	Merkezi sinir sistemi	ω -agatoksin IVA
Ca_v2.2; α_{1B}	N	YVA	Merkezi sinir sistemi, periferel nöronlar, nöromusküler kavşak	ω -konotoksin GVIA, zikonotid ve TROX 1
Ca_v2.3; α_{1E}	R	YVA	Merkezi sinir sistemi, kalp	SNX- 482
Ca_v3.1; α_{1G}	T	DVA	Merkezi sinir sistemi, kalp	Mibefradil, etosüksimit ve ECN
Ca_v3.2; α_{1H}	T	DVA	Kalp, böbrek, karaciğer, merkezi sinir sistemi	
Ca_v3.3; α_{1I}	T	DVA	Merkezi sinir sistemi	

3.3.5. TRP Kanalları

Transient (geçici) reseptör potansiyel (TRP) kanalları ilk olarak 1998 yılında *Drosophila* türü sirke sineklerinin göz hücrelerinde bulunmuştur (90, 91, 92, 93). Genetik araştırmalar sonucunda TRP kanallarının 7 alt tipi tespit edilmiştir. Bu alt tipler; A) TRP cononcial (TRPC) 7 farklı alt tipi, B) TRP

vaniloid (TRPV) 6 farklı alt tipi, C) TRP polisistin (TRPP) 3 farklı alt tipi, D) TRP mukolipin (ML) 3 farklı alt tipi, E) TRP ankyrin (TRPA) 1 alt tipi, F) TRPN, TRP melastatin (TRPM) 8 farklı alt tipi vardır (90, 94, 95, 96, 97, 98, 99).

Bütün TRPC kanalları aynı ya da farklı akım özellikleriyle heterotetramerler olarak görev yapan seçici olmayan Ca^{+2} geçirgen katyon kanallarıdır (100). Kendi içinde 7 farklı alt gruba ayrılmıştır (101). TRPV kanalları, katyonlar için seçici olmayan ve Ca^{+2} 'ya geçirgen olan polimodal ısı ve kemosenitif kanallardır (102). TRPM kanalları, Ca^{+2} ve Mg^{+2} arasında oldukça değişken geçirgenlikler gösterir (103). TRPML kanalları, seçici olmayan katyon kanalıdır ve $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ile aktive olmaktadır (101). TRPP kanalları, seçici olmayan katyon kanalıdır ve $[\text{Ca}^{+2}]_i$ artışı ile aktive olur (101). TRPA kanalları ise, seçici olmayan katyon kanallarıdır ve $[\text{Ca}^{+2}]_i$ artışı ile aktive olmaktadır. Bu iyon kanallarının çoğunluğu Na^+ ve Ca^{+2} 'ya aynı anda geçirgen yani tek bir iyon kanalına seçici olmayan iyon kanallarıdır.

Sonuç olarak biyolojik mekanizmalara ilişkin birbirinden bağımsız yapılan çok sayıdaki çalışma TRP ailesinin varlığını ortaya koymuştur (95). TRP kanallarının, çevresel uyarılardaki değişiklikleri ayrımsal olarak belirleyen evrensel biyolojik sensörler oldukları düşünülmektedir. TRP kanalları sıcak/soğuk, doğal ve kimyasal bileşikler (mentol, kafur, acı biber), mekanik uyarılar, lipid tabakanın içeriğindeki değişiklikler gibi birçok uyarı ile açılmaktadır. TRP kanalları kan basıncı ve düz kas tonusunun düzenlenmesinde, renal $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ kontrolünde, keskin tad ve kokulu bileşiklerin (hardal, sarımsak gibi), mekanik değişikliklerin, ağrının, ısının, tadın, kokunun, sesin, feromonların ve ışığın algılanması gibi önemli birçok süreçte işlev görmektedir (94, 104).

3.3.6. Aside Duyarlı İyon Kanalları

Aside duyarlı iyon kanalları (ADİK), voltaja bağımsız, dejenere/epitel Na⁺ kanal ailesine ait bir protein olduğu sanılan ve amiloride duyarlı kanallardır (105, 106). Bu kanallar ekstrasellüler pH seviyesindeki değişikliklerle (pH=7.4 ile 4) açılıp kapanmaktadırlar. ADİK, sadece pH'nın hızla azalması sonucu aktive olurlar ve bu kanallar asidik pH'nın sürekliliğinde duyarsızlaşırlar (106, 107, 108).

Bugüne kadar, ADİK'nın 7 alt ünitesi belirlenmiştir. Bunlar; 1a, 1b1, 1b2, 2a, 2b, 3 ve 4 dir ve bunlar 4 gen tarafından kodlanmışlardır (109, 110). ADİK, vasküler düz kas hücreleri (111) ve kemik (112) gibi nöronal olmayan dokularda bulunmaktadır. Homomerik olan ADİK1a, kalsiyuma geçirgenlik gösterirken, diğer homomerik ve heteromerik olan ADİK ise kalsiyuma geçirgen değildir (109, 113, 114, 115). Her ADİK alt ünitesi, 2 transmembran bölge (TM1 ve TM2) içerir. Bu bölgelerden TM2 bölgesi, bu kanalların iyon geçirgenliği için çok önemlidir (108, 110, 116). Periferal duyuşal nöronlarda ADİK'nın temel fonksiyonları, nosisepsiyonu (117, 118, 119, 120, 121, 122, 123) ve ağrıdaki mekanik duyarlılığı (124, 125, 126) sağlamaktır. ADİK, tat iletiminde de rol oynamaktadır (127, 128, 129). ADİK1a ve ADİK3, yüksek duyarlıklı ağrı sinyallerinin tonik inhibisyonunda rol oynarlar. ADİK3 miyelinsiz küçük çaplı peptiderjik nosiseptörler ve büyük çaplı mekanoreseptörlerin yanı sıra duyuşal sinir terminallerinde ve serbest sinir uçlarında da bulunmaktadır (130, 131). ADİK2a ise retinal bütünlüğün korunması (132), baroreseptör duyarlılığı (133) ve nöronların işlevlerinin yerine getirilmesi için gereklidirler (134). Kalsiyum

geçirgenliğine sahip ADİK1a'nın sensitizasyonu, asidozun meydana getirdiği nöronlarda hasara neden olmaktadır (113, 135, 136, 137, 138).

3.4.Leptin

1994 yılında Zhang ve ekibi tarafından keşfedilen leptin 16 kDa ağırlığa sahip polipeptid bir hormondur (139). İlk keşfedildiğinde önemli ölçüde adipoz dokudan sekrete edildiği düşünülen leptinin yapılan çalışmalarla; plesanta, iskelet kası, mide, memeli epitel hücreleri ve ön hipofizden de sentezlendiği bulunmuştur (140). Leptin; gıda alımının düzenlenmesi (141), enerji harcanması (142), cinsel gelişim, enerji tüketimi, vücut ağırlığının hemostazisi (143, 144), üreme fonksiyonu (144, 145) ve nöroendokrin cevaplarında (144, 146) yer aldığı önemli fizyolojik olaylarda rol oynar. Leptin reseptörleri (OB-R) koroid pleksus, hipotalamus, akciğerler ve böbrek dokularında tespit edilmiştir (147, 148). Üstelik pekçok farklı türde sıçan (149), fare (149), domuz (150), koyun (151) ve insan (151) hipofizinde leptin reseptörü belirlenmiştir (144). Aynı zamanda Chen ve arkadaşları da sıçan DKG nöronlarında OB-R'nin varlığını ortaya koymuşlardır (148).

Yağ dokusunun miktarı arttığında, yağ hücreleri leptin yapımını artırır, kana geçen leptin beyne gider, kan-beyin bariyerini kolaylaştırılmış difüzyonla geçer ve hipotalamusta çeşitli bölgelerde özellikle arkuat ve paraventriküler çekirdeklerin pro-opiomelanokortin (POMC) nöronlarında OB-R'ye bağlanır. Bu hipotalamik çekirdeklerde OB-R'nin uyarılması yağ depolanmasını azaltan çeşitli etkileri başlatır. Bunlar: 1- hipotalamusta nöropeptit Y (NPY) ve aguti ilişkili protein (AGRP), gibi iştah uyarıcılarının yapımının azalması, 2- α -melanosit

uyarıcı hormonun salıverilmesi ve melanokortin reseptörlerinin aktifleşmesine yol açan POMC nöronlarının aktive edilmesi, 3- hipotalamusta kortikotropin-serbestleştirici hormon gibi maddelerin yapımının artması, 4- metabolizma hızını ve enerji tüketimini arttıran sempatik sinir aktivitesinin artması (hipotalamustan vazomotor merkeze uzanan sinir yolları aracılığıyla) 5- pankreas hücrelerinden insülin salgılanmasının azalması sonucu enerji depolanmasının azalması. Böylece leptin, yağ dokusunda yeterli düzeyde enerji depolandığını ve daha fazla besin almaya gerek olmadığını beyne bildiren önemli bir sinyal olabilir (4, 152, 153, 154, 155). Leptin eksiklik modeli oluşturulmuş olan (ob/ob) farelerin, diyabet ve obeziteyle meydana gelmiş periferik nöropati için yeni bir hayvan ağırlık modeli oluşturabileceği gösterilmiştir (86, 156). Leptin ilk keşif edildiğinde doygunluk hormonu olarak düşünülmüştür. Ancak insanlarda yapılan *in vivo* çalışmalarda insülinin leptin konsantrasyonunun yükselmesinde akut bir etkisinin olmadığı ancak kronik etkisi olduğu belirlenmiştir (86, 157, 158). Ob/ob farelerde meydana gelen diyabetik nöropati durumu, leptin ve nörotransmisyon arasındaki etkileşimin ortaya konulması yönünde büyük önem arz etmektedir.

OB-R izoformları üç gruba ayrılır. Bunlar: uzun, kısa ve çözünebilir izoformlardır. Uzun izoform (OB-Rb) leptin sinyallerini ileten reseptördür. OB-Rb, özellikle hipotalamus, monositler, lenfositler, pankreas β hücreleri ve endotelial düz kas hücrelerinde varlığı tespit edilmiştir. Kısa izoformun (OB-Ra) fonksiyonu tam olarak bilinmese de leptinin kan beyin bariyerinden geçmesinde rol oynadığı varsayılmaktadır. Çözünebilir izoform (sOB-R) ise bir leptin taşıyıcı protein olup kanda biyolojik olarak aktif leptinin görevini yerine getirmektedir (159). Santral sinir sistemi ve periferik bölgelerdeki leptin reseptörleri, reproduktif

sistemin fonksiyonlarında, osteogenezde, ağrı eşiğinde, santral sinir sisteminin gelişiminde, hafızada, hemotopoezde, immün sistemde ve diğer birçok fonksiyonda önemli etkilere aracılık ederler (160, 161, 162, 163, 164, 165, 166).

3.5. Ağrı

Ağrı çok faktörlü kompleks bir olgudur ve yıllar boyunca bilim insanları tarafından yapılan değişik tanımlardan sonra günümüzde, Uluslararası Ağrı Araştırma Derneği tarafından yapılmış olan tanım en fazla kabul gören ağrı tanımı olmuştur. Uluslararası Ağrı Araştırma Derneği'ne göre ağrı, “gerçek veya potansiyel doku hasarıyla ilişkili, duyusal ve emosyonel hoş olmayan oldukça subjektif bir deneyimdir” (167). Bu tanıma göre ağrı, sensoryal ve emosyonel bileşenlerden meydana gelmektedir. Bu bileşenler ağrının şiddet, süre ve yerleşim olarak algılanmasını ve nahoşluk hissinin algılanmasında farkındalık sağlar (168). Çok bileşenli ve kişinin deneyimleri ile ilgili bir olgu olan ağrının başlaması, algılanması, iletimi ve ağrıya karşı verilen cevap bir dizi karmaşık mekanizmalar sonucu gelişir. Ağrı, karmaşık bir olgu olmasına rağmen, sinirlerle kaplı vücut yüzeyinde ve iç organlarda, duyusal sinirlerdeki elektriksel aktiviteye dayanan periferik bir kökene sahiptir (13).

Ağrı, somatik (kas iskelet), visseral (toraks, abdomen, pelvis), sinir ve sempatik kökenli ağrı şeklinde sınıflandırılabilir gibi; nosiseptif (somatik ve visseral) ve nosiseptif olmayan (nöropatik ve semöpatik kökenli) ağrı olmak üzere çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır. Ağrı oluşum mekanizması düşünüldüğünde, nosiseptif, nöropatik ve üçüncü tip olarak da psikojenik ağrı düşünülebilir.

Doku hasarı, beyine ağrı sinyallerinin gitmesini sağlayan sinyalleri başlatan kimyasalların salıverilmesine yol açar. Bu sinyaller, nosiseptörler olarak adlandırılan ve medulla spinaliste dorsal boynuz nöronları ile sinaps yapan ince az miyelinli (A δ) ve miyelinsiz (C) grubu liflerle elektriksel formda taşınırlar (169, 170).

3.5.1. Ağrı Sinyallerinin İletimi

Ağrı duyusunun duyu organları, vücudun hemen her noktasında bulunan çıplak sinir uçlarıdır. Ağrı, merkezi sinir sistemine DKG nöronları ile taşınır (171) ve ağrı sinyalleri, merkezi sinir sistemine iki ayrı yolla iletilir. Bunlar: hızlı-keskin ağrı yolu ve yavaş kronik ağrı yoludur. Hızlı ağrı sinyalleri, ya mekanik ya da termal ağrı uyaranları ile oluşturulur; bunlar periferik sinirler içinde, ince A δ tipi liflerle medulla spinalise taşınır. Yavaş kronik tip ağrı ise kimyasal uyaranların yanı sıra mekanik ve termal uyaranlarla da oluşturulabilir. Bunlar da C tipi liflerle omuriliğe taşınırlar. Ağrı inervasyonundaki bu ikili sistem nedeni ile ani bir ağrı uyaranı “ikili” bir ağrı hissi oluşturur. A δ lifleri ile beyne iletilen hızlı keskin ağrıyı, 1 saniye kadar sonra, C lifleri ile iletilen yavaş bir ağrı izler. Keskin ağrı hızla kişiyi uyarır ve zarar veren uyarandan uzaklaşmasını sağlar. Diğer taraftan yavaş ağrı ise zaman geçtikçe ızdırap verici hale gelir ve kişi ağrının nedenini ortadan kaldırmak için çabalamaya devam eder. Ağrı lifleri arka spinal kökler içinde omuriliğe girerek arka boynuzlardaki nöronlarda sonlanırlar (4).

3.6. Dorsal Kök Gangliyonu Nöronlarının Sınıflandırılması ve Özellikleri

DKG, merkezi sinir sistemi dışında sinir hücre gövdelerinin kümелendiği etrafı bağ dokusu kapsülle sarılı ovoid şekilli yapılardır. Hücreleri primer duyuşal nöronlar olup, nöronların somatosensoryal yolakla oluşturdukları zincirin ilk halkasını teşkil ederler. DKG nöronları, Na⁺ kanalları (172, 173, 174) gibi ağrı ile alakalı hücreşel yapıları selektif olarak eksprese ederler. DKG nöronları uyarıldıklarında AP'yi ateşleyerek mesajı beyine iletirler. Bu nöronlar, AP ile somatosensoryel bilgiyi merkezi sinir sistemine taşımaktadır. Bu nöronların iki temel tipi bulunmaktadır. Birincisi non-nosiseptif nöronlardır. Bunlar ağrı oluşturmayan uyarana cevap oluştururlar. İkincisi nosiseptif nöronlardır ki bunlar da ağrı oluşturan uyarana karşı cevap oluştururlar (175).

DKG, iletim hızlarına ve çap boyutuna göre iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma A δ ve C lifi afferentlerinde aksonal ileti hızı ile nöron çapı arasındaki ilişkiyi esas alan Harper ve Lawson 'un bu konudaki öncül çalışmaları esas alınmaktadır (176). İletim hızına göre C, A δ , A α , A β şeklinde sınıflandırılmaktadır (175). Bunların iletim hızları; A α 30-55 m/s, A β 14-30 m/s, A δ 2.2-8 m/s ve C 0.5-2 m/s şeklindedir (174, 176, 177). Bunlardan, A α ve A β lifleri kas ve iskelet mekanoreseptörlerden, A β ve A δ lifleri deri ve deri altı mekanoreseptörlerden, A δ ve C lifleri ise nosiseptörlerden sorumludurlar (174). Çap boyutlarına göre de DKG nöronları, büyük çapa sahip (>50 μ m çap), orta büyüklükte çapa sahip (30-50 μ m çap) ve küçük çapa sahip (<30 μ m çap) olmak üzere üç alt sınıfa ayrılmaktadır (177). Miyelinsiz C lifleri küçük çaplı hücre gövdesine sahip nöronlardan köken alırken, miyelinli A α ve A β lifleri büyük çaplı

hücre gövdesine sahip nöronlardan köken alırlar. A δ lifleri, orta ve küçük çaplı hücre gövdesine sahip nöronlardan köken alırlar. A δ lifleri, nosisepsiyonun (mekanosensitif ya da mekanotermal) baştaki uyarısını iletirken, C lifleri ise çok az yoğunluktaki nosiseptif algıyı iletir (178).

Küçük çaplı DKG nöronlarının aksonları genelde miyelinsiz C lifleridir. A α ve A β sinyalleri genelde proprioseptif sinyalleri taşırlar. Orta ve büyük çaptaki DKG hücreleri miyelinli aksonlara sahip olup düşük eşikli mekanoreseptörlerden bilgi taşırlar (178, 179). Küçük çaplı DKG nöronları genelde ağrı, kaşınma ve yanma duyularına ait bilgileri iletirler. Orta ve büyük çaptaki DKG hücreleri proprioseptif sinyalleri taşırlar.

Algıyla ilgili uyarıları tesbit eden nöronlar DKG içerisinde bulunmaktadır. Burada, nöronal hücreler vertebral kolonla birlikte spinal kolonun yan tarafına gömülmüştür (174). DKG nöronları, kimyasal, mekanik ve termal uyarıları beynin ilgili bölgelerine iletirler (178, 180, 181). Bu uyarılar nöronal özgünlüğe göre alt sınıflara ayrılabilir. Örneğin, termal duyuyu taşıyan DKG liflerinin bazıları 32 °C ve 43 °C arasındaki sıcaklıkları hissederler ve aktivasyonları yavaş bir uyarıcı ile ilişkilirken (181, 182), diğer lifler ise sadece 43 °C üzerindeki sıcaklıklarda aktive olurlar.

DKG nöronlarında, iyon kanallarının dağılımlarının çeşitli şekilde olduğu bilinmektedir. Na⁺ kanalları, büyük ve orta çapa sahip DKG nöronlarına göre küçük çaplı nöronlarda daha fazla sayıda eksprese olmaktadır (183). DKG nöronlarında, Ca⁺² kanallarının α_1 , $\alpha_2\delta$ (184, 185), β_3 ve β_4 (185) alt tiplerinin varlığı tespit edilmiştir. Özellikle α_1 ve $\alpha_2\delta$ alt birimleri küçük ve orta çaplı DKG nöronlarında daha yoğun şekilde eksprese olmaktadır (186) ve yine β_3 ve β_4

kanallarının da küçük çaplı DKG nöronlarında yoğun şekilde varlığı tespit edilmiştir (172, 185). Ayrıca DKG nöronlarında, K_A kanallarının (187), K_{ATP} (188, 189) ve Ca^{+2} ile aktive edilen K^+ kanallarının (190) varlığı tespit edilmiştir. Diğer kanallarda olduğu gibi K^+ kanalları da küçük çaplı DKG nöronlarında yoğun olarak bulunmaktadır (190). Kültüre edilmiş DKG nöronları, ağrı iletiminde rol oynayan çeşitli iyon kanallarına ve fonksiyonel reseptörlere sahip olduğundan nosisepsiyonun hücresel mekanizmasının aydınlatılması ile ilgili çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar (174, 191). Bu nedenle DKG nöronları ağrı için “hücresel model” olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışmada kullanılan floresan kalsiyum görüntüleme protokolü de, yaygın rolleri olan hücresel ikincil bir haberci molekülü olan Ca^{+2} düzeyinin güvenle takibini sağlayan önemli bir tekniktir. Bu nedenle $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinin nosiseptif/antinosiseptif etki takibi için faydalı bir model olması yönünde önem arz etmektedir.

Bu tez çalışması ile bir hücresel ağrı modeli olan sıçan DKG hücre kültürlerinde, nosiseptif sinyal belirteci olan $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi üzerine leptinin etkileri ve leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi üzerine meydana getirebileceği değişimlerin hangi hücresel yollar aracılığıyla olduğunun belirlenmesi amaçlandı.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında DKG primer hücre kültürü hazırlanarak deney protokolü oluşturuldu. Bu deney protokolünde DKG hücrelerinde, floresan kalsiyum görüntüleme sistemiyle $[Ca^{+2}]_i$ miktarında meydana gelen değişimler gözlemlendi.

4.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinin Primer Kültürü

Floresan kalsiyum görüntüleme ve elektrofizyolojik kayıtlar alabilmek için mekanik stabilitenin sağlanması son derece önemlidir. *In vivo* olarak bu mekanik stabiliteyi sağlamanın zorluğu, araştırmacıları fizyolojik koşulların en üst düzeyde taklit edildiği ortamlarda tutulan izole doku ve hücrelerde çalışmaya itmiştir. Bu çalışmada, ağrı çalışmaları için hücresel bir model olan DKG hücreleri enzimsel ve mekanik işlemlerle izole tek hücreler halinde elde edildi. Bu izole hücreler daha sonra floresan kalsiyum görüntüleme sistemi kayıtlarında ve elektrofizyolojik kayıtlarda kullanıldı. DKG hücre izolasyonu ve kültürü Forda ve Kelly (1985) adlı araştırmacıların geliştirdiği metoda göre gerçekleştirildi (192).

4.1.1. Kültür İçin Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Ajanlar

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

B) Etil Alkol: % 99.7 - % 100 saflıktaki etil alkol iki defa distile edilmiş suyla dilüe edilerek % 70'lik oranda hazırlandı ve püskürtmeli ağızlığı bulunan şişede tutuldu.

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

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

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

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

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

H) Sinir Büyütme Faktörü (NGF, 2.5S) (Sigma; Steinheim, Almanya): Sinir büyütme faktörü ilk olarak steril su içerisinde 100 µg/ml olacak konsantrasyonda hazırlandı ve bu solüsyon F14 içerisine 1 µg/ml olacak şekilde dilüe edildi. 50 µl'lik kısımlara ayrılarak -20 °C 'de saklandı.

Sinir büyütme faktörü embriyonik duyuşal ve sempatik nöronların yaşamını sürdürmesinde ve farklılaşmasında çok önemli bir yere sahiptir

4.1.2. Kültür Vasatı

Steril 10ml B27

Steril 5ml Glutamaks

5ml Penisilin/Streptomisin

500ml NBA içine ilave edildi ve 50 ml'lik Şişelerde kullanılıncaya kadar saklandı.

4.1.3. Kültür İçin Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri

Sterilizasyon amacıyla 0.22 µm porlara sahip filtre

Steril geniş petri kutusu 94 x 16 mm ebata sahip, yuvarlak

Steril küçük petri kutusu 35 x 10 mm ebata sahip, yuvarlak

Steril 50 ml polipropilen koni tp

Steril 15 ml polipropilen koni tp

Steril 5 ml polipropilen koni tp

Steril 12mm ebata sahip poly-D-lizin ve laminin kaplı lameller

Cam Pastör pipeti, 150 mm uzunlukta

4.1.4. Diseksiyon Malzemeleri

1 tane büyük makas, 220 mm uzunluęa sahip

1 tane küçük makas, 80 mm uzunluęa sahip

1 tane içi yaylı makas, ucu 12 mm uzunluęa sahip

1 tane 15 cm uzunluęa sahip forseps

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

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

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 Gangliyon Hücre Kültürü Protokolü

Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edilen 1-2 günlük Wistar cinsi sıçanlar dekapitasyonla öldürülerek, geniş bir petri kutusuna yerleştirildi. Küçük bir makasla vertebral kolon ayrıldı, daha sonra kaudal uçtan başlayarak boyun kısmına kadar spinal kolonun içi, yaylı küçük bir makasla açıldı. Daha sonra diseksiyon mikroskobu altında forsepsle bütün DKG'ler izole edilerek küçük bir petri kutusu içerisindeki kültür vasatına yerleştirildi. Bütün DKG gövdeleri çıkarılıp petri kutusunda toplandıktan sonra, petri kutusu hassas yuvarlak hareketlerle sallandı ve bütün gangliyonların bir araya toplanması sağlandıktan sonra kültür medyumunu pastör pipet ile çekildi. 900 µl 37 °C'de inkübe edilmiş kültür vasatı ve 100 µl kollagenaz (% 0.125) ilave edilerek hafifçe çalkalandı ve 13 dakika süreyle inkübatörde tutuldu. Bu süre sonunda enzimle muamele edilmiş hücre inkübatörden alınarak hızla üç defa PBS ile yıkandı. Daha sonra 900 µl PBS ve 100 µl tripsin (% 0.25) ilave edilerek hafifçe çalkalandı ve 6 dakika süreyle inkübe edildikten sonra 15 ml'lik steril plastik tüpe aktarıldı ve yaklaşık 4 ml inkübe edilmiş kültür vasatı ilave edildi. Gangliyonlar tüpün dibine çöktürüldükten sonra kültür vasatı pastör pipet ile uzaklaştırıldı ve bu işlem 3 defa

tekrarlandı. Daha sonra 100 µl DNAz ve 900 µl kültür medyumunu ilave edilip steril bir pastör pipet ile hızla çekip boşaltılarak gangliyonların mekanik olarak hücrelere ayrıştırılması sağlandı. Bu çekip boşaltma işlemi birkaç defa kademeli olarak yapıldı. Her bir kademede üstte kalan süspansiyon alınarak diğer gangliyonlara uygulanan tritilasyon işlemine devam edildi. Daha sonra hücre süspansiyonunun içine 200 ng/ml NGF eklendi. Poly-D-lizin ve laminin kaplı lameller (BD Biocoat, ABD) +4°C den alındı ve hücreler lamellere ekilerek, hücrelerin iyice yapışması için 4-6 saat %5 CO₂ ve %95 O₂ karışımı içeren 37 °C nemli bir inkübatörde bekletildi.

4.2. Hücre İçi Kalsiyum Görüntüleme ve Görüntü Analizleri

Hücreler, en az 4-6 saat inkübe edildikten ve lamel üzerine iyice yapışması sağlandıktan sonra kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanıldı. Hücrelerin aksonal ve dentritik uzantılar geliştirmesi floresan kalsiyum görüntüleme hesaplamalarını etkileyebileceği için görüntüleme deneylerinde aynı gün hazırlanan hücreler kullanıldı. Kültüre DKG hücreleri 45 dakika boyunca fura-2 AM içeren NaCl esaslı hücre dışı kayıt solüsyonu (135 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 11.5 mM glikoz, 11.6 mM HEPES)'nda tutuldu. Hücre dışı kayıt solüsyonunun pH'sı NaOH kullanılarak 7.4'e, ozmolarite ise sükroz kullanılarak 310-320 mOsm'a ayarlandı. 45 dakika inkübasyonun ardından hücreler taze hücre dışı kayıt solüsyonu ile 20 dakika süreyle 3 kez yıkanarak hücre dışındaki fura-2 AM uzaklaştırıldı ve böylece hücre içi kalsiyuma duyarlı boyanın de-esterifikasyonu sağlanmış oldu.

4.2.1. Floresan Kalsiyum Görüntüleme

Kalsiyum duyarlı floresan boya ile yüklenen hücreleri içeren lameller, mikrokübasyon kayıt çemberine (Warner Instruments, ABD) aktarıldı. Mikrokübasyon-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 kevvetiyle sağlandı. Deneylere başlamadan önce kayıt solüsyonlarının akacağı yükseklik tespit edildi. Bütün deneyler oda sıcaklığında (20-25 °C) gerçekleştirildi ve 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 off-line olarak, cevap veren hücrelerde ilgi alanı seçimleri yapılarak yazılım programı (sPCI, ComPix) aracılığıyla gerçekleştirildi. $[Ca^{+2}]_i$ hesaplanmasında, 510 nm'de emisyon gerçekleştirilerek 340 nm eksitasyonda elde edilen floresan yoğunluğunun 380 nm eksitasyonla elde edilen

floresan yoğunluğuna oranlanması (dual uyarı: 340 nm/380 nm, emisyon: 510 nm) esas alındı.

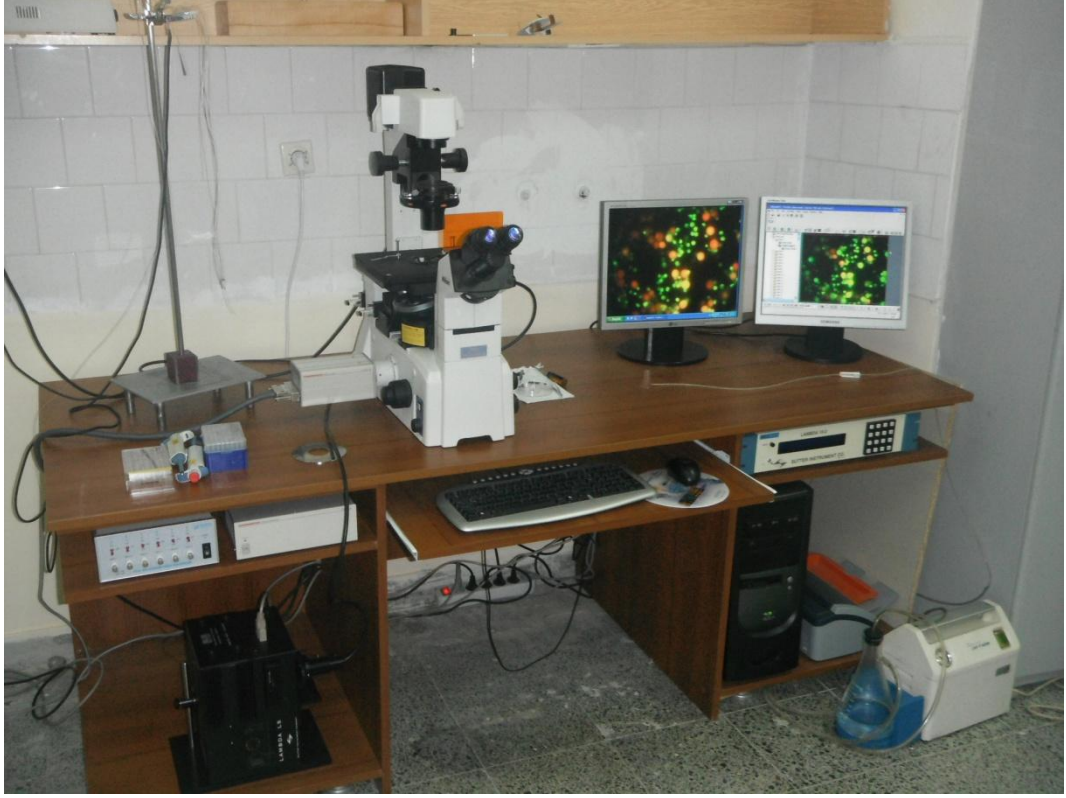
4.3. Leptin Uygulaması

Leptin, 0.5 ml (15 mM) HCl ve 0.3 ml (7.5 mM) NaOH'da çözölerek hazırlandı. Son konsantrasyonlar ekstrasellöler solüsyon içerisinde sulandırılarak 0.1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM konsantrasyonlarda leptin, kayıt çemberi içinde bulunan hücrelere uygulandı. İlk olarak kayıt çemberi içerisine hücreleri içeren lameller yerleştirdikten sonra perfüzyon sisteminin ince hortumu kayıt çemberi üzerine sabitlendi ve kayıt çemberi 600 µl hücre dışı kayıt solüsyonuyla dolduruldu. Öncelikli olarak bazal seviyeyi belirlemek için en az 5'er dakika kayıtlar alındı. Daha sonra farklı hücrelere 4 farklı konsantrasyondaki (0.1 µM, 1 µM, 10 µM ve 100 µM) leptin, protein kinaz C (PKC) inhibitörü şeletrin klorit ve 1 µM leptin birlikte son olarak da tapsigarjin (TG) ve 1 µM leptin birlikte uygulandı.

4.4. İstatistik

Veriler SPSS 16.0 istatistik programı kullanılarak istatistiksel olarak değeriendirildi. Grafikler de ise Sigma Plot 8.0 grafik programından yararlanıldı. Bütün veriler ortalama ± SS olarak sunuldu. Leptinin(0.1 µM, 1 µM, 10 µM ve 100 µM) konsantrasyonlarının $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi üzerine olan doz bağımlı etkisini değeriendirmek amacıyla çift yönlü varyans analizi kullanıldı. Leptinin gruplar arasındaki farklılığı ortaya koyabilmek amacıyla post hoc test olarak Tukey HSD testi kullanıldı. PKC inhibitörü ve TG uygulamalarının leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi

üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla Student's t testi kullanıldı ve istatistiksel olarak $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.1: Kalsiyum Görüntüleme Sisteminin Genel Görünüşü.

5.BULGULAR

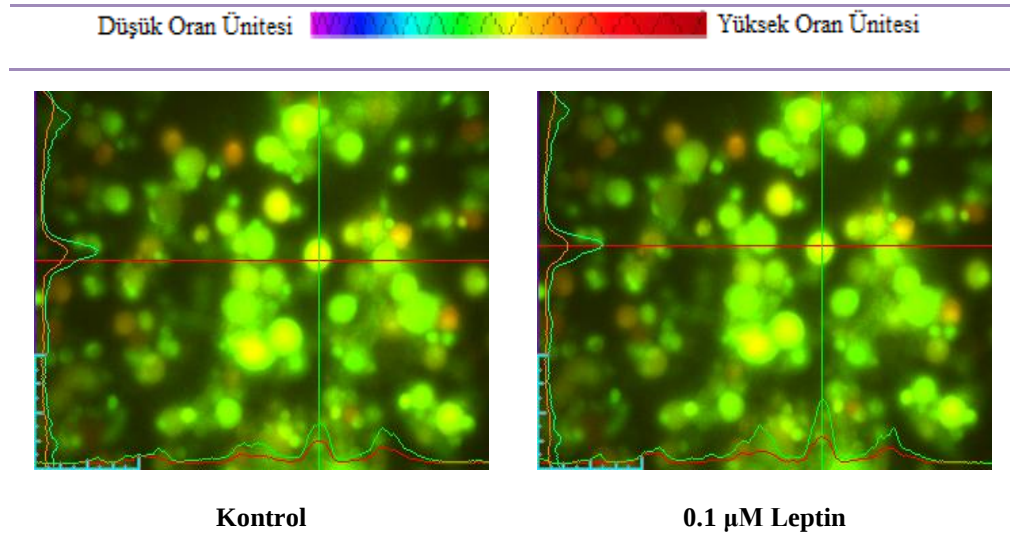
Bu tez çalışması ile ilk defa leptinin DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ miktarında ne tür değişikliklere sebep olduğu ve $[Ca^{+2}]_i$ miktarındaki değişimin hangi hücresel yollarla olduğu belirlendi. Leptinin nosiseptif sinyalleşme üzerine etkinliğini test etmeden önce, leptini çözmüş olduğumuz çözücü solüsyonunun, $[Ca^{+2}]_i$ seviyesi üzerine ne tür değişikliklere neden olduğu belirlendi. Kullanılan leptin çözücüsünün $[Ca^{+2}]_i$ seviyesini değiştirmedeği tespit edildi (n=109). Leptin uygulaması öncesi (yaklaşık 5-10 dakika) 340 nm/380 nm floresan oranı yaklaşık olarak 0.6 ve 0.7 arasındaydı. DKG nöronlarına leptin uygulanmadan önce bazal seviye % 100 kabul edilerek tüm floresan oranları normalize edildi. Leptinin (0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M ve 100 μ M) konsantrasyonlarda uygulamasını takiben doz bağımlı olarak DKG nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde artış meydana geldi (Tablo 5.1).

Tablo 5.1: DKG nöronlarında, leptin (0.1, 1, 10 ve 100 μ M) uygulamasına, $[Ca^{+2}]_i$ düzey (340 nm/380 nm floresan oranları) cevapları.

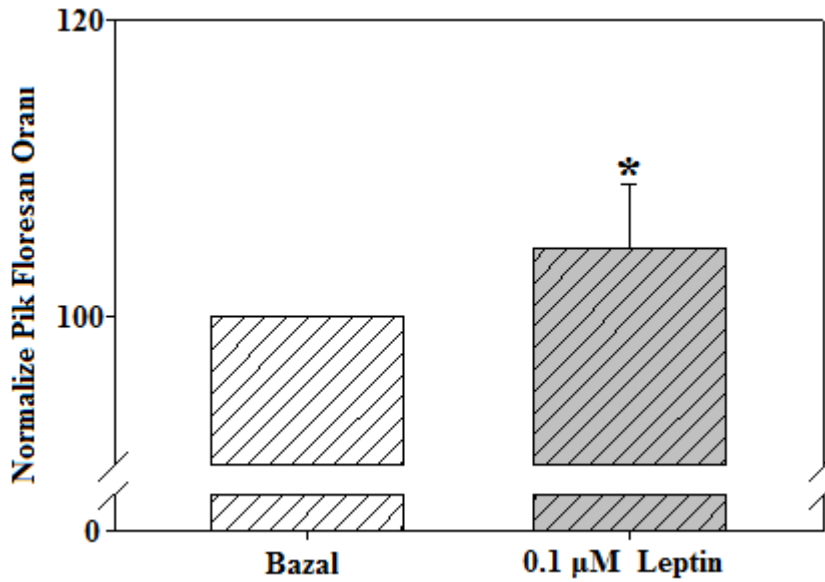
	Bazal (Kontrol)	Leptin	N	P
0.1 μM	100 $\pm$ 0	104.6 $\pm$ 4.4	42	<0.01
1 μM	100 $\pm$ 0	119.5 $\pm$ 5.9	31	<0.001
10 μM	100 $\pm$ 0	129.4 $\pm$ 7.8	29	<0.001
100 μM	100 $\pm$ 0	187.5 $\pm$ 7.6	35	<0.0001

Leptinin 0.1 μM uygulaması $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyini 104.6 ± 4.4 düzeyine yükseltti. Bu çalışmada kullanılan en küçük dozda dahi leptin istatistiksel olarak anlamlı şekilde $[\text{Ca}^{+2}]_i$ seviyesini artırdığı tespit edildi ($n=42$, $p<0.01$) (Şekil 5.1).

A



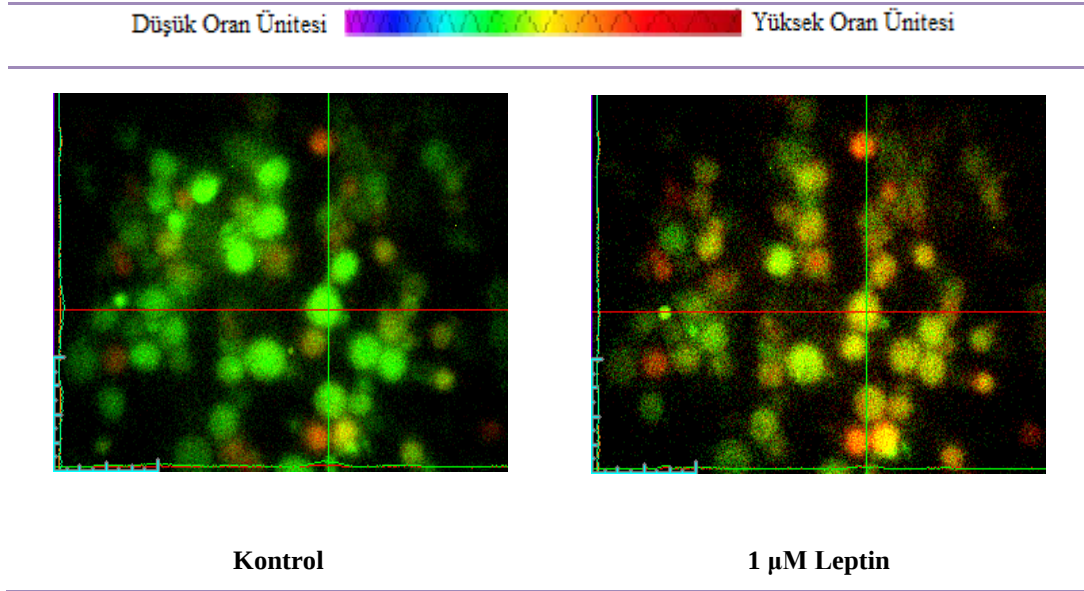
B



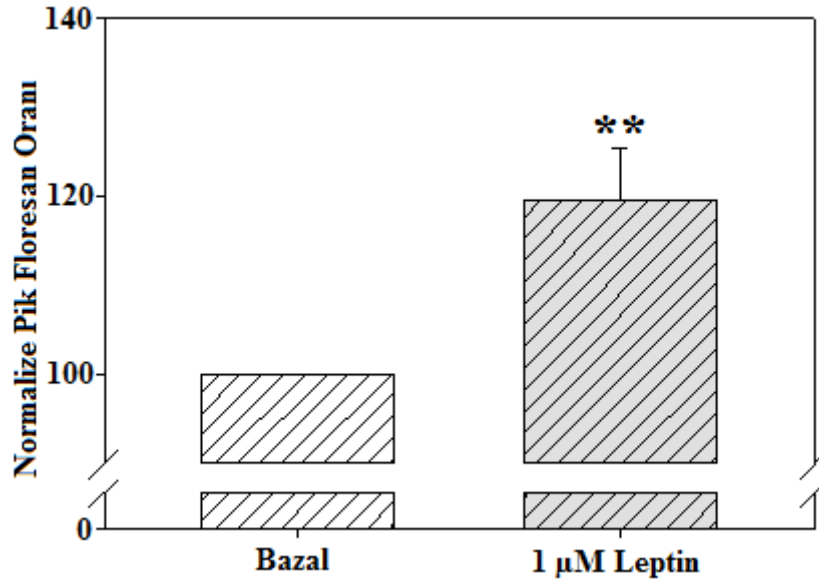
Şekil 5.1: DKG nöronlarına uygulanan 0.1 μM leptinin $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyine etkileri **A.** 0.1 μM leptin uygulaması öncesi ve 0.1 μM leptin uygulaması sonrası $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **B.** 0.1 μM leptin uygulamasının en az 3 farklı DKG kültür ortamında $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyine etkisi (Ortalama $\pm$ S.S) * $p < 0.01$.

Leptinin 1 μM uygulamasında da benzer şekilde $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyini 119.5 ± 5.9 istatistiksel olarak anlamlı biçimde artırdı ($n=31$, $p<0.001$) (Şekil 5.2).

A



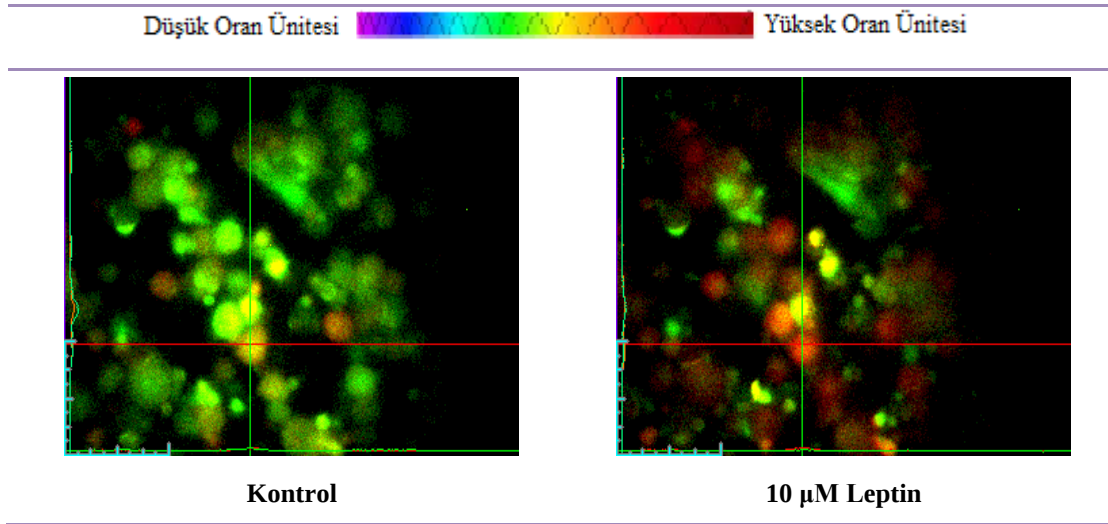
B



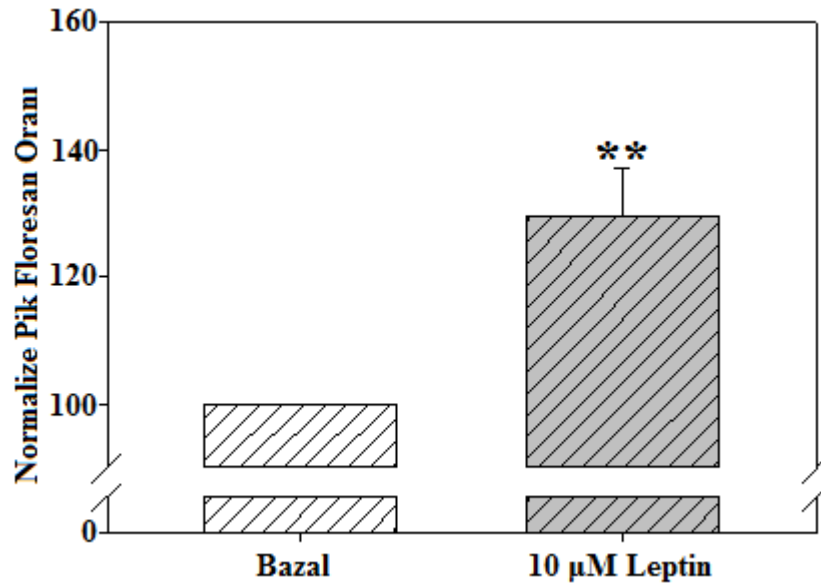
Şekil 5.2: DKG nöronlarına uygulanan 1 μM leptinin $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyine etkileri **A.** 1 μM leptin uygulaması öncesi ve 1 μM leptin uygulaması sonrası $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **B.** 1 μM leptin uygulamasının en az 3 farklı DKG kültür ortamında $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyine etkisi (Ortalama $\pm$ S.S) ** $p<0.001$.

Leptinin 10 μM , uygulamasında da $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyini 129.4 ± 7.8 istatistiksel olarak anlamlı biçimde artırdı ($n=29$, $p<0.001$) (Şekil 5.3).

A



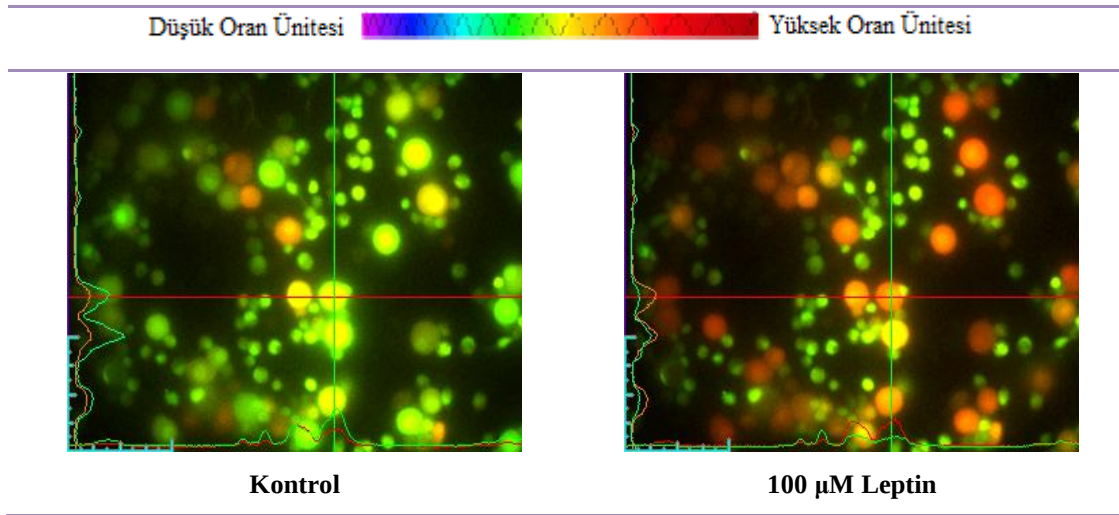
B



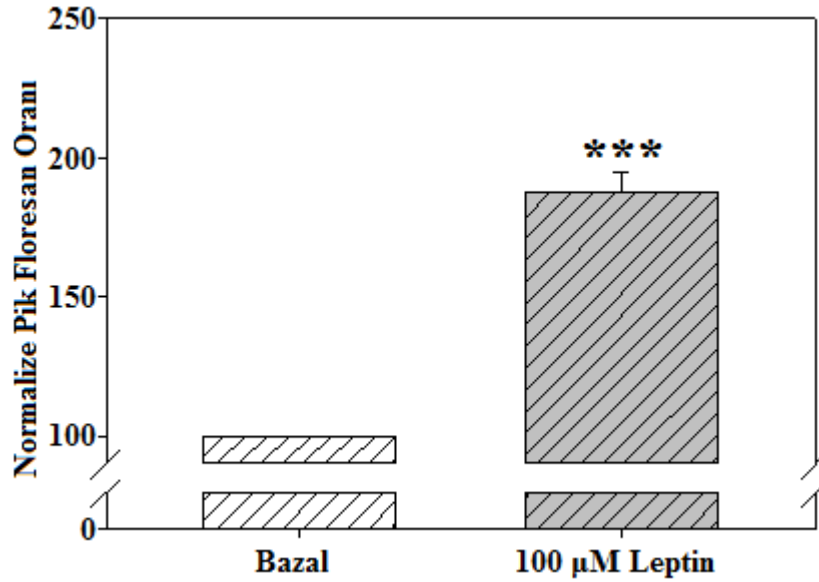
Şekil 5.3: DKG nöronlarına uygulanan 10 μM leptinin $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyine etkileri **A.** 10 μM leptin uygulaması öncesi ve 10 μM leptin uygulaması sonrası $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **B.** 10 μM leptin uygulamasının en az 3 farklı DKG kültür ortamında $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyine etkisi (Ortalama $\pm$ S.S) ** $p<0.001$.

Bu tez çalışmasında kullanılan en yüksek doz olan leptinin 100 μ M uygulaması ise, benzer şekilde $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini 187.5 ± 7.6 istatistiksel olarak anlamlı biçimde artırdı ($n=35$, $p<0.0001$) (Şekil 5.4).

A



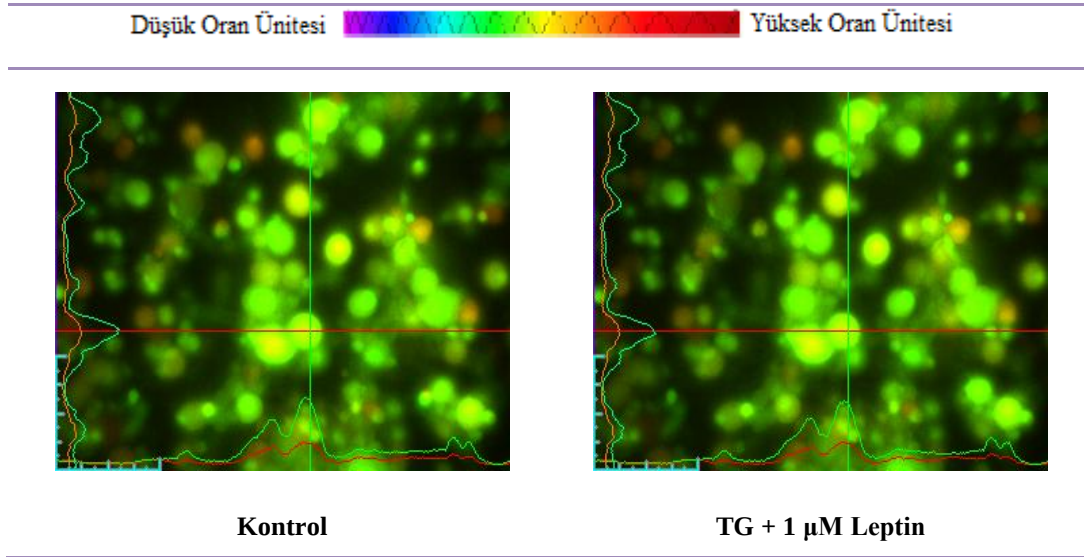
B



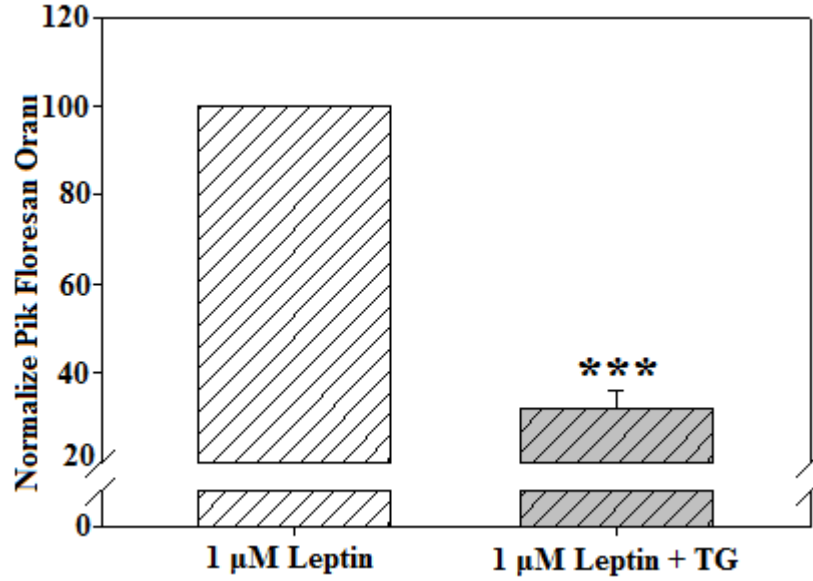
Şekil 5.4: DKG nöronlarına uygulanan 100 μ M leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri **A.** 100 μ M leptin uygulaması öncesi ve 100 μ M leptin uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **B.** 100 μ M leptin uygulamasının en az 3 farklı DKG kültür ortamında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkisi (Ortalama $\pm$ S.S) *** $p<0.0001$.

Leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde meydana getirdiği artışın, hücre içi Ca^{+2} depolarından mı yoksa hücre dışından mı olduğu tespit etmek istendi. Bu amaçla hücre içi depoların tapsigarjin (TG) ile muamelesi sonrasında (yaklaşık 45 dakika) boşaltılmasını takiben leptin uygulandı. Leptinin meydana getirdiği artış %100 kabul edildiğinde, TG muamelesi sonrası leptin uygulanmasıyla $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde önemli ölçüde azalma meydana geldi. Bu azalma 69.6 ± 2.4 seviyesindeydi (n=18, p<0.0001) (Şekil 5.5).

A

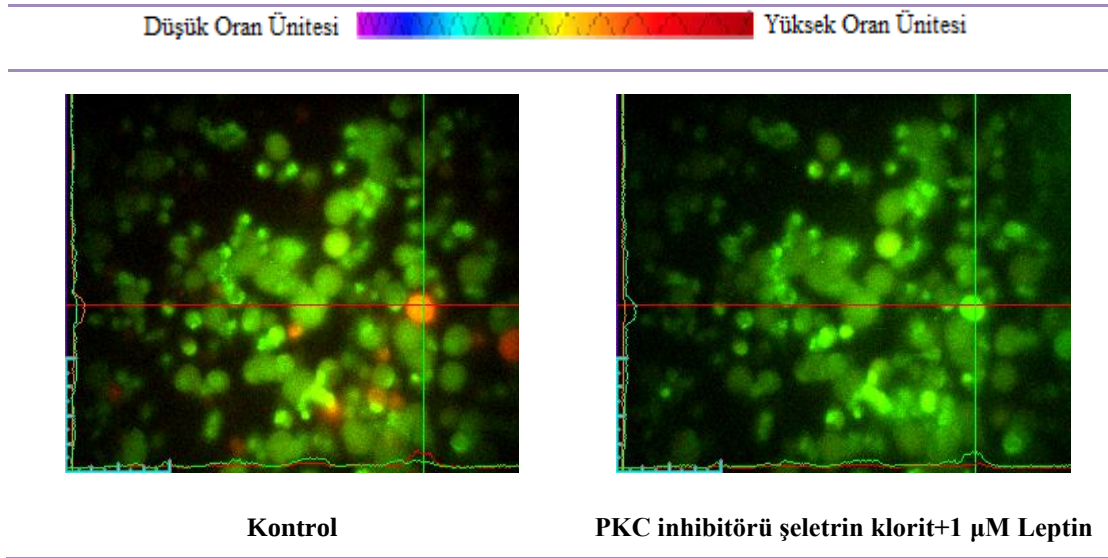
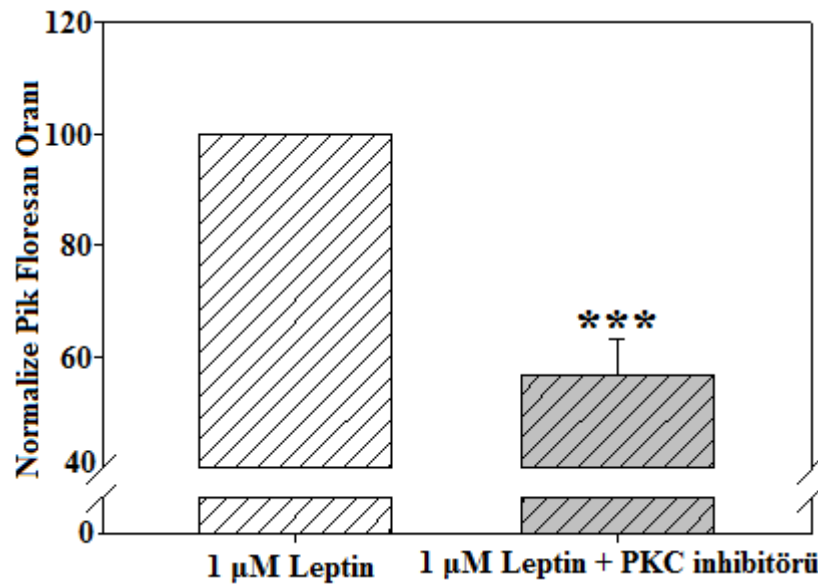


B



Şekil 5.5: DKG nöronlarına uygulanan 1 μ M leptin ve TG'nin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri **A.** TG duyarlı kalsiyum depolarının boşaltılması sonucu uygulanan 1 μ M leptinin, $[Ca^{+2}]_i$ üzerine etkilerini gösteren orijinal resim. **B.** TG ve 1 μ M leptinin birlikte uygulamasının, en az 3 farklı DKG kültür ortamında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkisi (Ortalama $\pm$ S.S) *** $p < 0.0001$.

Leptinin $[Ca^{+2}]_i$ miktarında meydana getirdiği artışın PKC yolağı aracılığıyla olup olmadığını belirlemek amacıyla leptin uygulamasından önce PKC inhibitörü şeletrin klorit kullanıldı. Leptinin meydana getirdiği artış %100 kabul edildiğinde PKC inhibitörü şeletrin klorit, 1 μ M leptinin meydana getirdiği $[Ca^{+2}]_i$ düzeyindeki artışı önemli ölçüde baskıladı. Meydana gelen bu inhibisyon % 56.4 ± 6.4 seviyesindeydi ($n=27$, $p < 0.0001$) (Şekil 5.6).

A**B**

Şekil 5.6: DKG nöronlarına uygulanan PKC inhibitörü şeletrin klorit ve 1 µM leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri. **A.** 1 µM leptin + PKC inhibitörü şeletrin klorit uygulaması sonrası $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim. **B.** 1 µM leptin + PKC inhibitörü şeletrin klorit uygulamasının en az 3 farklı DKG kültür ortamında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkisi (Ortalama $\pm$ S.S) *** $p<0.0001$.

Tüm bu bulgular leptinin duyuşal nöronlarda doz bağımlı olarak $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini artırdığı ve leptinin indüklediğı bu artışın PKC-aracılı sinyal yolağı aracılığıyla olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmanın bir diğér önemli bulgusu ise yüksek doz leptin uygulamasının (10 μ M ve 100 μ M) ağırı iletiminden sorumlu olan nosiseptif (küçük ve orta çapa sahip DKG) nöronlardan ziyade büyük çapa sahip olan proprio reseptif nöronları etkilemektedir (Şekil 5.3 ve 5.4).

6. TARTIŞMA

Bu çalışma ile ilk defa sıçan DKG hücre kültüründe leptinin $[Ca^{+2}]_i$ seviyesini doz bağımlı olarak artırdığı, PKC inhibitörü şeletrin klorit uygulaması ve hücre içi kalsiyum depolarlarının TG ile muamelesi sonrasında boşaltılmasının leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde meydana getirdiği bu artışı baskıladığı tespit edildi.

Daha önce yapılan çalışmalarda, santral ve periferel olarak leptin uygulamasının hiperaljezik etkiye sebep olması (162), streptozotosin indüklenmesiyle diyabetik nöropati oluşturulan ob/ob farelerde ağrı eşiğinin artması (analjezik etki), leptinin ağrı üzerinde etkinliğinin olduğunu göstermektedir (86). Ayrıca leptin ağrı duyarlılığında artış gösteren alfa-melanosit uyarıcı hormon sentezinde de artış meydana getirdiği (193) ve ob/ob farelerde hiperaljezi meydana geldiği ve bu meydana gelen hiperaljeziyi selektif T tipi kalsiyum kanallarının blokladığı (86) tespit edilmiştir. Tüm bu bulgular leptinin ağrı duyarlılaşmasında etkili bir faktör olabileceğini göstermektedir. Ancak meydana gelen bu duyarlılaşmanın mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu tez çalışmasıyla ortaya konulan bulgular, periferel ağrı iletiminde leptinin etkili olabileceğini ve bu etkinin hücresel mekanizmalara ait bulguları kapsadığı düşünülmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla leptinin farklı hücre tiplerinde kalsiyum kanal aktivasyonunu artırdığı tespit edilmiştir. Leptinin POMC nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ miktarını artırdığı (194) ve membran depolarizasyonuna neden olduğunu (195), benzer şekilde adrenomedullar kromofin hücrelerinde (196) ve adipoz dokuda (197) $[Ca^{+2}]_i$ miktarını artırdığı ayrıca hipofiz gonodotrop L β T2

hücrelerinde L-tipi kalsiyum kanal ekspresyonunda da artışa sebep olduğu belirlenmiştir (198). Bu çalışmalara ilaveten leptin hipokampal nöronlarda ve hipotalamik arkuat nükleusun NPY nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonundaki artışla aktive olan Ca^{+2} bağımlı K^+ kanallarını aktive ettiği tespit edilmiştir (199, 200). Bu bulgular bu tez çalışması ile ortaya konulan DKG nöronlarında leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde artış meydana getirme bulgusuyla uyumludur.

Leptin, grelin ve oreksin tarafından indüklenen NPY nöronlarında da $[Ca^{+2}]_i$ miktardaki artışı baskıladığını (194) ve NPY nöronlarında yüksek voltajla aktive olan kalsiyum kanal akımını azalttığını belirlemişlerdir.(201) DKG nöronlarında da benzer şekilde grelin (202) ve oreksin (203) $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde artış meydana getirmektedir. İlave bir uyarıcı varlığında leptinin mevcut kalsiyum sinyallerini aktive etmesi veya aktivasyonunu azaltması arasında bir ilişki olup olmadığı bu tez çalışma ile direk olarak belirlenmeye çalışılmadı.

Bu tez çalışmasının diğer bir aşamasında ise leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde artış meydana getirmesinde PKC hücresel yolağın rolü irdelendi. Chen ve ark.'nın (2006), sıçan DKG nöronlarında OB-R'nin varlığını ortaya koyması (148) ve leptinin kromofin hücrelerinde PLC'nin yanı sıra IP_3 ve PKC sinyal yollarını da içeren hücresel mekanizma ile $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde artış meydana getirmesi bulgusu (204) bu tez çalışmasıyla ortaya konulan DKG nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde artışın PKC aracılığı mekanizmayla gerçekleşmesi bulgusuyla paralellik göstermektedir. PKC izoenziminin anatomik lokalizasyonunun, ağrı sürecinde esas düzenleyici olarak rol oynadığı bilinmektedir (205). Bu nedenle, PKC inhibitörleri, diyabetik nöropati içeren ağrılı durumların tedavisi için teröpatik yaklaşımlar olarak dikkate alınmalıdır.

Fizyolojik olarak hücre içi Ca^{+2} depolarının boşalması IP_3 düzeylerindeki artışla ya da depolardan Ca^{+2} salıverilmesine neden olan diğer Ca^{+2} salıverici sinyaller aracılığı ile gerçekleşmektedir (206, 207). Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz inhibitörü olan TG, depo aracılı kalsiyum girişi ile ilgili çalışmalar için en uygun ajan olduğu bilinmektedir. Tapsigarjinin büyük oranda hücre sel sinyalizasyon araştırmaları için geliştirildiği bilinmektedir. Plazma membranından Ca^{+2} girişi meydana getirerek $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde artışa neden olmaktadır. Depo aracılı kalsiyum girişi, birçok mekanizmayla inhibe edilmektedir. Bazı hücre tiplerinde depo aracılı kalsiyum girişinin inhibisyonu, ya direk olarak serbest araşidonik asit (AA) ile etkileşmesiyle (208, 209) ya da araşidonik asitin generasyonu (210, 211) meydana geldiği düşünülmektedir. Araşidonik asit, leptin salgılanmasını direk olarak etkilememektedir, ya direk fosfolipaz A2 ya da leptin-indüklemeli fosfoinositol (3,4) difosfat (PIP_2) hidrolizi ile dolaylı olarak arttırdığı düşünülmektedir (212).

Daha önceki çalışmalarla, adipoz hücrelerine TG uygulanması ile birlikte hücre içi kalsiyum depoları boşaltılmış ve insülin uyarılmalı leptin sekresyonunun inhibe edildiği gözlenmiştir (213). Bu sonuçlara göre, adipoz hücrelerinde endojen kalsiyum salıverilmesini, insülin-uyarılmalı leptin sekresyonunun inhibe ettiği düşünülmektedir. Bu çalışmada ise, hücre içi depoların TG ile muamelesi sonrasında boşaltılmasını takiben leptin uygulandığında, leptinin meydana getirdiği artışın önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak bu literatür bilgilerin ışığı altında bu tez çalışmasında, ilk keşif edildiği zamanlar sadece enerji dengesi ve vücut yağ dağılımı üzerinde etkili bir hormon olarak tanımlanan leptinin, ağrı için hücre sel model olan DKG

nöronlarında doz bağımlı olarak $[Ca^{+2}]_i$ düzeyinde artış meydana getirmesi ve bu artışın, periferel nosisepsiyonda rol oynayan PKC aktivasyonu aracılığıyla olması ve hücre içi depoların bu aktivasyonda rol oynaması nosiseptif iletimde leptinin rol oynayabileceğini göstermektedir.

Çalışmanın devamı hakkında düşünceler:

Bu çalışmanın bulguları sıçan DKG hücrelerinde leptinin doz bağımlı olarak $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini artırdığını göstermektedir. Bu çalışmanın devamında leptinin kalsiyum kanalları üzerine olan etki mekanizmasının aydınlatılması ve ağrı üzerine etkinliğinin daha iyi bir şekilde aydınlatılması amacıyla aşağıdaki yaklaşımlara gerek olduğu düşünülmektedir:

- a) Leptinin DKG hücrelerinde patch clamp tekniği çalışmaları ile membran potansiyeli ve AP parametreleri üzerine olan etkileri belirlenerek leptinin bu hücrelerde olası fizyolojik önemi hakkında bilgi elde etmek,
- b) Leptinin DKG hücrelerinde membran akımları üzerine etkileri incelenerek $[Ca^{+2}]_i$ depoları ve kalsiyum tetiklemeli kalsiyum salıverilmesi ile etkileşimini belirlemek,
- c) PLC, diaçilgliserol gibi hücresel ikincil habercilerin leptinin etkisinde olası rollerini direk yaklaşımlarla belirlemeye çalışmak,
- d) Leptinin spesifik kalsiyum kanal blokörleri kullanarak hangi tip kalsiyum kanalları üzerine etkisinin olduğunu belirlemek,
- e) Leptinin diyabetik nöropati sonrasında oluşan sinir hasarını takiben uygulanmasının ağrı davranışı üzerine etkisini *hot plate* testi ile belirlemek.

7. KAYNAKLAR

1. Pehlivan F. Biyofizik 2. Baskı Ankara. 1997.
2. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981; 391: 85-100.
3. Hodgkin AL, Huxley AF. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol* 1952; 116: 473-496.
4. Guyton CA, Hall JE. Textbook of medical physiology tenth edition. 2011.
5. Taylor WR, Jones DT, Green NM. A method for alpha-helical integral membrane protein fold prediction. *Proteins* 1994; 18: 281-94
6. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; 26: 13-25.
7. Goldin AL. Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Advance Publication by J-STAGE Developmental Changes in Cardiac Na⁺Channel*. *Physiol* 2001; 63: 871 – 894.
8. Haufe V, Camacho JA, Dumaine R, et al. Expression pattern of neuronal and skeletal muscle voltage-gated Na⁺ channels in the developing mouse heart. *J Physiol* 2005; 564: 683 – 696.
9. Kaufmann SG, Westenbroek RE, Zechner C, et al. Functional protein expression of multiple sodium channel alpha- and beta-subunit isoforms in neonatal cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 48: 261 – 269.
10. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; 28: 365-368.
11. Josephine Lai, John C Hunter and Frank Porreca. The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. *Current Opinion in Neurobiology* 2003; 13: 291-297.
12. Hille B. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd edition. Sunderland, MA 2001: Sinauer Associates, Inc.
13. Sulayman D, Dib-Hajj, PhD, et al. Waxman, MD, PhD. Voltage-Gated Sodium Channels: Therapeutic Targets for Pain. *American Academy of Pain Medicine* 2009; 1260-1269.
14. Olaf Pongs. Ins and outs of cardiac voltage-gated potassium channels. *Current Opinion in Pharmacology* 2009; 9: 311-315.
15. Long, S. B, Campbell E. B, and Mackinnon R. *Science* 2005; 309(5736), 897-903.
16. Choe S. Potassium channel structures. *Nature reviews. Neuroscience* 2002; 3 (2), 115-121.
17. Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002; 419 (6902), 35-42.
18. Lee SY, Lee A, Chen J, Mackinnon R. Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel nad its dependence on the lipid membrane. *P Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 15441.
19. Choe S, Kreusch A, Pfaffinger PJ. Towards the three-dimensional structure of voltage gated potassium channels. *Trends in Biochemical Sciences* 1999; 24 (9), 345-349.
20. Yuk-Man Leung. Voltage-gated K⁺ channel modulators as neuroprotective agents. *Graduate Institute of Neural and Cognitive Sciences. Life Sciences* 2010; 86: 775-780.
21. Gutman G.A., Chandy K.G., Grissmer S, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev* 2005; 57, 473-508.
22. Vacher, H., Mohapatra, D.P., Trimmer, J.S. Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol. Rev* 2008; 88, 1407-1447.
23. Chen Gu, Joshua Barry. Function and mechanism of axonal targeting of voltage-sensitive potassium channels. *Neurobiology* 2011; 94115-132.
24. Beck H, Clusmann H, Kral T, et al. Potassium currents in acutely isolated human hippocampal dentate granule cells. *J Physiol* 1997; 498: 73-85.
25. Bischoff U, Vogel W, Safronov BV. Na⁺-activated K⁺ channels in small dorsal root ganglion neurones of rat. *The Journal of Physiology* 1998; 510: 743-754.

26. Fernandez-Fernandez JM, Nobles M, Currid A, Vazquez E, Valverde MA. Maxi K⁺ channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: 1705 - 1714.
27. Jinhyun Kim and Dax A. Hoffman. Potassium Channels: Newly Found Players in Synaptic Plasticity. *Neuroscientist* 2008; 14(3):276–286.
28. Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, et al. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 868: 233–85.
29. Thompson SH. Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones. *J Physiol* 1977; 265(2):465–88.
30. Hille B. *Ionic channels of Excitable Membranes*. Sunderland: Sinauer Associates 1992.
31. Clark R, Proks P. ATP-sensitive potassium channels in health and disease. *Adv Exp Med Biol* 2010; 654:165-92.
32. Yokoshiki H., Sunagawa M., Seki T., Sperelakis N. “ATP-sensitivite K⁺ channels in pancreatic, cardiac and vaskular smooth muscle cells”. *Am. J. Physiol (Cell Physiol)* 1998; 274, 43, C25-C37.
33. Dawe GS., Han SP., Bian JS., Moore PK. Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K⁺ channel dependent decrease in blood pressure in freely moving rats. *Neuroscience* 2008; 152(1):169-77.
34. Daniel H. Cox. Ca²⁺-regulated ion channels. *BMB reports* 2011; 44 (10): 635-646.
35. Diana Conte Camerino, Domenico Tricarico, and Jean-François Desaphy. Ion Channel Pharmacology. *Neurotherapeutics* 2007; 184–198.
36. Fikret Dogulu, Sureyya Barun, Hakan Emmez, et al. Effect of a Chloride Channel Inhibitor, 5-Nitro-2- (3-Phenylpropylamino)-Benzoate, on Endothelin-1 Induced Vasoconstriction in Rabbit Basilar Artery. *Turkish Neurosurgery* 2009; No: 4, 380-386.
37. Johnston GA. GABAC receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol Sci.* 1996; 17: 319-323.
38. Edry-Schiller J, Ginsburg S, Rahamimoff R. A chloride channel in isolated fused synaptosomes from Torpedo electric organ. *J Physiol.* 1991; 438: 627-647.
39. Scott RH, McGuirk SM, Dolphin AC. Modulation of divalent cation-activated chloride ion currents. *Br J Pharmac.* 1988; 94: 653-662.
40. Lisa Doan, MD. Voltage-gated calcium channels and pain. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management* 2010; 14, 42-47.
41. D.H. Vandael, A. Marcantoni, S. Mahapatra, et al. Ca(v) 1.3 and BK channels for timing and regulating cell firing. *Mol. Neurobiol* 2010; 42, 185–198.
42. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 521-544.
43. L. Lacinová. Voltage-dependent calcium channels. *Gen. Physiol. Biophys* 2005; 24; 1–78.
44. A. Zuccotti, S. Clementi, T. Reinbothe, et al. Structural and functional differences between L-type calcium channels: crucial issues for future selective targeting. *Trends Pharmacol. Sci* 2011; 32; 366–375.
45. Catterall WA., Few AP. Calcium Channel Regulation and Presynaptic Plasticity. *Neuron* 2008; 59(6):882-901.
46. Perez-Reyes E, Sim HS, Lacerda AE, et al. Induction of calcium currents by the expression of the A1-subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature* 1989; 340:233-236.
47. Valentin K. Gribkoff. The role of voltage-gated calcium channels in pain and nociception. *Semin Cell Dev Biol* 2006; 17: 555-64.
48. Yu, F.H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G.A., and Catterall, W.A. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev* 2005; 57, 387–395.
49. Dolphin, A.C. Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr* 2003; 35, 599–620.
50. Hofmann, F., Lacinova´ , L., and Klugbauer, N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol* 1999; 139, 33–87.
51. Davies, A., Hendrich, J., Van Minh, et al. Functional biology of the $\alpha_2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol. Sci* 2007; 28, 220–228.

52. Ming-Chuan Wang, Annette Dolphin, Ashraf Kitmitto. L-type voltage-gated calcium channels: understanding function through structure. *FEBS Letters* 2004; 564; 245-25.
53. Trigg DJ. L-type calcium channels: *Curr Pharm Des* 2006; 12; 443-57.
54. Xu W, Lipscombe D. Neuronal Ca(v)1.3 alpha (1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* 2001; 21; 5944-51.
55. Lipscombe D, Helton TD, Xu W. L-type calcium channels. The low down. *J Neurophysiol* 2004; 92; 2633-41.
56. Kim DS, Yoon CH, Lee SJ, et al. Changes in voltage-gated calcium channel alpha (1) gene expression in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 96;151-6.
57. Bell TJ, Thaler C, Castiglioni AJ, Helton TD, Lipscombe D. Cell-specific alternative splicing increases calcium channel current density in the pain pathway. *Neuron* 2004; 41 (1); 127-38.
58. Miller RJ. Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 1987; 235: 46-52.
59. Westenbroek RE, Hell JW, Warner C, et al. Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron* 1992; 9: 1099-1115.
60. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 11-21.
61. Seward E, Hammond C, Henderson G. M-opioid-receptor-mediated inhibition of the N-type calcium-channel current. *Proc R Soc Lond B* 1991; 244:129-135.
62. Bourinet E, Soong TW, Stea A, et al. Determinants of the G protein-independent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 1486-1491.
63. Atanassoff PG, Hartmannsgruber MW, Thrasher J, et al. Ziconotide, a new N-type calcium channel blocker, administered intrathecally for acute postoperative pain. *Reg Anesth Pain Med* 2000; 25: 274-278.
64. Chaplan SR, Pogrel JW, Yaksh TL. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269:1117-1123.
65. Matthews EA, Dickenson AH. Effects of spinally delivered N- and P-type voltage-dependent calcium channel antagonists on dorsal horn neuronal responses in a rat model of neuropathy. *Pain* 2001; 92: 235-246.
66. Maggi CA, Tramontana M, Cecconi R, et al. Neurochemical evidence for the involvement of N-type calcium channels in transmitter secretion from peripheral endings of sensory nerves in Guinea pigs. *Neurosci Lett* 1990; 114:203-206.
67. Evans AR, Nicol GD, Vasko MR. Differential regulation of evoked peptide release by voltage-sensitive calcium channels in rat sensory neurons. *Brain Res* 1996; 18:265-273.
68. Zieglansberger W, Tulloch IF. Effects of substance P on neurones in the dorsal horn of the spinal cord of the cat. *Brain Res* 1979; 166:273-282.
69. Oku R, Satoh M, Fujii N, et al. Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res* 1987; 403:350-354.
70. Saegusa H, Kurihara T, Zong S, et al. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca₂₊ channel. *Embo j* 2001; 20: 2349-2356.
71. Llinas R, Sugimori M, Lin JW, Cherskey B. 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* 1989a; 86: 1689-93.
72. Tottene A, Volsen S, Pietrobon D. Alpha(1E) subunits form the pore of three cerebellar R-type calcium channels with different pharmacological and permeation properties. *J Neurosci* 2000; 20: 171-8.
73. Fukumoto N, Obama Y, Kitamura N, et al. Hypoalgesic behaviors of P/Q-type voltage-gated Ca₂₊ channel mutant mouse, rolling Mouse Nagoya. *Neuroscience* 2009; 160:165-173.
74. Randall AD, Tsien RW. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology* 1997; 36: 879-93.
75. Wilson SM, Toth PT, Oh SB, et al. The status of voltage-dependent calcium channels in alpha 1E knock-out mice *J Neurosci* 2000; 20: 8566- 71.

76. Ardid D, Lamberty Y, Alloui A, et al. Antihyperalgesic effect of levetiracetam in neuropathic pain models in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 473: 27-33.
77. D'Ascenzo M, Vairano M, Andreassi C, et al. Electrophysiological and molecular evidence of L-(Cav1), N- (Cav2.2), and R-(Cav2.3) type Ca²⁺ channels in rat cortical astrocytes. *Glia* 2004; 45: 354-63.
78. Metz AE, Jarsky T, Martina M, Spruston N. R-type calcium channels contribute to afterdepolarization and bursting in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 2005; 25: 5763-73.
79. Murakami M, Nakagawasai O, Suzuki T, et al. Antinociceptive effect of different types of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel α_1 subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice. *Brain Res* 2004; 1024:122-129.
80. Saegusa H, Kurihara T, Zong S, et al. Altered pain responses in mice lacking α_1E subunit of the voltage-dependent Ca²⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:6132-6137.
81. Newcomb R, Szoke B, Palma A, et al. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochimie* 1998; 37: 15353-15362.
82. Matthews EA, Bee LA, Stephens GJ, et al. The Cav2.3 calcium channel antagonist SNX-482 reduces dorsal horn neuronal responses in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 3561- 3569.
83. Yunkger AR, McEnery MW. Low-voltage-activated ("T-Type") calcium channels in review. *J Bioenerg Biomembr* 2003; 35: 533-575.
84. Magee JC, Christofi G, Miyakawa H, et al. Subthreshold synaptic activation of voltage-gated Ca²⁺ channels mediates a localized Ca²⁺ influx into the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 1995; 74:1335-1342.
85. Huguenard JR. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu Rev Physiol* 1996; 58:329-348.
86. Latham JR, Pathirathna S, Jagodic MM, et al. Selective T type calcium channel blockade alleviates hyperalgesia in ob/ob mice. *Diabetes* 2009; 58: 2656-65.
87. Dogrul A, Gardeli LR, Ossipov MH, et al. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 2003; 105:159- 168.
88. Barton ME, Eberle EL, Shannon HE. The antihyperalgesic effects of the T-type calcium channel blockers ethosuximide, trimethadione, and mibefradil. *Eur J Pharmacol* 2005; 521:79-85.
89. Gören MZ, Filiz O. Ethosuximide: From bench to bedside. *CNS Drug Res* 2007; 13:224-239.
90. Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003; 426: 517-524.
91. Bloomquist B.T., Shortridge R.D., Schnewly S., et al. Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, *norpA*, and its role in phototransduction. *Cell* 1988; 54: 723-33.
92. Hardie, R.C. and Minke, B. Phosphoinositide-mediated phototransduction in *Drosophila* photoreceptors: the role of Ca²⁺ and *trp*. *Cell Calcium* 1995; 18: 256-74.
93. Prole DL, Taylor CW. Identification of intracellular and plasma membrane calcium channel homologues in pathogenic parasites. *Plos One* 2011; 6 (10): e26218.
94. Zhu, X., Chu, P.B., Peyton, M., and Birnbaumer, L. Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* *trp* gene. *FEBS Lett* 1995; 373: 193-8.
95. Hung-Tat Leung, Julie Tseng-Crank, Eunju Kim, et al. DAG Lipase Activity Is Necessary for TRP Channel Regulation in *Drosophila* Photoreceptors. *Neuron* 2008; 58: 884-896.
96. Wes, P.D., Chevesich, J., Jeromin, A., et al. TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9652-6.
97. Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., et al. TRP, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell* 1996; 85: 661-71.
98. Clapham, D.E., Julius, D., Montell, C., and Schultz, G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 427-50.
99. Scott Earley and Joseph E. Brayden Transient receptor potential channels and vascular function. *Clinical Science* 2010; 119: 19-36.

100. Fraser SP, Pardo LA. Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer. Colloquium on ion channels and cancer. *EMBO Rep* 2008; 9: 512–515.
101. Stine Falsig Pedersen, Grzegorz Owsianik, Bernd Nilius. *Cell Calcium* 2005; 38: 233–252.
102. Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., Peters, J.A. Transient Receptor Potential cation channels in disease. *Physiol. Rev.* 2007; 87: 165–217.
103. Mustafa Saygın, Mustafa Nazıroğlu. Recent developments on molecular mechanisms role on activation of TRPM2 cation channels. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2010; 27: 42-45.
104. Michael Bandell, Lindsey J Macpherson and Ardem Patapoutian From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Neurobiology* 2007; 17: 490–497.
105. Alvarez dLR, Canessa CM, Fyfe GK, and Zhang P. Structure and regulation of amiloridesensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol* 2000; 62: 573-594.
106. Xiang-Ping Chu, Christopher J. Papasian, John Q. Wang, Zhi-Gang Xiong. Modulation of acid sensing ion channels: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2011; 3(4): 288-309.
107. Waldmann R, Bassilana F, Weille J, et al. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem.* 1997; 272: 20975-8.
108. Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. A protongated cation channel involved in acid-sensing *Nature* 1997; 386: 173-177.
109. Waldmann R and Lazdunski M. H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the ENaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8(3): 418-424.
110. Krishtal O. The ASICs: signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci* 2003; 26(9): 477-483.
111. Grifoni SC, Jernigan NL, Hamilton G, and Drummond HA. ASIC proteins regulate smooth muscle cell migration. *Microvasc Res* 2008; 75(2): 202-210.
112. Jahr H, van Driel M, van Osch GJ, Weinans H, and van Leeuwen JP. Identification of acidsensing ion channels in bone. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337(1): 349-354.
113. Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, et al. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable Acidsensing ion channels. *Cell* 2004; 118(6): 687- 698.
114. Yermolaieva O, Leonard AS, Schnizler MK, Abboud FM, and Welsh MJ. Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(17): 6752-6757.
115. Grunder S and Chen X. Structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels (ASICs): focus on ASIC1a. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2010; 2(1): 73-94.
116. Bassler EL, Ngo-Anh TJ, Geisler HS, Ruppertsberg JP, and Grunder S. Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b. *J Biol Chem* 2001; 276 (36): 33782-33787.
117. Bevan S and Yeats J. Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol (Lond)* 1991; 433: 145-161.
118. Krishtal OA and Pidoplichko VI. A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception. *Neuroscience* 1981; 6(12): 2599-2601.
119. Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, et al. Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J Clin Invest* 2002; 110(8): 1185-1190.
120. Sluka KA, Price MP, Breese NM, et al. Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. *Pain* 2003; 106(3): 229-239.
121. Chen CC, Zimmer A, Sun WH, et al. A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(13): 8992- 8997.
122. Wu LJ, Duan B, Mei YD, et al. Characterization of acid-sensing ion channels in dorsal horn neurons of rat spinal cord. *J Biol Chem* 2004; 279 (42): 43716-43724.
123. Benson CJ, Eckert SP, and McCleskey EW. Acid-evoked currents in cardiac sensory neurons: A possible mediator of myocardial ischemic sensation. *Circ Res* 1999; 84(8): 921-928.

- 124.Price MP, Lewin GR, McIlwrath SL, et al. The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature* 2000; 407(6807): 1007- 1011.
- 125.Price MP, McIlwrath SL, Xie J, et al. The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 2001; 32(6): 1071-1083.
- 126.Page AJ, Brierley SM, Martin CM, et al. Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function. *Gut* 2005; 54(10): 1408-1415.
- 127.Ugawa S, Yamamoto T, Ueda T, et al. Amilorideinsensitive currents of the acid-sensing ion channel-2a (ASIC2a)/ASIC2b heteromeric sour-taste receptor channel. *J Neurosci* 2003; 23 (9): 3616-3622.
- 128.Ugawa S. Identification of sour-taste receptor genes. *Anat Sci Int* 2003; 78(4): 205-210.
- 129.Lin W, Ogura T, and Kinnamon SC. Acidactivated cation currents in rat vallate taste receptor cells. *J Neurophysiol* 2002; 88(1): 133-141.
- 130.Ettaiche M, Deval E, Cougnon M, Lazdunski M, and Voilley N. Silencing acid-sensing ion channel 1a alters cone-mediated retinal function. *J Neurosci* 2006; 26(21): 5800-5809.
- 131.Render JA, Howe KR, Wunsch AM, et al. Histologic examination of the eye of acid-sensing ion channel 1a knockout mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2010; 2(1): 69-72.
- 132.Ettaiche M, Guy N, Hofman P, Lazdunski M, and Waldmann R. Acid-sensing ion channel 2 is important for retinal function and protects against light-induced retinal degeneration. *J Neurosci* 2004; 24(5): 1005-1012.
- 133.Lu Y, Ma X, Sabharwal R, et al. The ion channel ASIC2 is required for baroreceptor and autonomic control of the circulation. *Neuron* 2009; 64(6): 885-897.
- 134.Johnson MB, Jin K, Minami M, Chen D, and Simon RP. Global ischemia induces expression of acid-sensing ion channel 2a in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21(6): 734-740.
- 135.Gao J, Duan B, Wang DG, et al. Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death. *Neuron* 2005; 48(4): 635-646.
- 136.Pignataro G, Cuomo O, Esposito E, et al. ASIC1a contributes to neuroprotection elicited by ischemic preconditioning and postconditioning. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2011; 3(1): 1- 8.
- 137.Friese MA, Craner MJ, Etzensperger R, et al. Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat Med* 2007; 13(12): 1483-1489.
- 138.Li MH, Inoue K, Si HF, and Xiong ZG. Calciumpermeable ion channels involved in glutamate receptor-independent ischemic brain injury. *Acta Pharmacol Sin* 2011; 32(6): 734-740.
- 139.Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-432.
- 140.Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ *Mol Cell Endocrinol* 2010; 316: 129-39.
- 141.Friedman JM, Halas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395 (6704): 763-770.
- 142.Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight- reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269 (5223): 543-546.
- 143.Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269: 540-543.
- 144.Robert J. Denver, Ronald M. Bonett, Graham C. Boorse. Evolution of Leptin Structure and Function. *Neuroendocrinology* 2011; 94: 21-38.
- 145.Holness MJ, Munns MJ, Sugden MC. Current concepts concerning the role of leptin in reproductive function. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 157: 11-20.
- 146.Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 2000; 21: 263-307.
- 147.Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos RR, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor OB-R. *Cell* 1995; 83: 1263-71.
- 148.Chen HP, Fan J, Cui S. Detection and estrogen regulation of leptin receptor expression in rat dorsal root ganglion. *Histochem Cell Biol.* 2006 Sep;126(3): 363-9.
- 149.Jin L, Zhang S, Burguera BG, et al. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* 2000; 141: 333-9.

- 150.Lin J, Barb CR, Matteri RL, Kraeling RR, Chen X, Meinersmann RJ, et al. Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary and other tissues in the pig. *Domest Anim Endocrinol* 2000; 19: 53–61.
- 151.Jin L, Burguera BG, Couce ME, et al. Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2903–11.
- 152.Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995; 1(11): 1155-1161.
- 153.Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 1996; 17: 305- 311.
- 154.Burguera B, Couce ME, Curran GL, et al. Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats. *Diabetes* 2000; 49: 1219–23.
- 155.Vilà R, Adán C, Rafecas I, et al. Plasma leptin turnover rates in lean and obese Zucker rats. *Endocrinology* 1998; 139(11): 4466–4469.
- 156.Drel VR, Mashtalir N, Ilnytska O, et al. The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*. 2006 Dec;55(12): 3335-43.
- 157.Schoeller DA, Cella LK, Sinha MK, et al. Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *J Clin Invest* 1997; 100: 1882–1887.
- 158.Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, et al. Acute and chronic effect of insulin on leptin production in humans. *Diabetes* 1996; 45: 699–701.
- 159.Koerner A, Kratzsch J., Kiess W. Adipocytokines: leptin-the classical, resistin-the controversial, adiponectin-the promising and more to come. *Endocrinol Metob*. 2005; 19: 525-46.
- 160.Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996; 137: 3144–3147.
- 161.Karsenty G. Leptin controls bone formation through a hypothalamic relay. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56: 401–415.
- 162.Kutlu S, Canpolat S, Sandal S, et al. Effects of central and peripheral administration of leptin on pain threshold in rats and mice. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; 24(3-4): 193-196.
- 163.Steppan CM, Swick AG. A role for leptin in brain development. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256(3): 600–602.
- 164.Li XL, Aou S, Oomura Y, et al. Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience* 2002; 113(3): 607–615.
- 165.Gainsford T, Wilson TA, Metcalf D, et al. Leptin can induce proliferation, differentiation and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(25): 14564-14568.
- 166.Lord GM, Matarese G, Howard JK, et al. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998; 394(6696): 790-793.
- 167.Anonim (2012). International Association for the study of pain. Erişim: (<http://www.iasppain.org/terms>). Erişim tarihi: 09.03.2012
- 168.Loesser JD, Melzack R. Pain an overview. *Lancet* 1999; 353: 1607-9.
- 169.Lewin GR, Stucky CL. Sensory neuron mechanotransduction: regulation and underlying molecular mechanisms. In: Wood JN, ed. *Molecular Basis of Pain Transduction*. 1sted. New York: Wiley 2000; 129-48.
- 170.Bıçakcı Ş, Sarıca Y. Pain and related mechanisms. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2006; 2: 1-5.
- 171.Gohar O. Contribution of ion channels in pain sensation. *Modulator* 2005; 19: 9-13.
- 172.Kostyuk PG, Veselovsky NS, Fedulova SA, Tsyndrenko AY. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-III: potassium currents. *Neuroscience* 1981; 6: 2439–2444.
- 173.Wood JN, Akopian AN, Baker M, et al. Sodium channels in primary sensory neurons: relationship to pain states. *Novartis Found Symp*. 2002; 241:159-68.
- 174.Anthony M. Rush, Theodore R. Cummins and Stephen G.Waxman. Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons. *J Physiol* 2007; 15;579:1-14

175. Fang X, McMullan S, Lawson SN, Djouhri L. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo *J Physiol* 2005; 565: 927–943.
176. Harper AA & Lawson SN. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 1985a; 359: 31–46.
177. Harper AA & Lawson SN. Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities. *J Physiol* 1985b; 359: 47–63.
178. Richard J. Miller, Hosung Jung, Sonia K. Bhangoo, and Fletcher A. White. Cytokine and Chemokine Regulation of Sensory Neuron Function. *Handb Exp Pharmacol* 2009; (194): 417–449
179. Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 1992; 355: 75–8.
180. Scott, S.A. *Sensory Neurons; Diversity, Development, and Plasticity* New York: Oxford University Press. 1992.
181. Andrea M. Peier, Aziz Moqrich, Anne C, et al. A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell*. 2002; 108: 705–715.
182. Julius, D. and Basbaum, A.I. Molecular mechanism of nociception. *Nature* 2001; 413: 203–210.
183. Wu ZZ, Pan HL. Tetrodotoxin-sensitive and -resistant Na⁺ channel currents in subsets of small sensory neurons of rats. *Brain Res* 2004; 1029: 251–8.
184. Luo, Z. D., Chaplan, S. R., Higuera, E. S., et al. Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci* 2001; 21: 1868–1875.
185. Li Li, Xue-Hong Cao, Shao-Rui Chen, et al. Upregulation of Cav3 Subunit in Primary Sensory Neurons Increases Voltage-Activated Ca²⁺ Channel Activity and Nociceptive Input in Neuropathic Pain. *J Biol Chem* 2011.
186. Yusaf SP, Goodman J, Pinnock RD, Dixon AK, Lee K. Expression of voltage gated calcium channel subunits in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 2001; 311: 137–41.
187. Duan KZ, Xu Q, Zhang XM, Zhao ZQ, Mei YA, Zhang YQ. Targeting A-type K(+) channels in primary sensory neurons for bone cancer pain in a rat model. *Pain* 2011.
188. Ristoiu V, Pluteanu F, Flonta ML, Reid G. Few cultured rat primary sensory neurons express a tolbutamide-sensitive K⁺ current. *J Cell Mol Med* 2002; 6(2): 271–4.
189. Kawano T., Zoga V., McCallum J.B., et al. ATP-sensitive potassium currents in rat primary afferent neurons: biophysical, pharmacological properties, and alterations by painful nerve injury. *Neuroscience* 2009; 162(2): 431–43.
190. Scholz A, Gruss M, Vogel W. Properties and functions of calcium-activated K⁺ channels in small neurones of rat dorsal root ganglion studied in a thin slice preparation. *J Physiol*. 1998; 513: 55–69.
191. Vyklíček L, Knotkova-Urbancova H. (Can sensory neurones in culture serve as a model of nociception? *Physiol Res* 1996; 45: 1–9.
192. Forda SR, Kelly JS. The possible modulation of the development of rat dorsal root ganglion neurones by the presence of 5-HT containing neurones of the brainstem in dissociated cell culture. *Dev Brain Res* 1985; 22: 55–65.
193. Vrinten DH, Gispén WH, Groen GJ, Adan RA. Antagonism of the melanocortin system reduced cold and mechanical allodynia in mononeuropathic rats. *J Neurosci* 2000; 20: 8131–8137
194. Muroya S, Funahashi H, Yamanaka A, et al. Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur J Neurosci*. 2004; 19: 1524–1534.
195. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001; 411: 480–484.
196. Kazuhiro Takekoshi, Kiyooki Ishii, Toru Nanmoku, et al. Leptin Stimulates Catecholamine Synthesis in a PKC Dependent Manner in Cultured Porcine Adrenal Medullary Chromaffin Cells. *Endocrinology* 2001; 142(11): 4861–4871.

197. Levy JR, Gyarmati J, Lesko JM, Adler RA, Stevens W: Dual regulation of leptin secretion: intracellular energy and calcium dependence of regulated pathway. *Am J Physiol* 2000; 278: E892-E901.
198. Avelino-Cruz JE, Flores A, Cebada J, Mellon PL, Felix R, Monjaraz E. Leptin increases L-type Ca^{2+} channel expression and GnRH-stimulated LH release in LbetaT2 gonadotropes. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 27: 298(1-2):57-65.
199. Shanley LJ, Irving AJ, Rae MG, Ashford ML, Harvey J. Leptin inhibits rat hippocampal neurons via activation of large conductance calcium-activated K^{+} channels. *Nat. Neurosci.* 2002; 5(4): 299-300.
200. Yang MJ, Wang F, Wang JH, Wu WN, et al. PI3K integrates the effects of insulin and leptin on large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in neuropeptide Y neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 298(2): 193-201.
201. J.-H. Wang, F. Wang, M.-J. Yang, et al. Leptin regulated calcium channels of neuropeptide y and proopiomelanocortin neurons by activation of different signal pathways. *Neuroscience* 2008; 156: 89–98.
202. Jessica Erriqueza, Silvia Bernascone, Monica Ciarletta, et al. Calcium signals activated by ghrelin and D-Lys3-GHRP-6 ghrelin antagonist in developing dorsal root ganglion glial cells. *Cell Calcium* 2009; 46: 197–208
203. Ozcan M., Ayar A., Serhatlioglu I., et al. Orexins Activates Protein Kinase C-Mediated Ca^{2+} Signaling in Isolated Rat Primary Sensory Neurons. *Physiol. Res.* 2010; 59: 255-262.
204. Kazuhiro Takekoshi, Kiyooki Ishii, Toru Nanmoku, et al. Leptin Stimulates Catecholamine Synthesis in a PKC Dependent Manner in Cultured Porcine Adrenal Medullary Chromaffin Cells. *Endocrinology* 2001; 142(11):4861–4871.
205. Velázquez KT, Mohammad H, Sweitzer SM: Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. *Pharmacol Res* 2007; 55: 578-589.
206. Hoth, M. and Penner, R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 1992; 355(6358): 353-6
207. Parekh, A.B. and Penner, R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 1997; 77(4): 901-30
208. Gamberucci R. Fulceri A. Benedetti. Inhibition of store-dependent capacitative Ca^{2+} influx by unsaturated fatty acids, *Cell Calcium* 1997; 21: 375–385.
209. S.R. Alonso-Torre, J. Garcia-Sancho. Arachidonic acid inhibits capacitative calcium entry in rat thymocytes and human neutrophils, *Biochim. Biophys. Acta* 1997; 1328: 207–213.
210. E.L. Watson, K.L. Jacobson, J.C. Singh, D.H. DiJulio. Arachidonic acid regulates two Ca^{2+} entry pathways via nitric oxide. *Cell Signal* 2004; 16: 157–165.
211. Z. Moneer, J.L. Dyer, C.W Taylor. Nitric oxide co-ordinates the activities of the capacitative and non-capacitative Ca^{2+} entry pathways regulated by vasopressin, *Biochem. J.* 2003; 370: 439–448.
212. B.L. Slomiany, A. Slomiany. Interference by leptin with *helicobacter pylori* lipopolysaccharide-induced cytosolic phospholipase A2 activation in gastric mucosal cells. *Journal OF Physiology and Pharmacology* 2007; 58: 117-130.
213. Cammisotto PG., Bukowiecki LJ. Role of calcium in the secretion of leptin from white adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: 1380-6.

8. ÖZGEÇMİŞ

01.01.1987 tarihinde Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Elazığ'da tamamladım. 2009 yılında F.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 2009 yılının eylül ayında F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Ana Bilim Dalında yüksek lisansa başladım. 2010 Eylül ayında Adnan Menderes Üniversitesinde düzenlenen 22. Ulusal Biyofizik Kongresinde “Artan Yüke Karşı Yapılan Egzersiz Sırasında Verdiği Solunum Parametrelerinin Genç Erkek ve Kadınlarda Karşılaştırılması” adlı poster sunumumu yaptım ve “Artan Yüke Karşı Yapılan Egzersiz Sırasında Solunum Parametrelerinin Erkek ve Bayanlarda Karşılaştırılması” adlı makale F.Ü. Sağlık Bilimleri Tıp Dergisinin 2010 yılının 24. cilt ve 3. sayısında yayınlanmıştır. 2011 yılının temmuz ayında Oxford Üniversitesinde düzenlenen Fizyoloji Kongresinde “Leptin Activates Intracellular Calcium Signals in Isolated Rat Dorsal Root Ganglion Neurons” adlı poster sunumumu yaptım. Son olarak da 2011 yılının Temmuz ayında Cambridge Üniversitesinde düzenlenen Nöroendokrinoloji Kongresinde “Leptin Activates Intracellular Calcium Signals in Isolated Rat Trigeminal Ganglion Neurons” adlı poster sunumumu yaptım.